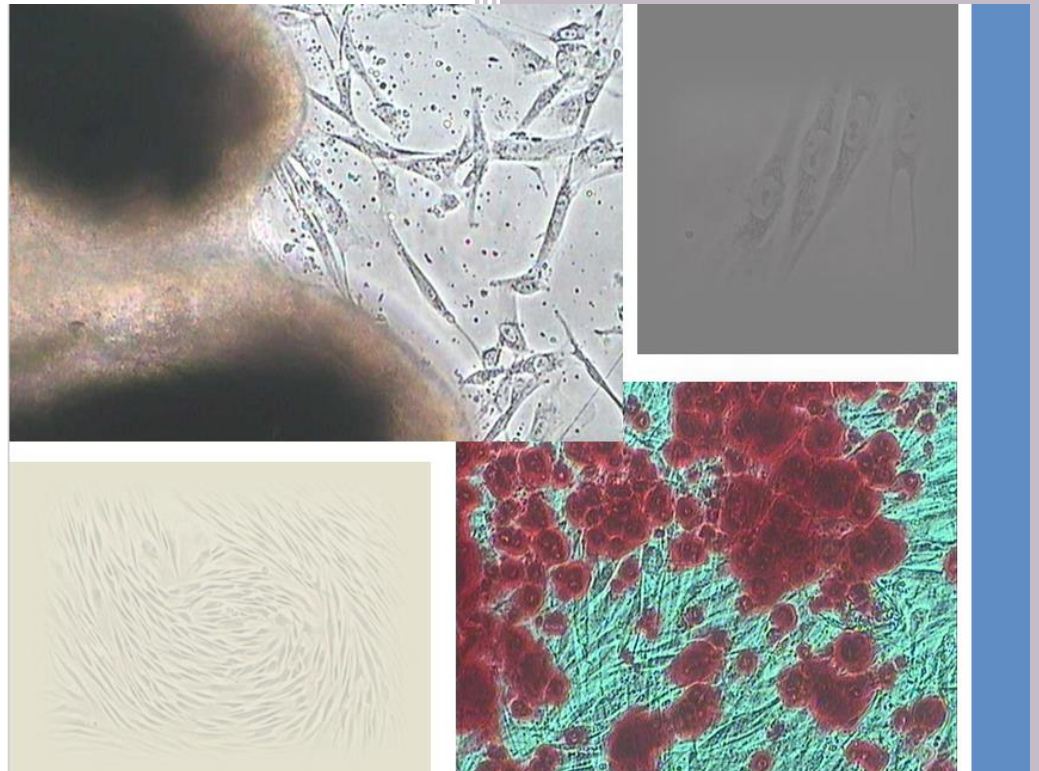


Departamento de Zoología y
Biología Celular Animal
Facultad de Farmacia

"Enriquecimiento de células madre del compartimento mesenquimal del folículo piloso humano occipital, y diseño de medios inductores de osteogénesis para su futura aplicación en terapia celular".

TESIS DOCTORAL 2022

MELANIA JULIETA ROSIQUE SOLA



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

NAZIOARTEKO
BIKAIN TASUN
CAMPUSA
CAMPUS DE
EXCELENCIA
INTERNACIONAL

Departamento de Zoología y Biología Celular Animal
Facultad de Farmacia

Grupo de Investigación BIOMICs

**Enriquecimiento de células madre del compartimento
mesenquimal del folículo piloso humano occipital,
y diseño de medios inductores de osteogénesis para su
futura aplicación en terapia celular.**

Memoria presentada por

Melania Julieta Rosique Sola

Para optar al grado de

Doctora por la Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea

Trabajo dirigido por

Prof. Dr. Marian M. de Pancorbo

Prof. Investigación Dr. Lourdes Basabe Desmots

Vitoria-Gasteiz, 2022



Este trabajo ha sido llevado a cabo gracias a la financiación por parte del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco de los grupos de investigación BIOMICs y Microfluidics & BIOMICs cluster (IT- 833-13 e IT-1271-19, respectivamente), y a la colaboración con el Dr. Alberto Gorrochategui, Director de la Clínica Dermatologica Ercilla de Bilbao y de la Coordinadora Maite Llama.

Esta Tesis no habría sido posible sin la colaboración de muchas personas, a las cuales quisiera agradecer su ayuda. Entre ellas destacan...

Marian Martínez de Pancorbo, directora de esta Tesis, que me aceptó en su Grupo de Investigación BIOMICs dándome la oportunidad de desarrollar mi conocimiento e investigar en este área tan apasionante y me brindó su apoyo a todos los niveles; gracias por tu profesionalidad, visión, implicación, motivación, generosidad, apoyo constante, y por tu gran calidez humana.

A Lourdes Basabe, codirectora de esta Tesis, que también me aceptó y me apoyó, abriéndome nuevos campos de estudio; gracias por implicarme en nuevos proyectos y por tu amabilidad.

A mis compañeros de laboratorio, pasados y presentes, por su ayuda y motivación; en especial a Laura, Maite, Miriam, Leire, Tamara, Enrique, Alba y Endika. Y a todos los que me han ayudado con los momentos de mayor estrés en la preparación de la bibliografía: Tamara, Belén, Eva y Dani.

A Guiomar y Yeraí por su ayuda en la obtención de resultados y buena disposición.

A María Puy y su equipo, por proporcionarme resveratrol y por su gran ayuda.

A Iñigo y Belén por abrirme las puertas de nuevos conocimientos en bioestadística y su disposición.

A Oliver por su gran ayuda al inicio de la tesis con la estadística, gracias por tu profesionalidad y agrado.

A mis amigos en la distancia, y a los que estáis siempre cerca: María, Noelia, Cintia, Rubén, Juan, Laura; Bea, Ana, Amaia, Leire, Gotzon...

Finalmente, todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia, especialmente de mis padres Mari Carmen y Ángel y mis hermanos; por vuestro apoyo incondicional, paciencia y comprensión y confianza. A Conchi y Sabin, por haberme ayudado tanto y estar siempre en los momentos difíciles, logísticos y humanos. A Gaizka, por ayudarme a superarlo todo y no ceder al desaliento, por facilitarme todo, por tu apoyo y fe en mí, y por supuesto por cuidar de mi salud con tu excelente habilidad gastronómica.

A mi abuela Carmen, sé que te sentirías muy orgullosa.

Por compartir todo conmigo y tener tanta paciencia, esta tesis es también vuestro logro.

A todos,... ¡¡¡GRACIAS!!!

RESUMEN

Las células madre del folículo piloso humano (hHF-MSCs) se encuentran en el compartimento mesenquimal del folículo, que está formado por la papila dérmica, la vaina dérmica y la región peribulbar. Estas células se caracterizan por su alto potencial regenerativo sin la generación de procesos fibróticos en la cicatrización de heridas, y han mostrado beneficios frente al empleo de MSCs de otras fuentes de procedencia cuando han sido transplantadas. Sin embargo, su uso está aún por explorar en un amplio rango de terapias celulares de reemplazamiento y secreción de factores de crecimiento para la reactivación de células madre endógenas.

El folículo piloso es una rica y fácilmente accesible fuente de MSCs. El presente trabajo muestra el desarrollo de una metodología que simplifica el aislamiento y enriquecimiento de hHF-MSCs de la región occipital del cuero cabelludo de donantes de entre 20 y 40 años, y que, a su vez, favorece su capacidad de duplicación y predice la probabilidad de éxito en la obtención de cultivos proliferativos, lo que facilita su adecuación para su futuro uso en terapia celular.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	FITC	Fluoresceína isotiocianato
ALP	Fosfatasa alcalina	FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
APC	Alofocianina	GO	Clasificación Gene Ontology.
AT-MSCs	Células madre mesenquimales del tejido adiposo	hHFSCs	Células estromales derivadas de folículo piloso humano
ARN	Ácido ribonucleico	hHF-MSCs	Células madre mesenquimales derivadas de folículo piloso humano
BM-MSCs	Células madre mesenquimales de médula ósea	HPL	Lisado de plaquetas humano comercial.
BM	Medio basal	HS	Suero heterólogo.
BSA	Albúmina sérica bovina	IP	Índice de proliferación.
CM	Medio condicionado	ITS	Suplemento insulina-transferrina-selenio.
Ct	Ciclo de amplificación umbral; intersección entre una curva de amplificación y una línea umbral	ISCT	International Society for Cell & Gene Therapy
cPD	Número de duplicaciones acumuladas en la población	MeSCs	Células madre melanocíticas
DEG	Genes con expression diferencial	MSCs	Células madre mesenquimales
DP	Células de la papila dérmica localizadas en el compartimento mesenquimal del folículo piloso	NCAM1	Molécula de adhesión de célula neural
DS	Células de la vaina dérmica localizadas en el compartimento mesenquimal del folículo piloso	OB-CM	Medio inductor de la osteogénesis secretados por osteoblastos
DSCs	Células madre dérmicas del compartimento mesenquimal del folículo piloso	OM	Medio inductor de la osteogénesis comercial
DMEM	Medio basal Eagle modificado por Dulbecco	PBS	Tampón fosfato salino
DMSO	Dimetilsulfóxido	PD	Duplicación de la población
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	PDT	Tiempo de duplicación de la población
EpSCs	Células madre epiteliales no derivadas de la cresta neural.	PE	Ficoeritrina
FBS	Suero bovino fetal	SDSCs	Células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural
Fibroblastos Fp	Fibroblastos de la dermis papilar	SOX2	Marcador de pluripotencia esencial para la autorrenovación
Fibroblastos Fr	Fibroblastos de la dermis reticular	SKPs	Precusores de la piel
Fibroblastos F-DHJ	Fibroblastos de la unión dermo-hipodermal	RUNX2	Factor de transcripción asociado con la diferenciación osteogénica

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Autorrenovación celular: Consiste en ciclos de división que generan repetidamente al menos una célula hija equivalente a la célula madre con capacidad latente de diferenciación.

Célula amplificadora/progenitor de tránsito: En general, el término se aplica a células que surgen de las células madre, proliferan y luego se diferencian. Inicialmente puede no estar comprometida y mantener su potencial de autorrenovación.

Célula cancerosa de origen: Célula precancerosa que da lugar a una célula madre cancerosa. Puede ser una célula madre mutada o un progenitor comprometido que ha adquirido la capacidad de autorrenovación a través de la mutación.

Célula estromal*: El término estromal se refiere a una población celular con propiedades secretoras, inmunomoduladoras y de anidamiento notables (Viswanathan et al., 2019).

Célula iniciadora de cáncer: Término general que abarca tanto la célula cancerosa de origen como la célula madre cancerosa.

Célula madre: Una célula que puede producir continuamente células hijas inalteradas y que también tiene la capacidad de producir células hijas que tienen propiedades diferentes y más restringidas.

Célula madre cancerosa: Célula con capacidad de autorrenovación responsable de sustentar un cáncer y de producir descendencia diferenciada que forma la mayor parte del cáncer.

Célula comprometida: Célula que participa en un programa que conduce a la diferenciación. Para una célula madre, esto significa salir del proceso de autorrenovación.

Célula madre de tejido: Derivado de, o residente en, un tejido fetal o adulto, con potencia limitada a las células de ese tejido. Estas células mantienen el recambio y la reparación durante toda la vida en algunos tejidos.

Células madre embrionarias: Líneas de células madre pluripotentes derivadas de embriones tempranos antes de la formación de las capas germinales del tejido.

Célula madre *in vitro*: Autorrenovación *ex vivo* en células que no se comportan abiertamente como células madre *in vivo*. Ocurre debido a la liberación de señales de compromiso inductivo o por la creación de un estado de células madre sintéticas.

Célula precursora / fundadora / ancestral: Términos generales para la célula sin capacidad de autorrenovación que contribuye a la formación de tejido.

Célula progenitora/progenitor celular*: Término genérico para un tipo de célula intermedia entre las células madre y las células diferenciadas. Muestran potencial para dar lugar a células especializadas y una capacidad reducida de autorrenovación (International Society for Stem Cell Research; ISSCR).

Homeostasis de células madre: Permanencia de la reserva de células madre tisulares a lo largo de la vida.

Medicina regenerativa: Reparación de tejido enfermo o lesionado por activación de células endógenas o por trasplante celular.

Multipotente: Célula que puede formar múltiples linajes que constituyen un tejido o tejidos completos. Si la célula forma un solo linaje se denomina unipotente, mientras que si forma dos linajes recibe el nombre de bipotente.

Nicho celular: Microambiente celular que proporciona el sostén y los estímulos necesarios para mantener la autorrenovación celular.

Oligopotente: Célula capaz de formar dos o más linajes dentro de un tejido. Ejemplo: una célula madre neural que puede crear un subconjunto de neuronas en el cerebro.

Plasticidad: Capacidad de las células madre tisulares para ampliar su potencial de diferenciación en respuesta a demandas fisiológicas o daños tisulares.

Pluripotente: Célula capaz de formar todos los linajes de células del organismo, incluidas las células germinales, y algunos o incluso todos los tipos de células extraembrionarias. Ejemplo: células madre embrionarias.

Regeneración a largo plazo: Renovación permanente del tejido mediante células trasplantadas.

Reprogramación celular: Aumento del potencial de diferenciación de una célula. Ocurre de forma natural en organismos con capacidad de autorregeneración (desdiferenciación) y puede inducirse experimentalmente en células de mamíferos (células pluripotenciales inducidas: iPSCs).

Terapia de reemplazo celular: Regeneración de tejido por la incorporación funcional de la progenie de células madre trasplantadas.

Totipotente: Célula con potencial suficiente para formar todo el organismo. La totipotencia se observa en el cigoto y en las células del botón embrionario.

Este glosario se ha incorporado al trabajo de tesis para facilitar la comprensión de algunos términos, que han sido recopilados del “Glosario sobre la biología de las células madre” elaborado por Nature (Smith, 2006). Los términos marcados como (*) no proceden del glosario de Nature.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
RESUMEN	5
ABREVIATURAS	6
GLOSARIO DE TÉRMINOS	7
ÍNDICE.....	9
I. INTRODUCCIÓN	14
1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCS) ADULTAS.	15
1.1 INTERÉS DE LA OBTENCIÓN DE MSCS EN TERAPIA CELULAR.	15
1.1.1 <i>Beneficios de su aplicación clínica.</i>	15
1.1.2 <i>Estrategias de reemplazamiento celular.</i>	17
1.1.3 <i>Efecto paracrino de los medios condicionados secretados por MSCs.</i>	18
1.2 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.	19
1.2.1 <i>Descubrimiento.</i>	19
1.2.2 <i>Potencial de autorrenovación y diferenciación de las MSCs.</i>	19
1.2.1 <i>Jerarquías proliferativas en los nichos de MSCs.</i>	20
1.2.1.1 Quiescencia de las MSCs.	21
1.2.1.2 MSCs activadas.	21
1.2.1.3 Progenitores multipotentes mesenquimales.	21
1.2.1.4 MSCs amplificadoras de tránsito.....	21
1.3 TIPOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN EL INDIVIDUO ADULTO.	22
1.3.1 <i>Células madre mesenquimales pluripotentes: Células Muse.</i>	22
1.3.2 <i>Células madre mesenquimales multipotentes.</i>	23
1.4 LOCALIZACIÓN DE LAS MSCS EN EL ORGANISMO ADULTO.	24
1.4.1 <i>Nichos celulares.</i>	24
2 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL FOLÍCULO PILOSO HUMANO DE LA REGIÓN OCCIPITAL DEL CUERO CABELLUDO.	24
2.1 INTERÉS DE LA OBTENCIÓN DE MSCS DEL FOLÍCULO PILOSO HUMANO (HHF-MSCs).	24
2.2 TIPOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL FOLÍCULO PILOSO DE LA REGIÓN OCCIPITAL.	26
2.2.1 <i>Células del compartimento mesenquimal del folículo piloso.</i>	27
2.2.1.1 Células madre dérmicas.	28
2.2.1.2 Células de la papila dérmica.	29
2.2.1.3 Células de la vaina dérmica.	30
2.2.2 <i>Otros tipos celulares del folículo piloso y tejido circundante que pueden proliferar en cultivo.</i> 30	
2.2.2.1 Células madre/progenitores del compartimento epitelial del folículo piloso.	30
2.2.2.1.1 Células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural (SDSCs).	30
2.2.2.1.2 Células madre melanocíticas (MeSCs).	32
2.2.2.1.3 Células madre epiteliales no derivadas de la cresta neural (EpSCs) y telocitos.	32
2.2.2.1 Fibroblastos dérmicos del tejido circundante al folículo piloso.	33
2.2.2.2 Pericitos, MSCs perivasculares y de tejido adiposo dérmico blanco.	35
2.3 METODOLOGÍAS PARA EL AISLAMIENTO DE LAS HHF-MSCS.	36
2.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS HHF-MSCS DE LA REGIÓN OCCIPITAL.	37
2.4.1 <i>Comparación fenotípica, según los criterios mínimos propuestos por la ISCT, de las HHF-MSCs con otros tipos celulares que pueden proliferar con ellas en cultivo.</i>	37

2.4.2	<i>Morfología de las hHF-MSCs y modo de expansión en cultivo.</i>	39
2.4.3	<i>Comparación de marcadores entre las poblaciones celulares que pueden proliferar en cultivo para la selección de hHF-MSCs con propósitos terapéuticos.</i>	40
2.5	MEDIOS CONDICIONADOS INDUCTORES DE LA OSTEOGÉNESIS PARA AUMENTAR EL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS MSCs.	43
2.5.1	<i>Estrategias de inducción osteogénica que emplean medios condicionados.</i>	43
2.5.1.1	Empleo de medios condicionados secretados por osteoblastos.	43
2.5.1.2	Efecto de la concentración del medio condicionado en la inducción osteogénica.	45
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	46
1	HIPÓTESIS.	47
2	OBJETIVOS.	48
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	50
1	MUESTRAS BIOLÓGICAS: EXPLANTES DE FOLÍCULO PILOSO.	51
1.1	PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS Y CONSERVACIÓN.	51
1.2	INICIO DEL CULTIVO.	51
2	MIGRACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO EN MSCS DEL FOLÍCULO PILOSO.	52
2.1	CULTIVO PRIMARIO.	52
2.2	PASES TRAS EL CULTIVO PRIMARIO.	52
3	MANTENIMIENTO Y EXPANSIÓN DE LOS CULTIVOS.	53
3.1	TIPOS DE SUEROS EMPLEADOS COMO APORTE DE FACTORES DE CRECIMIENTO.	53
3.1.1	<i>Lisado de plaquetas humano comercial (HPL).</i>	53
3.1.2	<i>Suero heterólogo.</i>	53
3.1.3	<i>Suero bovino fetal.</i>	53
3.2	MEDIOS DE CULTIVO COMPLETOS.	53
3.2.1	<i>Medio de cultivo completo para la expansión y mantenimiento de las hHFSCs.</i>	54
3.2.2	<i>Medio de cultivo para los controles negativos de ensayos de diferenciación.</i>	54
3.2.3	<i>Medios para el tratamiento con resveratrol.</i>	54
3.3	TRIPSINIZACIÓN.	55
3.4	RECUENTO CELULAR Y VIABILIDAD.	56
3.5	CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO TEÓRICO.	56
3.6	CRIOPRESERVACIÓN.	57
3.7	DESCONGELACIÓN.	57
3.8	MICROSCOPIA.	57
4	DIFERENCIACIÓN CELULAR.	58
4.1	DIFERENCIACIÓN A LINAJES MESODÉRMICOS.	58
4.1.1	<i>Diferenciación adipogénica.</i>	58
4.1.1	<i>Diferenciación osteogénica.</i>	59
4.1.1.1	Recuperación de medios condicionados inductores de la osteogénesis.	61
4.1.1	<i>Diferenciación condrogénica.</i>	61
4.2	DIFERENCIACIÓN A LINAJES ENDODÉRMICOS.	62
5	CITOMETRÍA DE FLUJO.	63
5.1	ANTÍGENOS DE SUPERFICIE MESENQUIMALES.	63
5.1.1	<i>Anticuerpos.</i>	63
5.1.2	<i>Muestras y controles</i>	63
5.1.2.1	Controles de superposición espectral	64
5.1.2.2	Controles de isotipo	64
5.1.2.3	Control negativo	64

5.1.2.4	Control de viabilidad celular.....	64
5.1.3	<i>Protocolo de preparación celular para citometría.....</i>	65
5.2	OTROS MARCADORES DE SUPERFICIE NO MESENQUIMALES.....	65
5.3	FASES DEL CICLO CELULAR.....	65
5.4	APOPTOSIS Y NECROSIS.....	66
5.5	ANÁLISIS DE DATOS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO.....	67
6	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	67
6.1	EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	67
6.2	OBTENCIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO.....	68
6.3	PCR A TIEMPO REAL.....	68
7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69
IV.	RESULTADOS.....	70
1	OBTENCIÓN DE MSCS A PARTIR DE EXPLANTES DE FOLÍCULO PILOSO DE LA REGIÓN OCCIPITAL DEL CUERO CABELLUDO.....	71
1.1	EXPLANTES DE FOLÍCULO PILOSO Y CULTIVO PRIMARIO.....	71
1.1.1	<i>Aislamiento y enriquecimiento de MSCs de folículo piloso.....</i>	71
1.1.2	<i>Obtención de células adherentes a partir de explantes.....</i>	73
1.1.3	<i>Expansión de hHFSCs con HPL durante el cultivo primario.....</i>	77
1.1.4	<i>Efecto del suero heterólogo en la expansión de hHFSCs durante el cultivo primario.....</i>	79
1.1.5	<i>Efecto de la edad de los donantes de explantes de folículo piloso en la expansión de hHFSCs durante el cultivo primario.....</i>	81
1.2	EXPANSIÓN DE hHFSCs DURANTE EL PRIMER PASE.....	83
1.2.1	<i>Efecto del empleo de HPL y HS en la duplicación de hHFSCs durante el primer pase.....</i>	83
1.2.2	<i>Variaciones asociadas al donante.....</i>	85
1.3	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE ENRIQUECIMIENTO DE hHFSCs EN EL CULTIVO PRIMARIO Y PRIMER PASE.....	86
1.3.1	<i>Eficacia en el enriquecimiento en hHFSCs y estudio de variables explicativas.....</i>	86
1.3.2	<i>Generación de un modelo estadístico predictivo.....</i>	89
1.4	OBTENCIÓN DE hHFSCs A CORTO Y MEDIO PLAZO.....	96
1.4.1	<i>Expansión de las hHFSCs hasta el quinto pase.....</i>	96
1.4.2	<i>Estudio del efecto de la densidad celular de siembra en la capacidad de duplicación de las hHFSCs.....</i>	99
1.4.3	<i>Optimización de la de la metodología de obtención de hHFSCs.....</i>	101
1.4.3.1	Estudio de la densidad de siembra como variable explicativa de la capacidad de duplicación de las hHFSCs.....	101
1.4.3.2	Modelado estadístico para la optimización de la metodología de obtención de hHF-MSCs.....	104
1.5	EFFECTO DEL EMPLEO DE SUERO BOVINO FETAL EN LA EXPANSIÓN CELULAR PARA SU POSTERIOR DIFERENCIACIÓN A LINAJES MESODÉRMICOS.....	108
2	CARACTERIZACIÓN DE LAS hHFSCs DE FOLÍCULO PILOSO HUMANO DE LA REGIÓN OCCIPITAL.....	110
2.1	CULTIVO DE hHFSCs PARA SU CARACTERIZACIÓN.....	110
2.2	MORFOLOGÍA.....	111
2.3	ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPO.....	115
2.4	ESTUDIO DEL POTENCIAL MULTIPOTENTE <i>IN VITRO</i> DE LAS hHFSCs PARA SU DIFERENCIACIÓN A LINAJES MESODÉRMICOS.....	120
2.5	ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE hHF-MSCs Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL.....	126
2.5.1	<i>Marcadores de selección.....</i>	126
2.5.1.1	Identidad de las hHF-MSCs.....	126
2.5.1.2	Marcadores selectivos de otras poblaciones que pueden proliferar en cultivo.....	127
2.5.2	<i>Caracterización funcional in silico de las hHF-MSCs.....</i>	129
2.5.2.1	Genes con expresión diferencial (DEG).....	129
2.5.2.2	Clasificación Gene Ontology (GO) de los genes sobreexpresados en la población hHF-MSc.....	131

2.5.2.3	Funcionalidad de las proteínas hHF-MSCs y rutas en las que intervienen.	133
3	IDENTIDAD DE LAS HHF-MSCS SEGÚN SU CAPACIDAD PROLIFERATIVA.	136
3.1	SELECCIÓN DE ENSAYOS PARA EL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS HHF-MSCS.	136
3.2	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS HHF-MSCS.	137
3.3	EFEECTO EN LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL GRADO DE CONFLUENCIA ALCANZADO.	140
3.4	FASES DEL CRECIMIENTO EN EL SUBCULTIVO.	143
3.5	EL PERIODO DE LATENCIA FUE DE 1,33 DÍAS DE DURACIÓN (I.C. DEL 95% DE 1,09 A 1,60) (TABLA 36). TRAS LOS RESULTADOS OBTENIDOS SOBRE LAS FASES DE CRECIMIENTO, VIABILIDAD Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO, SE ESTIMÓ QUE LAS HHF-MSCS AL 80% DE CONFLUENCIA MOSTRABAN UNA ALTA TASA DE DUPLICACIÓN DE LA POBLACIÓN (FIGURA 58) SIN ENTRAR EN FASE ESTACIONARIA (FIGURA 61) Y, POR CONSIGUIENTE, SIN SUFRIR INHIBICIÓN POR CONTACTO CELULAR. A LA VISTA DE ELLO, PUEDE CONCLUIRSE QUE EL CUARTO DÍA, O ENTRE EL CUARTO Y QUINTO DÍAS DE CULTIVO, ES EL PERIODO ÓPTIMO PARA RESEMBRAR LA POBLACIÓN DE HHF-MSCS SIN SOBREPASAR EL 80% DE CONFLUENCIA (TABLA 35; FIGURA 61). OBTENCIÓN DE UN NÚMERO MÍNIMO DE HHF-MSCS CLÍNICAMENTE RELEVANTE.	144
3.6	ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN.	146
3.7	SINCRONIZACIÓN CELULAR TRAS LA INHIBICIÓN POR CONTACTO Y ESTADO DE DEPRIVACIÓN.	147
3.7.1	<i>Efecto de la sincronización celular en fase G0/G1 del ciclo celular en la capacidad proliferativa.</i>	<i>147</i>
3.7.1.1	Inducción a la sincronización celular en fase G0/G1.	147
3.7.1.2	Morfología celular.	148
3.7.1.3	Ciclo Celular e Índice de Proliferación.	149
3.7.1.4	En síntesis, el índice de proliferación (Tabla 40; Figura 65-D) fue 2,6 veces menor en la población celular sincronizada en fase G0/G1 (0,09 [I.C. 95% de 0,08 a 0,10] frente a 0,24 [I.C. de 0,22 a 0,26] correspondiente a la población control, lo que se corresponde con el aumento significativo de células en fase G0/G1 en la población hHF-MSCs inhibida por contacto y en estado de privación de nutrientes y de factores de crecimiento. Cinética de crecimiento tras la sincronización del cultivo.	151
3.7.1.5	Viabilidad. Apoptosis y necrosis celular.	152
3.7.2	<i>Recuperación de cultivos sincronizados en fase G0/G1.</i>	<i>155</i>
4	ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS PRODUCIDOS POR OSTEÓBLASTOS DERIVADOS DE HHF-MSCS PARA INDUCIR EL POTENCIAL OSTEOGÉNICO <i>IN VITRO</i> DE LAS HHF-MSCS.	160
4.1	POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS PRODUCIDOS POR LAS HHF-MSCS.	160
4.1.1	<i>Producción de medios condicionados durante la diferenciación osteogénica de las hHF-MSCs.</i>	<i>160</i>
4.1.2	<i>Selección de métodos de producción de medio condicionado eficaces para la inducción osteogénica de hHF-MSCs.</i>	<i>162</i>
4.1.2.1	Osteogénesis con medio condicionado producido por hHF-MSCs cada 3-4 días durante su diferenciación a osteoblastos.	162
4.1.2.2	Osteogénesis con medio condicionado producido por hHF-MSCs tras su inducción osteogénica con una dosis única de medio inductor comercial.	165
4.1.2.3	Osteogénesis con medio condicionado producido por hHF-MSCs durante su diferenciación a osteoblastos combinado con medio inductor comercial en proporción 1:1.	167
4.1.2.4	Selección del medio condicionado producido por osteoblastos derivados de hHF-MSCs para el estudio de su potencial de inducción osteogénica.	172
4.1.3	<i>Capacidad de inducción osteogénica del medio condicionado producido por osteoblastos derivados de hHF-MSCs.</i>	<i>176</i>
4.2	ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA EN HHF-MSCS DE LOS MEDIOS DE INDUCCIÓN SEGÚN SU CONCENTRACIÓN.	181
V.	DISCUSIÓN	184
1	LA METODOLOGÍA DE MIGRACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO FAVORECE LA PROLIFERACIÓN DE HHF-MSCS DE FOLÍCULO PILOSO HUMANO.	185

2	LA EDAD DEL DONANTE DE FOLÍCULO PILOSO Y OTROS FACTORES RELATIVOS A LAS CONDICIONES DE CULTIVO AFECTAN A LA OBTENCIÓN DE HHF-MSCS.....	187
3	EL EMPLEO DE SUERO BOVINO FETAL DISMINUYE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS HHF-MSCS SIN AFECTAR SU POTENCIAL MULTIPOTENTE.....	192
4	LA POBLACIÓN CELULAR OBTENIDA MEDIANTE MIGRACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE CÉLULAS DEL FOLÍCULO PILOSO ESTÁ FORMADA POR CÉLULAS MADRE DEL COMPARTIMENTO MESENQUIMAL DEL FOLÍCULO PILOSO (HHF-MSCS).....	193
5	LA METODOLOGÍA DE ENRIQUECIMIENTO DE LAS HHF-MSCS NO FAVORECE LA PRESENCIA DE POBLACIONES CELULARES CD34+.....	196
6	7. LA POBLACIÓN HHF-MSC MUESTRA POTENCIAL DE AUTORRENOVACIÓN Y DIFERENCIACIÓN MULTIPOTENTE.	199
7	LAS HHF-MSCS MUESTRAN UNA CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL PROPIA DE CÉLULAS MADRE.	200
8	LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS HHF-MSCS MUESTRA UNA CAPACIDAD PROLIFERATIVA SIMILAR A LA DE LAS CÉLULAS DEL COMPARTIMENTO MESENQUIMAL DE FOLÍCULO PILOSO OBSERVADA EN ESTUDIOS PREVIOS.	201
9	LAS FASES DEL CRECIMIENTO EN CULTIVO DE LAS HHF-MSCS REVELAN EL TIEMPO MÁXIMO QUE DEBERÍAN MANTENERSE EN CULTIVO PARA EVITAR FENÓMENOS DE SENESCENCIA.....	203
10	LAS HHF-MSCS MUESTRAN UN CICLO CELULAR LENTO CARACTERÍSTICO DE LAS POBLACIONES MESENQUIMALES DEL FOLÍCULO PILOSO.....	204
11	LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS HHF-MSCS MUESTRA SU ADECUACIÓN PARA FUTUROS USOS EN TERAPIA CELULAR.	206
12	EFFECTO DE LA CONFLUENCIA Y LA DEPRIVACIÓN DE NUTRIENTES EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS HHF-MSCS.....	207
13	REVERSIÓN DE CULTIVOS CELULARES EN ESTADO NO PROLIFERATIVO MEDIANTE RESVERATROL.	209
14	DIFERENCIACIÓN DE HHF-MSCS A LINAJE OSTEOGÉNICO Y PRODUCCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS INDUCTORES DE OSTEOGÉNESIS.	210
VI.	CONCLUSIONES	213
VII.	BIBLIOGRAFÍA	217

I. INTRODUCCIÓN

1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs) ADULTAS.

1.1 INTERÉS DE LA OBTENCIÓN DE MSCs EN TERAPIA CELULAR.

1.1.1 Beneficios de su aplicación clínica.

En la actualidad, las células madre utilizadas en ensayos clínicos terapéuticos se pueden dividir en tres categorías generales: (a) células madre embrionarias (ESCs) derivadas de embriones tempranos; (b) células madre pluripotentes inducidas (iPSCs); y (c) células madre adultas, incluidas las células madre mesenquimales (MSCs) (Jiang et al., 2021).

Las ESCs y las iPSCs inicialmente mostraron un futuro prometedor en terapia celular debido a que pueden diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares. Sin embargo, las terapias basadas en células embrionarias y en iPSCs pueden conducir a un riesgo de formación de teratomas *in vivo* (Ben-David & Benvenisty, 2011; Knoepfler, 2009), relacionado probablemente con el mayor potencial pluripotente y de autorrenovación (Knoepfler, 2009); (Figura 1).

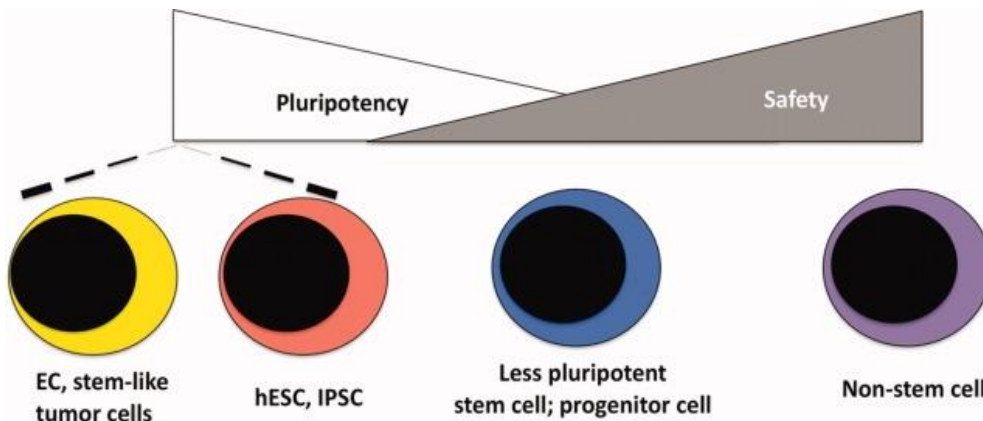


Figura 1. Relación entre pluripotencia y tumorigenicidad. EC (células de carcinoma embrionario); hESC (células madre embrionarias humanas); iPSC (células madre pluripotentes inducidas). Imagen obtenida de Knoepfler (2009).

Las MSCs han llegado a ser consideradas como una herramienta terapéutica única y accesible para la medicina regenerativa (Mistriotis & Andreadis, 2013; Petrenko et al., 2020) y, tanto su empleo, como el alcance de sus posibles aplicaciones, se encuentra en continuo crecimiento. En realidad, las MSCs han ido sustituyendo a las ESC y a las iPSCs en terapia celular (Soundararajan & Kannan, 2018) debido a sus capacidades de diferenciación sin la formación de teratomas *in vivo* (Jiang et al., 2002) y a la ausencia de problemas éticos que acompañan al uso de células madre embrionarias (Soundararajan & Kannan, 2018).

El extenso espectro de patologías donde pueden aplicarse las MSCs, gracias a sus propiedades biológicas, incluye, entre otros, heridas, defectos óseos y cartilaginosos, enfermedad de injerto contra huésped

desarrollada tras un trasplante por ejemplo de médula ósea o hepático, trastornos cardiovasculares, cáncer, lesión de la médula espinal, la enfermedad de Parkinson o los modelos animales de enfermedad de Alzheimer (Chen et al., 2008; Nöth et al., 2008; Yang et al., 2009; Ito et al., 2010; Manuguerra-Gagné et al., 2013; Mistriotis & Andreadis, 2013; Sánchez-Guijo et al., 2014; Donnelly et al., 2018; Naji et al., 2019; Petrenko et al., 2020; Jiang et al., 2021).

La mayor parte de las MSCs empleadas en terapia celular son procedentes de médula ósea (45,07%), tejidos neonatales, que incluyen MSCs del cordón umbilical, sangre del cordón umbilical y Warton-Jelly MSCs (38,03%) y de tejido adiposo (9,86%). En contraste, solo un 7,04% de los ensayos utilizan MSCs de otras fuentes (Figura 2-B). La comparación de estas estimaciones con las analizadas por Naji et al. (2019), con datos de 2018, muestran un ligero aumento del ~5% en el empleo de MSCs de otras fuentes distintas a médula ósea, tejido adiposo y tejido neonatal.

Se han llevado a cabo cientos de ensayos clínicos de terapia celular con MSCs de diversa procedencia en hospitales universitarios e instituciones biomédicas de todo el mundo. La mayoría de los estudios de este tipo se registran en la base de datos del “US National Institutes of Health” (NIH). La búsqueda de ensayos de terapia celular que implican las MSCs en la base datos del NIH (<https://clinicaltrials.gov/>), y el análisis de los datos obtenidos, revelan los posibles tratamientos de terapia celular a los que se han dirigido las MSCs (Figura 2-A), la fuente de procedencia del organismo de las mismas (Figura 2-B), la fase de investigación en la que se encuentran los ensayos clínicos (Figura 2-C) y los países o regiones donde están localizados los hospitales e instituciones biomédicas que participan en estos ensayos (Figura 2-D). En la actualidad, casi el 80% de los ensayos clínicos de terapia celular con MSCs están diseñados principalmente para el tratamiento en enfermedades degenerativas, autoinmunidad, traumatológicas e inflamación severa (Figura 2-B). El 5,6% de los ensayos localizados se corresponden con terapias de heridas diabéticas que emplean Warton-Jelly MSCs.

Además de las aplicaciones ya mencionadas, en la actualidad, se están llevando a cabo estudios para evaluar la eficacia y seguridad de MSCs de cordón umbilical y médula ósea en el tratamiento de pacientes afectados por la enfermedad COVID-19 severa (<https://clinicaltrials.gov/>), por ejemplo, para atenuar la “tormenta de citoquinas” que provoca el virus SARS-CoV-2, o para tratar la neumonía. Uno de ellos ha completado la fase 2 en Wuhan (China) y en Estados Unidos se ha completado otro estudio en fase 1 para evaluar los efectos de una única inyección de MSCs en pacientes con infección por COVID-19.

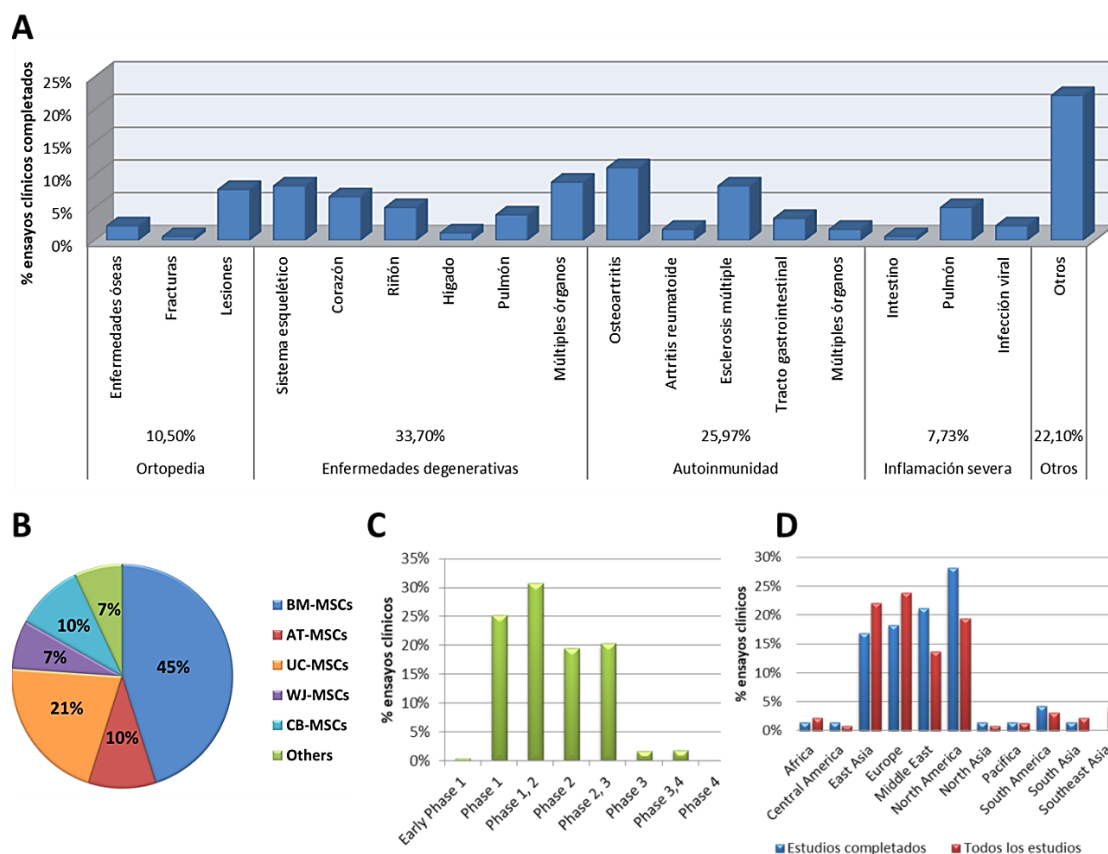


Figura 2. Ensayos clínicos de terapia celular a nivel mundial (gráficos realizados a partir de las búsquedas en la base de datos de <https://clinicaltrials.gov/>; ClinicalTrials.gov; marzo de 2021). A) Proporción de MSCs en ensayos completados (estudios finalizados normalmente; los participantes ya no están siendo examinados ni tratados); BM (médula ósea); UC (cordón umbilical); AT (tejido adiposo); WJ (Wharton-Jelly); CB (sangre del UC). B) Condiciones médicas a las que se dirigen las MSC por proporción de ensayos. C) Fases de investigación. D) Proporción de ensayos según su localización.

1.1.2 Estrategias de reemplazamiento celular.

El objetivo de la terapia celular con MSCs es promover el reemplazo de células en órganos dañados más allá de su capacidad de autorreparación. Las células madre y los progenitores endógenos se encuentran entre las poblaciones celulares que participan en la reconstrucción del tejido dañado, en los procesos de migración, proliferación y diferenciación celular, liberan señales citoquinas y quimiocinas y, contribuyen a la remodelación de la matriz extracelular (Kessler et al., 2014).

Pueden contemplarse al menos dos estrategias terapéuticas diferentes para el reemplazo celular: a) inyección directa o sistémica de MSCs, y b) inyección en el tejido u órgano diana de MSCs diferenciadas previamente *in vitro*. La administración de MSCs en el órgano dañado puede realizarse también dentro de *scaffolds* o hidrogeles (Petrenko et al., 2020). Además de estas estrategias, la ingeniería de tejidos utiliza células madre para la generación de tejidos *ex vivo* o *in situ*. Finalmente, las células madre también son excelentes candidatas como vehículos para la terapia génica celular (Kessler et al., 2014).

Se han planteado dos teorías sobre los mecanismos potenciales de reparación de las MSCs en medicina regenerativa: la “Teoría de la Diferenciación” y la “Teoría Paracrina” (apartado 1.1.3).

La “Teoría de la Diferenciación” establece que las células madre inyectadas anidan siguiendo gradientes de citoquinas y quimiocinas liberadas por el órgano enfermo (Kessler et al., 2014), se diferencian directamente en células especializadas y reparan el tejido dañado agregando o reemplazando células maduras (Jiang et al., 2021). Estos resultados han sido demostrados en estudios de condrogénesis en modelos animales tras la inyección intraarticular de MSCs en ácido hialurónico, en comparación con el empleo de ácido hialurónico únicamente (A. Mokbel et al., 2011; A. N. Mokbel et al., 2011). Sin embargo, de Windt et al. (2017) observaron que las MSCs implantadas, aunque proporcionaron la estimulación inicial, posteriormente se eliminaron del tejido. Asimismo, otros estudios con MSCs *in vitro* han demostrado que es difícil lograr una diferenciación estable y eficaz (Pelttari et al., 2006; Mueller & Tuan, 2008; Liu et al., 2018). Estos estudios sugieren que la función de las células madre en la reparación y regeneración de tejidos está mediada por componentes activos secretados por las células madre (“Teoría paracrina”), en lugar de por su diferenciación directa en células diana (Jiang et al., 2021).

1.1.3 Efecto paracrino de los medios condicionados secretados por MSCs.

Una alternativa al reemplazo celular es la administración de factores de crecimiento y fármacos apropiados para estimular las células madre endógenas y facilitar la reparación, aumentando la proliferación celular y/o dirigiéndolas a su diferenciación específica (Petrenko et al., 2020). En los últimos años, ha habido una creciente evidencia sobre los beneficios terapéuticos de los efectos paracrinos de las células madre (Jiang et al., 2021).

Según la "Teoría Paracrina", las células madre inyectadas secretan varios derivados, incluidos factores de crecimiento, vesículas extracelulares (EV) y matriz extracelular (ECM) (Daneshmandi et al., 2020; L. et al., 2019), que pueden ejercer efectos paracrinos sobre los tejidos dañados y modificar el comportamiento biológico de las células receptoras (células madre endógenas y células diferenciadas maduras), de forma que inducen el anidamiento de las células madre endógenas, promueven su proliferación, diferenciación, migración, polarización, metabolismo, apoptosis y ejercen una actividad inmunomoduladora, regulando el microambiente local para reparar y regenerar el tejido (Friedenstein et al., 1970; Friedenstein et al., 1974; Pittenger et al., 1987; Pittinger et al, 1999; Caplan & Dennis, 2006; Prockop & Youn Oh, 2012; Manuguerra-Gagné et al., 2013; Bianco, 2014; Pawitan, 2014; Stoddart et al., 2015; Phinney & Pittenger, 2017; Vizoso et al., 2017; Park et al., 2018; Li et al., 2019; Daneshmandi et al., 2020; Jiang et al., 2021).

El proceso de regeneración completo de un tejido puede estar coordinado por múltiples mecanismos, y las células madre pueden tener diversos papeles en diferentes etapas del proceso de reparación real. El control preciso de los diferentes papeles de las células madre puede ser una forma eficaz de lograr el efecto de regeneración deseado (Jiang et al., 2021).

1.2 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células que se originan en el mesodermo embrionario (Caplan, 1991; Bruder et al., 1994; Dennis & Charbord, 2002; Heneidi et al., 2013; Hu et al., 2018; Naji et al., 2019), y poseen potencial de autorrenovación y diferenciación en células más especializadas. Asimismo, las MSCs han mostrado propiedades secretoras, de anidamiento e inmunomoduladoras (Kallmeyer & Pepper, 2015; Huang et al., 2017; Phinney & Pittenger, 2017; Vizoso et al., 2017; Park et al., 2018).

1.2.1 Descubrimiento.

Las células madre mesenquimales fueron aisladas por primera vez de la médula ósea de ratones y cobayas (Friedenstein et al., 1970). Estas células con capacidad para adherirse a la superficie sin revestimiento del frasco de cultivo durante su cultivo *in vitro*, y ser subcultivadas repetidamente (Friedenstein et al., 1970; Friedenstein et al., 1995), fueron denominadas originalmente como “Unidades Formadoras de Fibroblastos” (CFU-Fs), debido a su potencial para generar colonias de células similares a fibroblastos, en contraste con las células hematopoyéticas no-adherentes (CFU-Cs) (Friedenstein et al., 1970; Castro-Malaspina et al., 1980; Jinnai et al., 1984).

Inicialmente, se consideró que las CFU-Fs eran células madre o progenitores de células esqueléticas (Friedenstein et al., 1966; Friedenstein et al., 1968; Friedenstein et al., 1970; Dennis et al., 1992). Por otra parte, Friedenstein et al. (1974) demostraron que estas células eran responsables, no solo de generar hueso, sino también de transferir el microambiente típico del tejido hematopoyético cuando eran trasplantadas bajo la cápsula renal de cobayas. Como consecuencia, la denominación CFU-F evolucionó a otros términos como “células madre osteogénicas” o “células estromales de médula ósea”, ya que se consideró que era mejor su definición basada en las funciones celulares (Owen & Friedenstein et al., 1988; Beresford, 1989). Esta denominación basada en funciones celulares fue adoptada también en humanos (Castro-Malaspina et al., 1980; Dennis et al., 1992).

1.2.2 Potencial de autorrenovación y diferenciación de las MSCs.

Las MSCs poseen el potencial de las células madre para autorrenovarse y diferenciarse en células más especializadas (Caplan, 1991; Chen et al., 2015; Huang et al., 2017; Donnelly et al., 2018; Naji et al., 2019).

El proceso de autorrenovación permite mantener una reserva de MSCs a lo largo de la vida del organismo (Donnelly et al., 2018). Para llevar a cabo este proceso, las células madre realizan una división simétrica (Figura 3), a partir de la cual se originan dos células hijas idénticas a la célula madre original (Chen et al., 2015). Ambas células surgen y permanecen en el nicho celular, y mantienen su potencial de célula madre (Huang et al., 2017).

El proceso de diferenciación permite obtener células hijas más especializadas. Para poder diferenciarse, las células madre se someten a una división asimétrica (Figura 3) y generan dos tipos de células hijas; una de ellas permanece como célula madre en el nicho celular, mientras que la otra célula hija abandona el nicho y pasará a un estado celular más comprometido (Chen et al., 2015; Huang et al., 2017).

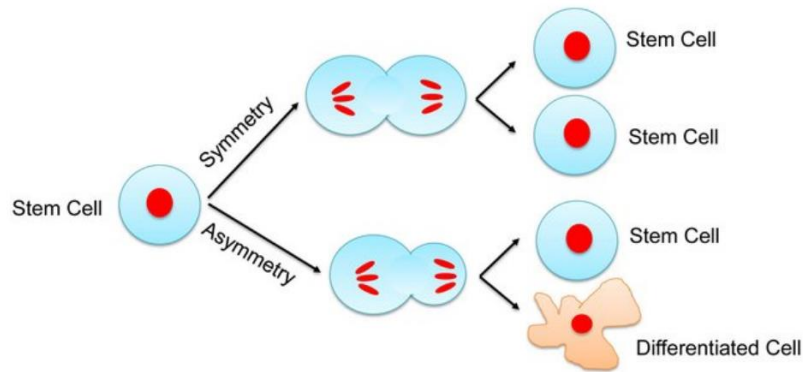


Figura 3. Divisiones simétrica y asimétrica a las que se someten las células madre. Imagen obtenida de Chen et al. (2015).

El balance entre las divisiones simétricas o asimétricas está controlado por el nicho ambiental (Chen et al., 2015; Donnelly et al., 2018; Ehninger & Trumpp, 2011).

1.2.1 Jerarquías proliferativas en los nichos de MSCs.

Las MSCs se encuentran en estado quiescente o activo dentro de su compartimento mesenquimal (Figura 2). En respuesta a una demanda regenerativa o fisiológica, las células madre mesenquimales pueden abandonar el nicho y diferenciarse en progenitores celulares algo más comprometidos que, a su vez, se diferencian en células maduras.

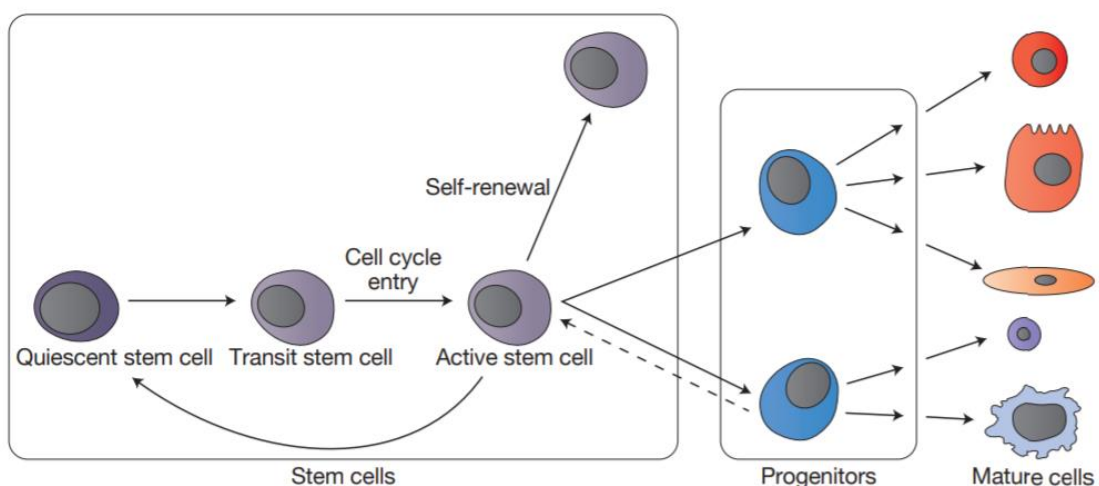


Figura 4. Modelo general que describe la organización jerárquica de las células madre específicas de tejido y progenitores celulares. Imagen obtenida de Visvader et al. (2016).

El equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación es fundamental para la homeostasis del tejido, la prevención de la transformación celular y el mantenimiento de a largo plazo de una reserva viable de MSCs durante toda la vida del organismo (Chen et al., 2015; Visvader et al., 2016; Huang et al., 2017).

1.2.1.1 *Quiescencia de las MSCs.*

La mayoría de las MSCs permanecen en estados reversibles de quiescencia, probablemente para proteger la integridad genómica de las células longevas (Visvader & Clevers, 2016). La activación de las células madre para entrar en el ciclo celular tiene lugar en respuesta a un daño tisular o a un estímulo fisiológico (Visvader & Clevers, 2016; Huang et al., 2017).

1.2.1.2 *MSCs activadas.*

Las MSCs activadas poseen la capacidad de especializarse en respuesta a una demanda regenerativa, dando lugar a células hijas progenitoras esenciales para el mantenimiento y reparación de tejidos, e incluso, estas MSCs activadas tienen a su vez la capacidad de revertir a estados quiescentes una vez completada la reparación del tejido o proceso fisiológico (Visvader et al., 2016; Donnelly et al., 2018).

1.2.1.3 *Progenitores multipotentes mesenquimales.*

Los progenitores pueden migrar del nicho celular atraídos por quimiocinas, y pueden secretar factores tróficos e inmunorreguladores en respuesta a una lesión tisular (Lv et al., 2014; Huang et al., 2017; Donnelly et al., 2018; Jiang et al., 2021). Estas células que están algo más especializadas son activadas por factores específicos (Huang et al., 2017), y tienen la capacidad de diferenciarse en células maduras específicas de tejido (Donnelly et al., 2018) e, incluso, si aún mantienen su potencial de autorrenovación, pueden desdiferenciarse a células madre (Visvader et al., 2016).

1.2.1.4 *MSCs amplificadoras de tránsito.*

Las MSCs amplificadoras de tránsito son poblaciones intermedias entre las células madre y los progenitores que pueden coexistir en el nicho mesenquimal para conferir un grado más alto de flexibilidad. Se ha sugerido que no existe un diseño único de jerarquía para las células madre de tejido adulto, y que diferentes tejidos emplean estrategias distintas para satisfacer sus requisitos de autorrenovación y reparación (Visvader et al., 2016).

En la Figura 4 se representa un modelo general de organización jerárquica de las células madre específicas de tejido y progenitores celulares.

1.3 TIPOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN EL INDIVIDUO ADULTO.

1.3.1 Células madre mesenquimales pluripotentes: Células Muse.

Entre las MSCs adultas existe una pequeña población (~1%) con potencial pluripotente (Kuroda et al., 2010) denominada células Muse o Muse-MSCs (del inglés *multilineage differentiating stress enduring*). Estas células madre pluripotentes adultas son similares a las células madre pluripotenciales embrionarias y tienen la capacidad de generar células con las características de las tres capas germinales a partir de una sola célula (Kuroda et al., 2010; Heneidi et al., 2013), por lo que se amplía su potencial aplicación en terapia celular.

Las células Muse fueron descubiertas por Kuroda et al. (2010) entre la población MSC de médula ósea y entre la población defibroblastos dérmicos humanos y, posteriormente, se descubrieron en tejido adiposo (Heneidi et al., 2013). Las células Muse comprenden solo una pequeña población de MSCs; se ha establecido que su porcentaje en hBM-MSCs es 0,8 – 1% y en fibroblastos el 2 – 3% (Kuroda et al., 2010). Estas células pluripotentes se encuentran en un estado latente o inactivo, dentro del nicho celular, en circunstancias fisiológicas normales (Kuroda et al., 2010).

Estas células fueron denominadas Muse debido a que expresaban marcadores de pluripotencia y soportaban condiciones de estrés. Los análisis de expresión génica demostraron que las células Muse tienen un origen mesenquimal (Heneidi et al., 2013). Las poblaciones Muse obtenidas a partir de MSCs o fibroblastos son doblemente positivas para los marcadores SSEA-3 y el marcador mesenquimal CD105 (Kuroda et al., 2010; Wakao et al., 2011), siendo el antígeno SSEA-3 el marcador definitivo y de rutina para aislar las células Muse (Kuroda et al., 2010; Wakao et al., 2011; Ogura et al., 2014). (Wakao et al., 2011) Kuroda et al., 2010; Wakao et al., 2011; Ogura et al., 2014

Las células Muse muestran capacidad para a) autorrenovarse y expresar marcadores celulares pluripotentes (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*, *PAR-4*, *SSEA-3*) (Kuroda et al., 2010; Heneidi et al., 2013; Kuroda et al., 2013); b) crecer en suspensión formando esferas o como células adherentes formando agregados similares a cuerpos embrioides derivados de células madre embrionarias humanas (Kuroda et al., 2010; Heneidi et al., 2013); c) no producir teratomas en modelos animales *in vivo*, a diferencia de las células madre embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), ya que la actividad de proliferación de las células Muse no es muy alta (Kuroda et al., 2010; Heneidi et al., 2013) y presentan una actividad más baja de la telomerasa, un indicador de la actividad tumorigénica, en contraste con células madre embrionarias e iPSCs (Ogura et al., 2014); e) diferenciarse espontáneamente en células endodérmicas (hepatocitos y células biliares), mesodérmicas (adipocitos, condrocitos y osteocitos) y ectodérmicas (células neurales), tanto *in vitro* como *in vivo* (Kuroda et al., 2010; Heneidi et al., 2013). Debido a estas características, las células Muse pueden ser inducidas a diferenciación a cualquiera de las tres capas germinales, sin introducir genes exógenos (Kuroda et al., 2010) y con una alta eficiencia (Wakao et al., 2011; Ogura et al., 2014). Gracias a este potencial pluripotente que presentan, se han derivado de

ellas, además de las células somáticas anteriormente descritas, células endoteliales, queratinocitos y melanocitos (Wakao et al., 2011; Ogura et al., 2014; Wakao et al., 2018).

1.3.2 Células madre mesenquimales multipotentes.

Las MSCs son verdaderas células madre multipotentes, y no una suma de progenitores unipotentes (Bajpai et al., 2012; Mistriotis & Andreadis, 2013). Las MSCs exhiben una alta capacidad de autorrenovación y especialización, Las MSCs en cultivo mantienen el potencial multipotente y, bajo determinadas condiciones de inducción, tienen la capacidad de diferenciarse a los tres linajes mesodérmicos: osteogénico, condrogénico y adipogénico (Tabla 1), así como a otros linajes (Figura 5), tales como fibroblastos, miofibroblastos y células del músculo liso (Dennis & Charbord, 2002; Bianco, 2014; Caplan, 2017; Diaz-Flores et al., 2012).

Tabla 1. Factores de inducción empleados habitualmente para la diferenciación de MSCs a los diferentes linajes mesodérmicos.

Factores de inducción a linajes mesodérmicos	
Diferenciación adipogénica	Dexametasona 0,1 μ M; isobutil-metilxantina (IBMX) 0,5 mM; Insulina 10 μ g/ml; Indometacina 0,1 mM
Diferenciación osteogénica	Glicerol-2-fosfato 10 mM; dexametasona 0,1 μ M; ácido ascórbico 0,2 mM
Diferenciación condrogénica	Factor de crecimiento TGF- β 1 10 ng/ml; ITS (insulin, transferrin, sodium selenite) 1%; dexametasona 0,1 μ M; ácido ascórbico 50 μ M

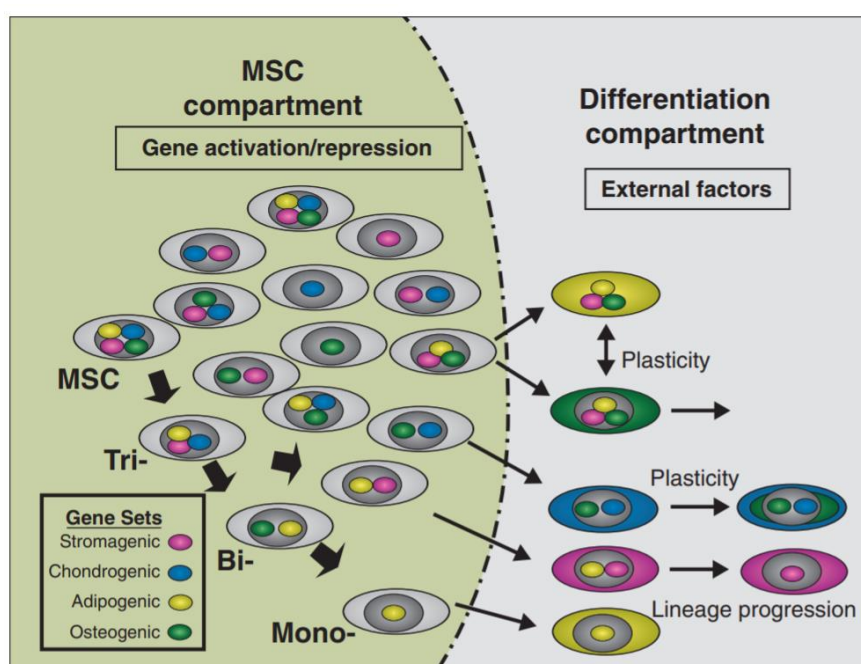


Figura 5. Modelo estocástico para MSCs de represión / inducción. La expresión de un “Gene Set” dentro de un núcleo indica el potencial para expresar ese fenotipo (estromal, condrogénico, adipogénico y osteogénico); mientras que los colores del citoplasma reflejan la expresión fenotípica de los diferentes linajes indicados en el “Gene Set”. Un citoplasma multicolorado indica un fenotipo intermedio. MSC (mesenchymal stem cell); “external factors” (factores que inducen la diferenciación; no indicados en la Figura). Imagen obtenida de Dennis & Charbord, (2002).

1.4 LOCALIZACIÓN DE LAS MSCs EN EL ORGANISMO ADULTO.

1.4.1 Nichos celulares.

Las MSCs se localizan en microambientes especializados denominados “nichos de células madre” (Visvader et al., 2016; Donnelly et al., 2018). Estos nichos celulares almacenan y mantienen las células madre y, a su vez, median en la respuesta equilibrada de las células madre a las necesidades de la homeostasis de los tejidos de los organismos (Lv et al., 2014; Donnelly et al., 2018), ya que proporcionan señales estructurales y funcionales que las células madre integran con redes de regulación intrínsecas para satisfacer las demandas fisiológicas de renovación celular (Donnelly et al., 2018).

Aunque la médula ósea es la fuente de MSCs más ampliamente conocida en adultos, se han identificado otros tejidos humanos adultos donde se encuentran células multipotentes, entre ellos tejido adiposo (Gimble et al., 2007; Eirin et al., 2012), pulpa dental (G. T. J. Huang et al., 2009) y ligamento periodontal (J. C. Park et al., 2011), membrana y el fluido sinoviales (Hermida-Gómez et al., 2011; Jones et al., 2004), sangre periférica (Tondreau et al., 2005), endometrio (Schwab et al., 2008), páncreas (Gallo et al., 2007; Seeberger et al., 2006) y folículo piloso (Hoogduijn et al., 2006; Liu et al., 2010; Pasolli et al., 2011; Bajpai et al., 2012; Zhang et al., 2013; Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018; Wang et al., 2020).

Además, las MSCs fuera de su nicho celular han llegado a aislarse de sangre menstrual (Patel et al., 2008) y orina (Zhang et al., 2008; Vado et al., 2021).

Además, existen MSCs en tejidos neonatales (Igura et al., 2004; Hass et al., 2011; Naji et al., 2019), entre ellos, placenta (Fukuchi et al., 2004; Miao et al., 2006) y cordón umbilical (Baksh et al., 2007) y sangre del cordón umbilical (Erices et al., 2000; Mareschi et al., 2001; Martin-Rendon et al., 2008; Sarugaser et al., 2005; Tondreau et al., 2005) cuya utilidad en enfermedades hematológicas es bien conocida y ha dado lugar a la creación de biobancos de este tejido.

2 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL FOLÍCULO PILOSO HUMANO DE LA REGIÓN OCCIPITAL DEL CUERO CABELLUDO.

2.1 INTERÉS DE LA OBTENCIÓN DE MSCs DEL FOLÍCULO PILOSO HUMANO (HHF-MSCs).

Se ha demostrado que los folículos pilosos influyen en la cicatrización de heridas, angiogénesis y neurogénesis, ya que albergan distintas poblaciones de células madre adultas y progenitores celulares (Biernaskie et al., 2009; Kiani et al., 2018; Mistriotis & Andreadis, 2013; Ripa et al., 2019).

El principal interés de emplear HF-MSCs en terapia celular radica en que el folículo piloso es una fuente fácilmente accesible de MSCs (Bajpai et al., 2012; Mistriotis & Andreadis, 2013) y con aplicaciones clínicas potenciales de amplio alcance.

La aplicación más común de las células de las hHF-MSCs es la bioingeniería para restaurar la pérdida de cabello debida a alopecia, que puede ser androgenética, ocasionada por una respuesta autoinmune o por un traumatismo severo. Si bien el trasplante de la unidad completa de folículo piloso es el método estándar para la restauración capilar, diversos estudios han puesto de evidencia que se puede estimular la regeneración del folículo piloso, e incluso inducir el desarrollo de nuevos folículos, mediante la implantación de células madre mesenquimales del folículo piloso (Jahoda et al., 1984; Lichti et al., 1993; McElwee et al., 2003; Yang & Cotsarelis, 2010; Mistriotis & Andreadis, 2013; Rendl et al., 2005). Esto tiene especial aplicación en alopecia severa, donde el número de folículos pilosos disponible no es suficiente para la restauración capilar, por lo que las células madre del folículo piloso podrían emplearse tras ser expandidas *in vitro* hasta alcanzar un número suficiente de células para la restauración de la zona dañada (<https://clinicaltrials.gov/>). A pesar de que cientos de estudios clínicos tratan esta alteración, la mayoría se centran en ensayos farmacológicos y solo el 16% emplean células madre. La procedencia de MSCs para el tratamiento de alopecia es en su mayoría de fuentes tales como tejido adiposo, sangre del cordón umbilical, epidermales y dérmicas, siendo el 0,3% del folículo piloso (<https://clinicaltrials.gov/>).

Además de la capacidad de regeneración de folículos pilosos, el potencial de las hHF-MSCs es alta, y por ello, presenta otras aplicaciones potenciales: a) regeneración vascular mediante injertos, gracias a su potencial de diferenciación miogénico; b) regeneración de tejidos óseo, cartilaginoso y adiposo; y c) regeneración de la piel (Mistriotis & Andreadis, 2013; Rippla et al., 2019).

Aunque en el organismo adulto se pueden localizar gran variedad de nichos de MSCs (apartado 1.4.1), existen diferencias *in vitro* en cuanto a capacidad de proliferación, inmunofenotipo, propiedades inmunomoduladoras, expresión génica y contenido del secretoma (Petrenko et al., 2020). No obstante, se han detectado factores neurotróficos/neuroprotectores en todos los secretomas de MSCs, independientemente de su fuente de procedencia en el organismo (Petrenko et al., 2020), lo que amplía el alcance terapéutico de las hHF-MSCs, ya que parecen tener un alto potencial neuroregenerativo.

Las hHF-MSCs han demostrado diversos beneficios en terapia celular frente al empleo de MSCs de otras fuentes de procedencia. Por un lado, las células madre mesenquimales, en concreto las localizadas en la papila dérmica, aunque intervienen en la cicatrización de heridas de una forma similar a los fibroblastos, demuestran un potencial anti-fibrótico gracias a la expresión de la familia de proteínas BMP, que reduce el riesgo de procesos fibróticos asociados con la cicatrización. Por otro lado, en terapia celular de heridas diabéticas, estas células madre mesenquimales evitan el efecto negativo del entorno diabético, en contraste con las MSCs de médula ósea y tejido adiposo. Asimismo, el uso de medio condicionado secretado por otra población mesenquimal localizada en la vaina dérmica en el tratamiento de heridas

diabéticas también contribuye a la formación de una capa de epidermis más desarrollada, en comparación con el efecto que ejercen las MSCs de la médula ósea (Rippa et al., 2019).

2.2 TIPOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL FOLÍCULO PILOSO DE LA REGIÓN OCCIPITAL.

El folículo piloso es un mini-órgano que se forma al inicio del desarrollo embrionario como resultado de interacciones ecto-mesodérmicas entre células epidérmicas y mesenquimales (Liu et al., 2010; Wang et al., 2020).

En la Figura 6-A se representa una unidad folicular, que puede estar formada por uno o más folículos pilosos. Alrededor de una unidad folicular se encuentra, rodeando al folículo, una vaina de fibrocolágeno (Anastassakis, 2022).

En la Figura 6-B se representan las estructuras generales que componen el folículo piloso.

El folículo piloso consta de un compartimento epitelial y un compartimento mesenquimal (Rippa et al., 2019; Sun et al., 2020), cuya interacción juega un papel primordial en la morfogénesis y el crecimiento del mismo (Cotsarelis, 2006; Millar, 2002; Rendl et al., 2005; Yang & Cotsarelis, 2010), interviniendo en el tamaño del bulbo capilar, longitud y diámetro del tallo del cabello y la duración de la fase anágena del ciclo de crecimiento del pelo (Schneider et al., 2009). En la Figura 6-C se representan los dos compartimentos del folículo piloso.

El compartimento epitelial está formado por el bulge, la matriz, la vaina radicular interna, la vaina radicular externa y el tallo del bulbo (Schneider et al., 2009; Morgan, 2014; Kiani et al., 2018; Wang et al., 2020). El bulbo piloso es parte terminal del folículo piloso y se localiza en el tejido adiposo subcutáneo (Messenger et al., 2010).

El compartimento mesenquimal está formado por la papila dérmica (cavidad central del bulbo piloso situada en la base del folículo), la vaina dérmica y la región peribulbar (Figura 6-D). En la Figura se representa a su vez la matriz, que forma parte del compartimento epitelial y recubren la papila dérmica. Las células de la matriz se multiplican para formar la raíz del pelo.

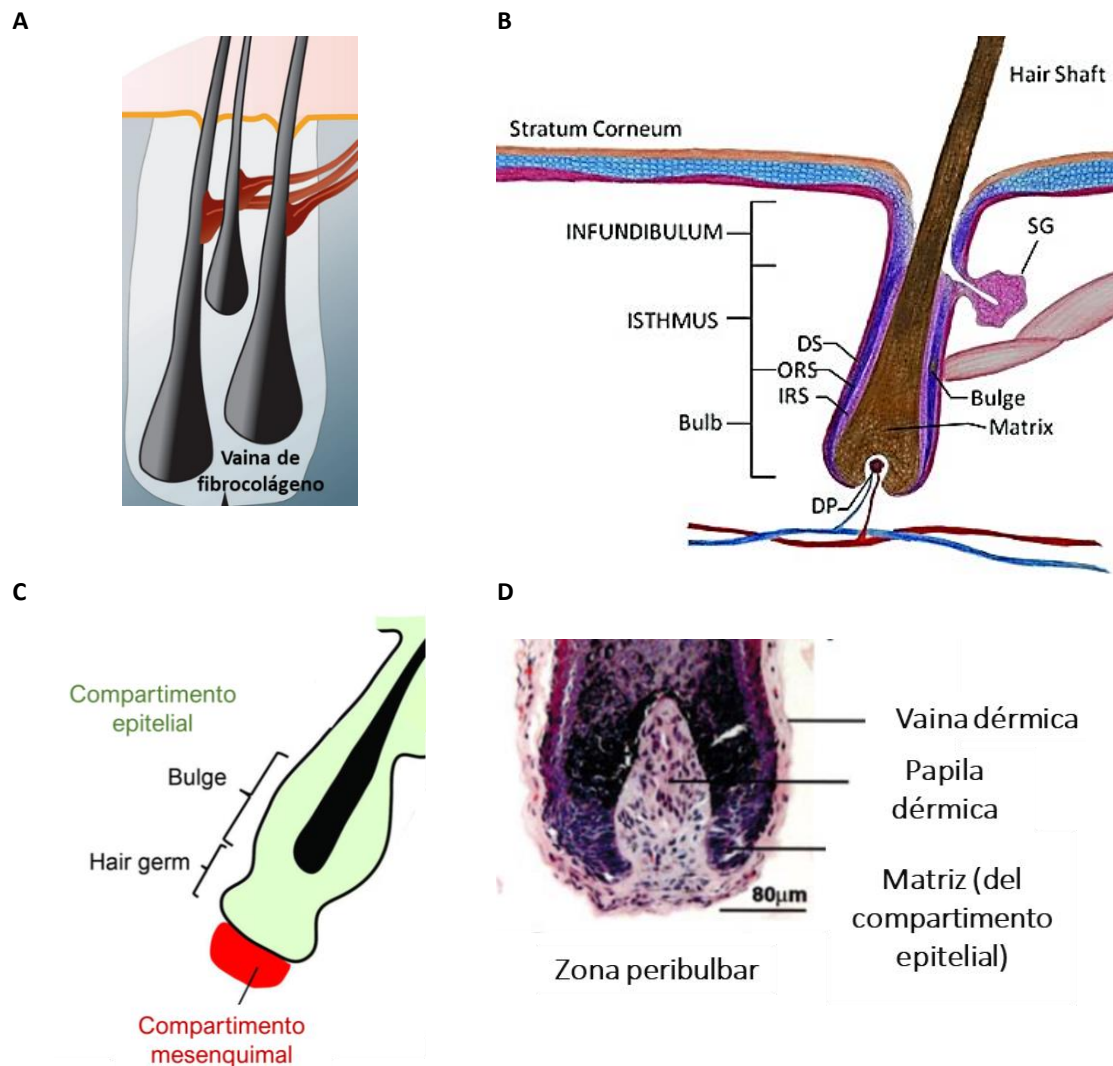


Figura 6. Folículo piloso humano. A) Unidad folicular con varios folículos pilosos y la vaina de fibrocolágeno que rodea la unidad folicular. Imagen obtenida de Anastassakis, (2022); B) Estructura general del folículo piloso. Imagen obtenida de Mistriotis & Andreadis (2013); C) Compartimento epitelial (verde) y mesenquimal (rojo) del folículo piloso. Imagen modificada de Rompolas & Greco (2014); D) Compartimento mesenquimal teñido con hematoxilina-eosina: formado por la papila dérmica, la vaina dérmica y la zona peribulbar; la matriz forma parte del compartimento epitelial. Imagen obtenida de Millar (2002). DP (papila dérmica); DS (vaina dérmica); ORS (vaina radicular externa); IRS (vaina radicular interna); SG (glándula sebácea).

2.2.1 Células del compartimento mesenquimal del folículo piloso.

Las células del compartimento mesenquimal del folículo piloso se conocen como células madre mesenquimales (hHF-MSCs). Esta población está representada por las células madre de la zona peribulbar (conocidas como células madre dérmicas), las células de la papila dérmica y las de la vaina dérmica del folículo piloso (Jahoda & Reynolds, 2001; Jahoda et al., 2003; Hoogduijn et al., 2006; Liu et al., 2010; Pasolli et al., 2011; Bajpai et al., 2012; Zhang et al., 2013; Rahmani et al., 2014; Agabalyan et al., 2017; Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018; B. Wang et al., 2020).

Las células madre mesenquimales del folículo piloso pueden estimular la regeneración del folículo piloso, e incluso inducir el desarrollo de nuevos folículos, mediante la implantación de células de la papila dérmica

y de la zona peribulbar de la vaina dérmica (Jahoda et al., 1984; Lichti et al., 1993; McElwee et al., 2003; Rendl et al., 2005; Yang & Cotsarelis, 2010; Mistriotis & Andreadis, 2013).

El folículo piloso se forma al inicio del desarrollo embrionario. Estudios en ratón han evidenciado que las células madre mesenquimales del folículo piloso tienen su origen en un precursor mesenquimal común del que se origina un progenitor embrionario de fibroblastos que origina, durante el desarrollo embrionario, las células madre dérmicas, las células de la papila dérmica y las células de la vaina dérmica, así como los fibroblastos de la dermis (Driskell et al., 2013; Driskell & Watt, 2015; Agabalyan et al., 2017; Rippa et al., 2019).

No obstante, tras el nacimiento del individuo, las células madre repueblan el compartimento mesenquimal durante la fase anágena del crecimiento del cabello (fase de crecimiento del cabello), tal y como se describe a continuación.

2.2.1.1 Células madre dérmicas.

Las células madre dérmicas son células madre bipotentes que tienen un origen embrionario y constituyen un reservorio de las células de la papila dérmica y de la vaina dérmica (McElwee et al., 2003; Tobin et al., 2003; Rahmani et al., 2014; Agabalyan et al., 2017) y contribuyen además a la reposición de las células de la vaina dérmica (McElwee et al., 2003; Rahmani et al., 2014; Agabalyan et al., 2017). En la Figura 7 puede observarse cómo, en la fase anágena del crecimiento del pelo, las células madre dérmicas (hfDSCs) repueblan la papila dérmica y la vaina dérmica.

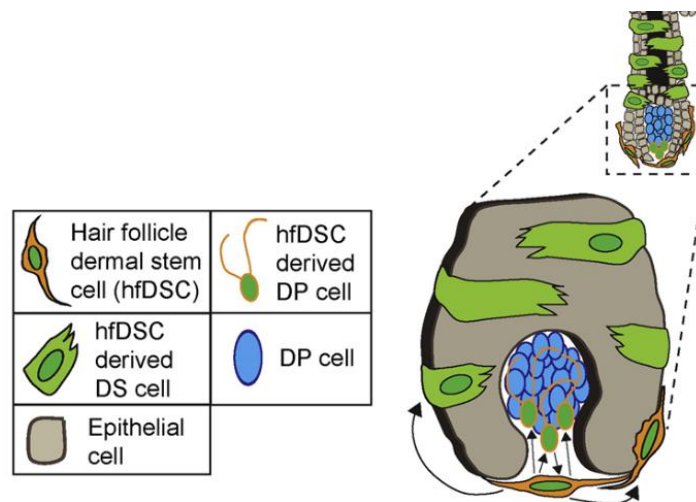


Figura 7. hHF-MSCs del compartimento mesenquimal de un folículo piloso de ratón en fase anágena: hfDSC (células madre de la región peribulbar; DSCs); DP (células de la papila dérmica en azul; células de la papila dérmica originadas por las células DSCs se representan en verde junto a las azules); DS (células de la vaina dérmica originadas por las células DSCs). Imagen obtenida de Rahmani et al. (2014) (10.1016/j.devcel.2014.10.022).

Como puede observarse en la Figura 7, estas células madre se localizan en la región peribulbar del folículo piloso. No obstante, debido a que la vaina dérmica del folículo piloso humano contiene varias capas, a

diferencia de la vaina dérmica de ratón, también se sugiere la existencia de estas células madre dérmicas humanas en la vaina dérmica (Agabalyan et al., 2017).

El potencial clínico de Las células madre dérmicas reside en su capacidad para ser expandidas *in vitro* manteniendo su potencial para generar subtipos celulares mesenquimales y dérmicos (Agabalyan et al., 2017).

2.2.1.2 Células de la papila dérmica.

Las células de la papila dérmica también se originan durante el desarrollo embrionario, al igual que las células madre dérmicas y, dependiendo de la ubicación del folículo piloso en el organismo, pueden tener su origen en la cresta neural, el mesodermo de la placa lateral o el dermomiótomo (Cappellesso-Fleury et al., 2010; Driskell et al., 2011; Sriram et al., 2015). Los folículos pilosos humanos de la región occipital del cuero cabelludo tienen un origen en el mesodermo (Agabalyan et al., 2017; Dupin & Sommer, 2012; Ge et al., 2016; Takashima et al., 2007).

Tras el nacimiento, la papila dérmica se mantiene intacta durante las diferentes fases del ciclo del cabello (Driskell et al., 2011). Sin embargo, en la fase anágena, el número de células en la papila dérmica aumenta gracias a la reposición por parte de las células madre dérmicas de la región peribulbar (Agabalyan et al., 2017; Colin A.B. Jahoda et al., 2003; McElwee et al., 2003; Rahmani et al., 2014) Tobin et al., 2003; Rompolas & Greco, 2014; En la Figura 7 estas nuevas células de la papila dérmica se representan de color verde dentro de la papila dérmica, mientras que las células de la papila dérmica originadas durante el desarrollo embrionario se representan de color azul.

Agabalyan et al. (2017) sugirieron que las células de la papila dérmica originadas durante el desarrollo embrionario y las originadas por las células madre dérmicas de la región peribulbar son equivalentes.

Las células de la papila dérmica permanecen en estado quiescente y se activan en respuesta a un daño tisular (Agabalyan et al., 2017; Colin A.B. Jahoda & Reynolds, 2001). Sin embargo, exhiben un potencial de autorrenovación limitado con el aumento en la edad del individuo, debido a un aumento de la senescencia celular (Agabalyan et al., 2017). Las células de la papila dérmica también se conocen como precursores celulares de la piel (SKPs).

Aunque los SKPs tengan un origen mesodérmico, son similares funcionalmente a los SKPs derivados de la cresta neural cuando se cultivan *in vitro* (Jinno et al., 2010; Dupin et al., 2012) y muestran potencial de diferenciación neuronal (Agabalyan et al., 2017; Jinno et al., 2010).

2.2.1.3 Células de la vaina dérmica.

Al igual que las células de la papila dérmica, las células de la vaina dérmica de folículos pilosos de la región occipital del cuero cabelludo proceden del mesodermo y se forman durante el desarrollo embrionario (Sadler, 2012; Driskell et al., 2013; Noden & Trainor, 2005; Vapniarsky et al., 2015).

Tras el nacimiento, y durante la fase anágena del crecimiento del pelo, las células madre dérmicas originan nuevas células de la vaina dérmica (McElwee et al., 2003; Rahmani et al., 2014; Agabalyan et al., 2017), tal y como se ha mencionado anteriormente.

En la Figura 7 se representan las células de la vaina dérmica y su reposición a partir de las células madre DSCs de la región peribulbar del folículo piloso.

Asimismo, se ha descrito la presencia de células mesenquimales más comprometidas en la capa intermedia de fibras de colágeno de la vaina dérmica del folículo piloso (Ge et al., 2016; M. Ito & Sato, 1990).

2.2.2 Otros tipos celulares del folículo piloso y tejido circundante que pueden proliferar en cultivo.

El folículo piloso está formado por un compartimento mesenquimal, tal y como se ha puntualizado anteriormente, y un compartimento epitelial (Figura 7-C). En dicho compartimento se localiza un nicho de células madre ectomesenquimales llamado bulge.

2.2.2.1 Células madre/progenitores del compartimento epitelial del folículo piloso.

2.2.2.1.1 Células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural (SDSCs).

Diversos estudios independientes han aislado, a partir del bulge, de la dermis interfolicular y del tejido adiposo, una población de células madre heterogénea y multipotente que se deriva de la cresta neural y que posee la capacidad de proliferar en cultivos en suspensión formando esferas de agregados celulares o neuroesferas (Budel & Djabali, 2017; Ge et al., 2016; Jinno et al., 2010; Soma et al., 2013; B. Wang et al., 2020; C. E. Wong et al., 2006). A estas células generadas *in vitro* se les ha denominado células madre derivadas de la piel (SDSCs) (Ge et al., 2016).

Las células madre del bulge han sido denominadas SDSCs, del inglés *skin derived stem cells*.

En folículos pilosos de la región occipital del cuero cabelludo, las SDSCs solo están presentes en el bulge (Agabalyan et al., 2017). Sin embargo, en folículos pilosos con origen embrionario en la cresta neural, que no están ubicados en la región occipital, contienen al menos tres tipos de SDSCs (Ge et al., 2016): a) células madre derivadas de la cresta neural epidérmicas (Epi-NCSCs), generadas *in vitro* a partir de las células del bulge (Ge et al., 2016; Sieber-Blum et al., 2004; B. Wang et al., 2020) y vaina de la raíz externa desde el

bulge hasta la matriz en la base del folículo piloso (Sieber-Blum et al., 2004; Jinno et al., 2010); b) células madre derivadas de la cresta neural (NCSCs), procedentes de células de la vaina dérmica (Biernaskie et al., 2009; Ge et al., 2016); y c) precursores celulares de la piel (SKPs), también denominadas NCSCs y obtenidas a partir de células de la papila dérmica (Biernaskie et al., 2009; Fernandes et al., 2004; Ge et al., 2016).).

En la Figura 8 se representa la localización de las SDSCs en el folículo piloso.

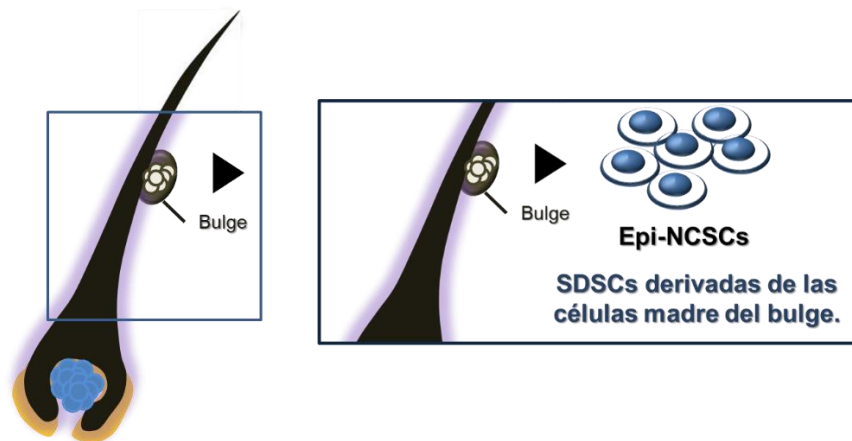


Figura 8. Localización de las células madre derivadas de la piel (Epi-NCSCs o SDSCs) en el folículo piloso humano con origen mesodérmico.

La existencia de hSDSCs en el bulge fue descubierta por Sieber-Blum et al. (2004), quienes denominaron originalmente a estas células como células madre epidérmicas derivadas de la cresta neural (Epi-NCSCs). Simultáneamente, Fernandes et al. (2004) identificaron en la papila dérmica este mismo tipo celular al que denominaron precursores derivados de la piel (SKPs) y demostraron su origen de cresta neural. Posteriormente se demostró que las SDSCs contribuyen al mantenimiento dérmico, curación de heridas y morfogénesis del folículo piloso (Biernaskie et al., 2009; Oshima et al., 2001; Taylor et al., 2000). Asimismo, las SDSCs de la papila y vaina dérmicas orquestan la regeneración y reparación de tejidos dérmicos tras una lesión o enfermedad (V. W. Wong et al., 2012).

La subdivisión de las SDSCs en tres tipos celulares se realizó, entre otras características, en base a la expresión génica de diversos marcadores (Ge et al., 2016). Las SDSCs, además de expresar los marcadores de superficie mesenquimales CD73, CD90 y CD105, expresan marcadores de la cresta neural SOX10, P75 (CD271), NESTIN, SOX2 y CD349 (Biernaskie et al., 2009; Driskell et al., 2011; Ge et al., 2016; R. G. Vasylyev et al., 2017).

Las células SOX2⁺ permanecen principalmente en la papila dérmica del folículo piloso y son, probablemente, progenitores mesenquimales embrionarios multipotentes que persisten en el adulto (Biernaskie et al., 2009; Driskell et al., 2011; Ge et al., 2016), considerándose células madre embrionarias transitorias (Biernaskie et al., 2009; Ge et al., 2016), debido a la expresión de este marcador de

pluripotencia. Estas poblaciones celulares SOX2+ pueden ser el origen de los SKPs obtenidos *in vitro* (Fernandes et al., 2004; Rendl et al., 2005; Driskell et al., 2013), ya que se ha evidenciado que cuando ambas poblaciones son transplantadas inducen la morfogénesis y el anidamiento (Ge et al., 2016).

En cuanto a los tejidos circundantes al folículo piloso, se ha demostrado también la presencia de hSDSCs en la dermis interfolicular (Hu et al., 2018; Jinno et al., 2010; Toma et al., 2001, 2005; R. G. Vasyliov et al., 2017; C. E. Wong et al., 2006) y en el tejido adiposo (Sowa et al., 2013), compartiendo nicho con las MSCs del tejido adiposo (Sowa et al., 2013).

2.2.2.1.2 Células madre melanocíticas (MelSCs).

Las células madre melanocíticas se localizan en la porción inferior del bulge (Delfino-Machín et al., 2007; Chou et al., 2013; Zhou et al., 2019; Wang et al., 2020) y expresan el marcador de superficie CD34 (Ge et al., 2016; Ali et al., 2018;). Cuando estas células se activan con el ciclo de regeneración capilar para formar melanocitos, se diferencian en primer lugar en células melanocíticas transitorias y muestran expresión de CD117/cKIT (Mull et al., 2015; Nishimura et al., 2002). Estas células transitorias, junto con los melanocitos, se han encontrado en la matriz capilar (Nishimura et al., 2002; Mull et al., 2015). Asimismo, se han descubierto melanocitos en el compartimento epitelial por encima de la papila dérmica (Rendl et al., 2005). Las células madre melanocíticas son amelanóticas y forman colonias celulares con una forma esférica en el cultivo primario, aunque la morfología predominante muestra células fusiformes pero, en contraste con las MSCs, presenta múltiples protuberancias cuando alcanza el pase 4 (Zhou et al., 2019). Sería beneficioso aislar este tipo de célula madre para estudiar más a fondo su función en los trastornos pigmentarios. Sin embargo, debido a la falta de marcadores de superficie molecular específicos, esto aún no se ha logrado su aislamiento con éxito de los folículos del cabello humano (Zhou et al., 2019).

2.2.2.1.3 Células madre epiteliales no derivadas de la cresta neural (EpSCs) y telocitos.

Los telocitos y las células madre epiteliales no derivadas de la cresta neural (EpSCs) tienen la capacidad de proliferar en el medio de cultivo de las hHF-MSCs. No obstante, estos tipos celulares muestran algunas diferencias con las hHF-MSCs.

Los telocitos están presentes en el bulge del folículo piloso (Ceafalan et al., 2012; Manole & Simionescu, 2016) y en la dermis alrededor del folículo piloso y de los vasos sanguíneos (Ceafalan et al., 2012; Haydont et al., 2020; Rusu et al., 2012). Los telocitos demuestran adherencia a la superficie del frasco de cultivo y proliferan bajo los medios de cultivo habituales para MSCs (Y. Kang et al., 2015; Zheng et al., 2013). Sin embargo, presentan una morfología fibroblástica atípica, caracterizada por unas prolongaciones celulares largas y delgadas denominadas telópodos (Rusu et al., 2012).

El análisis del transcriptoma ha demostrado que los telocitos, los fibroblastos y las MSCs son poblaciones diferentes (Zheng et al., 2013). Asimismo, se ha evidenciado que los telocitos no expresan el marcador

mesenquimal CD90 (Ceafalan et al., 2012; Sanches et al., 2020) y que pueden dividirse en dos subpoblaciones: CD117+ y CD34+ (Ceafalan et al., 2012). La población CD34+ puede contener a su vez telocitos CD117+ (Sanches et al., 2020). Los telocitos sirven como dispositivos de conexión entre células para la transmisión de señales (Haydont et al., 2020). Se ha sugerido, tras el análisis de su transcriptoma, que los telocitos tienen funciones biológicas específicas en el desarrollo y la morfogénesis tisular, el transporte de compuestos biológicos, la remodelación de la matriz extracelular y desempeñan un papel fundamental en la angiogénesis (Zheng et al., 2013). Del mismo modo, el análisis del agrupamiento jerárquico de los genes expresados diferencialmente entre telocitos, MSCs y fibroblastos, sugiere que los telocitos son predecesores de los fibroblastos y las MSCs (Zheng et al., 2013).

Las células madre epiteliales no derivadas de la cresta neural (EpSCs) son células progenitoras de queratinocitos (Delfino-Machín et al., 2007; Raghuram et al., 2020; Xiong et al., 2016) que se localizan en el bulge del folículo piloso (Raghuram et al., 2020; Rendl et al., 2005; B. Wang et al., 2020) y expresan el antígeno de superficie CD34 (Mitrofanova et al., 2020; Rendl et al., 2005; Sanches et al., 2020; Tumber et al., 2004; Wakao et al., 2011, 2018; Waters et al., 2007). Al poseer la capacidad de proliferar con los medios de cultivo habituales para MSCs (Ponce et al., 2017; Xiong et al., 2016), la población aislada a partir de explantes de folículo piloso, también podría contener estos progenitores epiteliales y sus queratinocitos derivados; sin embargo, su morfología es poligonal (Carriel et al., 2011; Ponce et al., 2017) y no muestran expresión de los marcadores de superficie mesenquimales CD73 y CD90 (Xiong et al., 2016).

2.2.2.1 Fibroblastos dérmicos del tejido circundante al folículo piloso.

Los fibroblastos son células más abundantes de la dermis (Rippa et al., 2019) y juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la forma y función de la piel. Su pérdida o deterioro funcional se debe principalmente al envejecimiento o a lesión (Mao et al., 2015).

Esta población celular puede proliferar en cultivo junto a las MSCs del folículo piloso. En la Figura 9 se representa la localización de los distintos tipos de fibroblastos dérmicos: a) fibroblastos Fp de la dermis papilar, b) fibroblastos Fr, localizados en la dermis reticular, y c) fibroblastos F-DHJ situados en la unión dermo-hipodermal (Harper & Grove, 1979; Haydont et al., 2020; Rippa et al., 2019; Sriram et al., 2015).

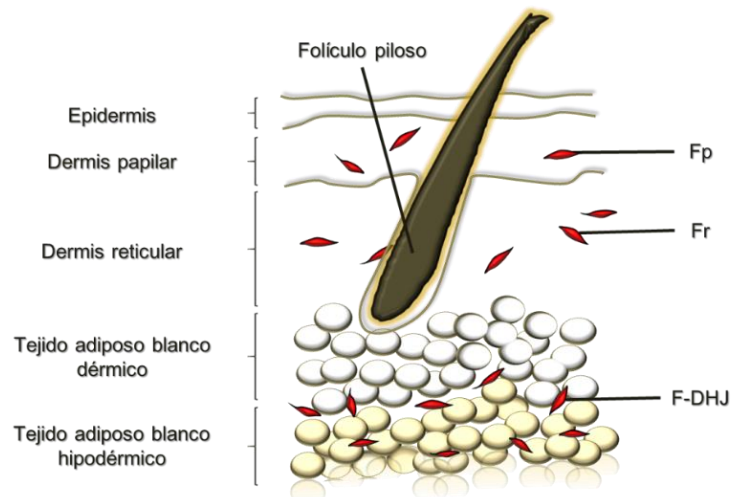


Figura 9. Modelo esquemático de la localización de los fibroblastos dérmicos en el tejido circundante al folículo piloso. La dermis humana contiene las subpoblaciones de fibroblastos: Fp (fibroblastos papilares), Fr (fibroblastos reticulares) y F-DHJ (fibroblastos de la unión dermo-hipodérmica).

Las MSCs del folículo piloso y los fibroblastos no pueden distinguirse según los criterios propuestos por la International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) (Dominici et al., 2006), ya que: a) son capaces de adherirse a la superficie sin revestimiento del frasco de cultivo y proliferar en un medio de cultivo propio de MSCs (Kang et al., 2011; Denu et al., 2016; Budel & Djabali, 2017); b) expresan un inmunofenotipo típicamente mesenquimal (Blasi et al., 2011; Lorenz et al., 2008; Denu et al., 2016); c) muestran potencial de diferenciación a linajes mesodérmicos (Lorenz et al., 2008; Junker et al., 2010; Blasi et al., 2011; Denu et al., 2016; Haydont et al., 2020); y d) poseen funciones inmunoregulatoras similares a MSCs (Haniffa et al., 2007; Jiang et al., 2005). Sin embargo, aunque ambas poblaciones presentan una morfología similar (Haniffa et al., 2009; Blasi et al., 2011; Lv et al., 2014; Denu et al., 2016), diversos estudios han observado diferencias entre ambas poblaciones (apartado 2.4).

Más recientemente, se ha confirmado que las MSCs y los fibroblastos dérmicos son poblaciones celulares diferentes (Figura 10-A), en base al análisis de su transcriptoma (Zheng et al., 2013; Haydont et al., 2020). Los F-DHJ exhiben una capacidad eficiente, y mayor que el resto de fibroblastos dérmicos, para diferenciarse a los tres linajes mesodérmicos (Haydont et al., 2020), lo que podría interpretarse como una identidad MSC, considerando su proximidad anatómica con las MSCs del tejido adiposo. Sin embargo, el análisis del transcriptoma mostró una baja proximidad entre los fibroblastos F-DHJ y las MSCs del tejido adiposo (93,83% de similitud). Por otro lado, las poblaciones de fibroblastos dérmicos están muy asociadas entre sí, lo que pone de manifiesto la evidencia de una alta proximidad entre los fibroblastos F-DHJ y los Fr (96,89% de similitud) (Figura 10-B).

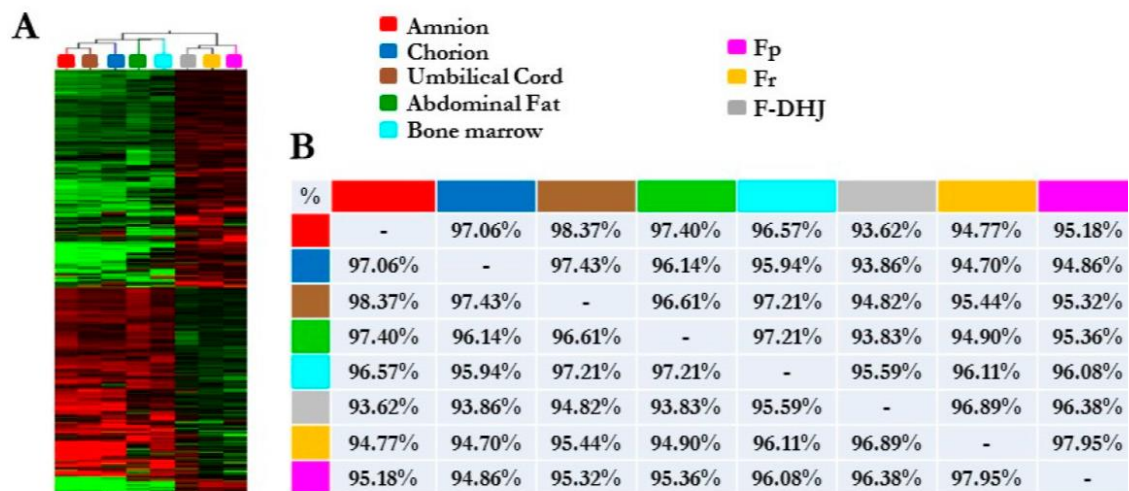


Figura 10. Comparación de transcriptomas de las tres poblaciones de fibroblastos dérmicos (Fp, Fr y F-DHJ) y MSCs provenientes de médula ósea, tejido adiposo, amnios, corion y cordón umbilical. (A) Agrupación jerárquica de muestras de fibroblastos y MSCs basadas en los 380 conjuntos de sondas más discriminantes que muestran una marcada distinción entre los grupos "fibroblasto" y "MSC". (B) Coeficientes de correlación de Pearson que evalúan la proximidad muestra a muestra basándose en comparaciones de perfiles de transcriptomas globales. Fp (fibroblastos papilares), Fr (fibroblastos reticulares) y F-DHJ (fibroblastos de la unión dermo-hipodermal). Gráficos obtenidos de Haydont et al. (2020).

2.2.2.2 Pericitos, MSCs perivasculares y de tejido adiposo dérmico blanco.

Los pericitos o células perivasculares se localizan en la superficie abluminal de las células endoteliales en la microvasculatura (Bianco et al., 2008; Lv et al., 2014). En la dermis se ha demostrado la presencia de pericitos (Crisan et al., 2008; da Silva et al., 2008; Paquet-Fifield et al., 2009), predominantemente alrededor de los folículos pilosos (Wong et al., 2012; Yamanishi et al., 2012). Estas células perivasculares contribuyen al mantenimiento de la integridad de los vasos capilares y pueden intervenir en la homeostasis de los tejidos mesenquimales y cicatrización de heridas (Mills et al., 2013); así como promover la regeneración de la piel mediante la regulación de la activación de los precursores de queratinocitos epidermales (Zhuang et al., 2018).

Los pericitos muestran similitudes con las MSCs en su fenotipo, transcriptoma y potencial de diferenciación a linajes mesodérmicos (Doherty & Canfield, 1999; Brachvogel et al., 2005; Covas et al., 2008; Crisan et al., 2008; Paquet-Fifield et al., 2009; Diaz-Flores et al., 2012; Yamanishi et al., 2012; Zimmerlin et al., 2013; Lv et al., 2014; Haydont et al., 2020). A su vez, los pericitos pueden diferenciarse en fibroblastos, miofibroblastos y células de músculo liso *in vivo* e *in vitro* (Doherty & Canfield, 1999; Díaz-Flores et al., 2012). Sin embargo, aunque las hHF-MSCs y los pericitos no puedan ser distinguidos mediante los criterios mínimos propuestos por la ISCT, diversos estudios han mostrado diferencias entre ambas poblaciones (apartado 2.4.3).

Existe la hipótesis de que las MSCs residen en todo el organismo como pericitos y que la zona perivascular es el nicho *in vivo* de las MSCs (Brachvogel et al., 2005; Bianco et al., 2008; da Silva et al., 2008; Caplan et

al., 2008; Crisan et al., 2008; Díaz-Flores et al., 2012; Yamanishi et al., 2012; Bianco et al., 2014; Lv et al., 2014; Caplan, 2017).

El marcador CD146 se expresa en MSCs procedentes de varios tejidos y en pericitos, pero no en fibroblastos dérmicos; mientras que el marcador de fibroblastos S100A4/FSP-1 muestra una baja expresión en MSCs y pericitos (Covas et al., 2008; Mitrofanova et al., 2020), lo que respalda una asociación más estrecha de las MSCs con los pericitos. Asimismo, al igual que las MSCs, los pericitos pueden liberarse fácilmente de su nicho cuando se dañan los tejidos, y secretar factores tróficos e inmunorreguladores (Lv et al., 2014). En cuanto al origen embrionario, se ha demostrado que la mayoría de los pericitos derivan del mesodermo, al igual que las MSCs, aunque algunos también pueden derivarse de la cresta neural (Mills et al., 2013).

Yamanishi et al. (2012) sugirieron que las zonas perivasculares dérmicas actúan como un nicho de MSCs CD34+ en la dermis del cuero cabelludo, tras el descubrimiento de una subpoblación de pericitos CD34+ altamente proliferativa (Zimmerlin et al., 2013) y la evidencia de una población de MSCs CD34+ localizada en nichos perivasculares dérmicos del cuero cabelludo humano y de forma abundante alrededor del folículo piloso (Yamanishi et al., 2012). Además, se ha evidenciado que las MSCs del tejido adiposo residen en la región perivascular como células CD34+ (da Silva et al., 2008; Zimmerlin et al., 2013). Por todo lo anterior, se ha sugerido que la subpoblación de pericitos CD34+ son progenitores de tránsito de las MSCs (Zimmerlin et al., 2013).

El origen perivascular de las MSCs probablemente sea la razón por la que las MSCs se encuentran en diferentes ubicaciones anatómicas (Donnelly et al., 2018). Se ha observado que los vasos sanguíneos son la única estructura anatómica común en la mayoría de los tejidos sólidos donde se han encontrado MSCs, lo que respalda el nicho perivascular de las MSCs (Lv et al., 2014). De acuerdo con esta observación, el mesénquima actúa como un “relleno de espacio” antes del desarrollo de un sistema vascular en el desarrollo temprano de la rama embrionaria (Risau & Flamme, 1995).

Sin embargo, la teoría del “nicho perivascular” de las MSCs no puede explicar por qué se detectan MSCs en tejidos avasculares, como en el cartílago articular (Pretzel et al., 2011) y el núcleo pulposo (Huang et al., 2013). Otra hipótesis es que las MSCs pueden tener también otro origen distinto al nicho perivascular, como se describe en el origen dual de los odontoblastos en los dientes mediante el rastreo del linaje genético (Feng et al., 2011; Lv et al., 2014). Esta postulación de un origen no pericítico de las MSCs también está respaldada por el hecho de que un subconjunto de MSCs con mayor potencial *stem*, no expresan el marcador de superficie CD146 (Lv et al., 2014; Wakao et al., 2011).

2.3 METODOLOGÍAS PARA EL AISLAMIENTO DE LAS HHF-MSCs.

Se han desarrollado diferentes protocolos experimentales para aislar las hHF-MSCs. El método para el aislamiento más eficaz es la microdissección de la papila dérmica, de la vaina dérmica o de la región

peribulbar del folículo piloso, pero este proceso requiere equipamiento específico, experiencia y es laborioso (Ma et al., 2019; Mistriotis & Andreadis, 2013; Wang et al., 2020).

Otro método consiste en el empleo de una combinación de enzimas dispasa y colagenasa D. Para conseguir el aislamiento de la papila dérmica, en primer lugar, se eliminan los restos de tejido adiposo con dispasa y, posteriormente, la colagenasa D digiere la dermis circundante al folículo piloso y la vaina dérmica del folículo (Mistriotis & Andreadis, 2013). En el caso del aislamiento de la vaina dérmica, se emplea una mezcla de estas enzimas para separar la vaina dérmica del folículo piloso (Ma et al., 2019; Wang et al., 2020). Tras la digestión enzimática, los fibroblastos dérmicos remanentes pueden ser eliminados del sobrenadante tras una serie de centrifugaciones a baja velocidad (Wu et al., 2005). Aunque la digestión enzimática es un método más sencillo que la microdissección, puede dar lugar a posibles variaciones en los tipos celulares obtenidos tras cada aislamiento.

Una vez que las células son separadas del explante de folículo piloso, las muestras se cultivan con medio basal DMEM suplementado con suero para permitir la migración celular a la superficie de cultivo. Cuando las células alcanzan la confluencia, se realiza el primer pase empleando las técnicas estándar de cultivo (Wang et al., 2020).

Otro método es utilizar folículos pilosos completos extraídos directamente de la región occipital del cuero cabelludo (Bai et al., 2017; Y. Wang et al., 2013); sin embargo, este procedimiento proporciona una población heterogénea de MSCs.

En este trabajo se ha llevado a cabo una metodología sencilla que favorece la migración, el aislamiento y el enriquecimiento de las hHF-MSCs a partir de explantes de folículo piloso que fueron recibidos con una microdissección manual previa para retirar gran parte de la dermis y tejido adiposo del bulbo piloso. A pesar de que el enriquecimiento de esta población hasta los pases 3 y 4 para conseguir una población más homogénea, y apta para futuros propósitos terapéuticos, otras poblaciones celulares, distintas a MSCs, pueden proliferar en cultivo junto a estas, por lo que, si se desea retirar de la población hHF-MSC otras poblaciones, aunque se encuentren en pequeña proporción, en este trabajo recomendamos la realización de determinados *sorting*, según la población que se desee eliminar (apartado 2.5.1).

2.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS hHF-MSCs DE LA REGIÓN OCCIPITAL.

2.4.1 Comparación fenotípica, según los criterios mínimos propuestos por la ISCT, de las hHF-MSCs con otros tipos celulares que pueden proliferar con ellas en cultivo.

La International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) estableció unos criterios mínimos que deben cumplir las células para poder ser identificadas como MSCs (Dominici et al., 2006). En primer lugar, las células deben ser adherentes a la superficie sin recubrimiento del frasco de cultivo cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar, utilizando frascos de cultivo de tejidos con superficies sin revestimiento. En segundo lugar, la población MSC debe expresar ($\geq 95\%$) los antígenos de superficie

CD105, CD73 y CD90, medidos por citometría de flujo. Además, estas células deben carecer de expresión ($\leq 2\%$ positivas) de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA clase II. Por último, las células deben mostrar potencial de diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Con la finalidad de facilitar la comparación del fenotipo entre las hHF-MSCs del folículo piloso de la zona occipital y otras poblaciones celulares que pueden aislarse y proliferar junto a las hHF-MSCs se ha llevado a cabo un resumen de las semejanzas y diferencias en el fenotipo de las diferentes poblaciones en cultivo, según la caracterización recomendada por la ISCT (Dominici et al., 2006), y que presentamos en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de los tipos celulares que pueden aislarse del explante de folículo piloso humano (región occipital del cuero cabelludo) y proliferar junto con las hHF-MSCs. En la tabla se indica su localización, capacidad de adherencia a la superficie del frasco de cultivo, morfología, coexpresión de los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105; así como su potencial de diferenciación en adipocitos, osteocitos y condrocitos. (*) Para su adhesión requiere del recubrimiento de la superficie plástica de cultivo con colágeno, poli-L-lisina o fibrinógeno. hHF-MSCs (MSCs de folículo piloso humano); DS (células de la vaina dérmica); Fp (fibroblastos de la dermis papilar); Fr (fibroblastos de la dermis reticular); F-DHJ (fibroblastos de la unión dermo-hipodermal); SDSCs (células madre de la piel derivadas de la cresta neural); EpSCs (células madre epiteliales no derivadas de la cresta neural); ND (no descrito en artículos revisados).

Poblaciones celulares humanas	Localización	Adhesión	Morfología similar a fibroblasto	Coexpresión CD73/CD90/CD105	Diferenciación a linajes mesodérmicos	Referencias bibliográficas
HF-MSCs	Folículo piloso: papila dérmica, vaina dérmica y zona peribulbar.	+	+ DS: morfología miofibroblasto; alargadas y dendríticas; DP: poligonal aplanada (no compacta)	+	+	Hoogduijn et al. (2006); Liu et al. (2010); Jinno et al. (2010); Yang & Cotsarelis, (2010); Driskell et al. (2011); Pasolli et al. (2011); Bajpai et al. (2012); Dupin et al. (2012); Zhang et al. (2013); Driskell et al. (2015); Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, (2018); Wang et al. (2020).
Células Muse	Tejido adiposo (Muse-MSCs), dermis (Muse-fibroblastos).	+	Agregados similares a cuerpos embrioides.	+	+	Kuroda et al. (2010); Wakao et al. (2011); Heneidi et al. (2013); Kuroda et al. (2013); Ogura et al. (2014); Wakao et al. (2018).
Fp	Dermis papilar.	+	+ (bi o tricúspides en Fp, esteladas en Fr y heterogéneos en F-DHJ).		No potencial osteogénico.	Lorenz et al. (2008); Cappellesso-Fleury et al. (2010); Halfon et al. (2011); Yan et al. (2011); Kundrotas et al. (2012); Denu et al. (2016); Haydont et al. (2020).
Fr	Dermis reticular.				+	
F-DHJ	Entre dermis e hipodermis.				+	
Pericitos, MSCs perivasculares y de tejido adiposo	Región perivascular de la dermis; alrededor del folículo piloso.	+	+	+	+	Doherty & Canfield, (1999); Brachvogel et al. (2005); Covas et al. (2008); Crisan et al. (2008); da Silva et al. (2008); Paquet-Fifield et al. (2009); Messenger et al. (2010); Diaz-Flores et al. (2012); Yamanishi et al. (2012); Zimmerlin et al. (2013); Haydont et al. (2020).
SDSCs y células melanocíticas	Bulge, dermis interfolicular y tejido adiposo.	+	+ (poligonal compacta en dermis y tejido adiposo; múltiples protuberancias en melanocíticas)	+	+	Toma et al. (2001); Nishimura et al. (2002); Fernandes et al. (2004); Sieber-Blum et al. (2004); Rendl et al. (2005); Toma et al. (2005); Wong et al. (2006); Delfino-Machín et al. (2007); Waters et al. (2007); Biernaskie et al. (2009); Yu et al. (2010); Achilleos et al. (2012); Chou et al. (2013); Soma et al. (2013); Sowa et al. (2013); Mull et al. (2015); Ge et al. (2016); Vasyleiv et al. (2017); Ali et al. (2018); Hu et al. (2018); Nilforoushzadeh et al. (2019); Vasyleiv et al. (2019); Zhou et al. (2019).
Telocitos	Bulge y dermis.	+	Atípica; presentan telópodos.	CD90 (-); resto (ND)	ND	Popescu et al. (2010); Ceafalan et al. (2012); Rusu et al. (2012); Zheng et al. (2013); Sidney et al. (2014); Manole et al. (2016); Xiong et al. (2016); Haydont et al. (2020); Sanches et al. (2020).
EpSCs	Bulge y epidermis basal.	+	Morfología poligonal.	CD73 (-), CD90 (-)	ND	Rendl et al. (2005); Delfino-Machín et al. (2007); Carriel et al. (2011); Xiong et al. (2016); Ponce et al. (2017); Raghuram et al. (2020); Wang et al. (2020).

2.4.2 Morfología de las hHF-MSCs y modo de expansión en cultivo.

Las hHF-MSCs, aunque tienen una morfología similar a fibroblasto, las células de la vaina dérmica presentan una morfología de miofibroblasto (Agabalyan et al., 2017), que se muestra más alargada y dendrítica cuando el medio de cultivo está suplementado con FGF2 (Desai et al., 2014). Este factor de

crecimiento está contenido en los lisados de plaquetas humanas (Gentile et al., 2019; González et al., 2017), y ha sido empleado en el aislamiento y expansión de las hHF-MSCs en este trabajo.

Se ha evidenciado que el citoplasma de la mayor parte de las células de la papila dérmica y de la vaina dérmica del folículo piloso en cultivo, a diferencia de los fibroblastos dérmicos, se tiñe con Alcian Blue en una coloración azul, que puede mostrarse de color azul pálido (Wu et al., 2005). Esta observación realizada para las células de la papila dérmica del folículo piloso también fue observada por Kiseleva et al. (2009) y por Lavoie et al. (2009).

Asimismo, se ha observado que las células de la papilla dérmica del folículo piloso en confluencia muestran agregaciones multicapa (Wu et al., 2005; Kiseleva et al., 2009) y esta característica también las distingue de los fibroblastos dérmicos (Wu et al., 2005).

2.4.3 Comparación de marcadores entre las poblaciones celulares que pueden proliferar en cultivo para la selección de hHF-MSCs con propósitos terapéuticos.

En general, los marcadores para la caracterización de MSCs pueden dividirse en: a) marcadores de pluripotencia para facilitar la selección y enriquecimiento de subpoblaciones de MSCs que exhiben una mayor potencialidad y pueden detectarse moderadamente y, b) marcadores específicos, que normalmente muestran una alta expresión y constituyen una herramienta de selección de MSCs (Lv et al., 2014). Sin embargo, no existe un único marcador que sea verdaderamente específico de MSCs, ya que, por un lado, la expresión de estos marcadores se muestra generalmente variable dependiendo de la fuente de procedencia (Lv et al., 2014; Naji et al., 2019) y, por otro lado, estos marcadores también son expresados por otras poblaciones celulares que pueden aislarse y proliferar junto a las MSCs.

Con la finalidad de facilitar la comparación de la expresión de diversos marcadores de superficie y proteínas, entre las hHF-MSCs de la zona occipital del folículo piloso y otras poblaciones celulares CD73+/CD90+/CD105+, que pueden aislarse y proliferar junto a las hHF-MSCs, y que fueron especificadas en la Tabla 2, se ha llevado a cabo un resumen de los mismos que presentamos en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de la expresión de los marcadores analizados en hHF-MSCs frente a otras poblaciones que también coexpresan CD73, CD90 y CD105; (+) expresión positiva; (-) negativa o baja expresión; (ND) no descrito en artículos revisados. SC (marcador de pluripotencia); M (marcador mesenquimal); hHF-MSCs (células madre mesenquimales de folículo piloso humano); DP (células de la papila dérmica; SKPs); DSCs (células madre dérmicas de la región peribulbar); SDSCs (células madre/progenitores con origen en la cresta neural y localizados en el bulge); PT (MSCs perivasculares/progenitores de tránsito de MSCs); AT (MSCs de tejido adiposo blanco que residen en la región perivascular); ANAG (fase anágena del ciclo de crecimiento del pelo).

Marcador	hHF-MSCs	Células Muse	Fibroblastos	Pericitos	SDSCs y células melanocíticas
CD34 (SC)	Negativo (Hoogduijn et al., 2006; Lorenz et al., 2008; Wakao et al., 2011;	Negativo (Ogura et al., 2014; Gimeno et al., 2017; Wakao	Negativo (Rendl et al., 2005; Chen et al., 2007; Lorenz et al., 2008; Blasi et	Negativo + en PT y AT (Crisan et al., 2008; Zimmerlin et al., 2013;	Positivo (Waters et al., 2007; Ge et al., 2016; Ali et al.,

Marcador	hHF-MSCs	Células Muse	Fibroblastos	Pericitos	SDSCs y células melanocíticas
	Yamanishi et al., 2012; Ge et al., 2016; De Oliveira et al., 2017; Vasyliov et al., 2019).	et al., 2018; Sato et al., 2020).	al., 2011; Denu et al., 2016.	Mitrofanova et al., 2020; Sanches et al., 2020).	2018; Vasyliov et al., 2019).
CD44	Positivo (Lorenz et al., 2008; Biernaskie et al., 2009; Kang et al., 2011; Yang et al., 2013; Coelho de Oliveira et al., 2017; Gentile et al., 2019).	Positivo (Gimeno et al., 2017).	Positivo (Lorenz et al., 2008; Blasi et al., 2011; Alt et al., 2011; Halfon et al., 2011; Sriram et al., 2015).	Positivo (Crisan et al., 2008; Wong et al., 2012).	Positivo (Biernaskie et al., 2009).
CD56 / NCAM1 (M)	Positivo (Ge et al., 2016); Vasyliov et al., 2017).	ND	Positivo (Blasi et al., 2011; Brohem et al., 2013).	Negativo (Crisan et al., 2008).	Negativo (Ge et al., 2016); Vasyliov et al., 2017; Vasyliov et al., 2019).
CD117 / cKIT (SC)	Negativo (Rendl et al., 2005; Coelho de Oliveira et al., 2017; Vasyliov et al., 2019).	Negativo (Wakao et al., 2011; Wakao et al., 2018).	Negativo (Rendl et al., 2005; Cappellesso-Fleury et al., 2010).	Negativo (Zimmerlin et al., 2013; Mitrofanova et al., 2020).	Positivo (Nishimura et al., 2002; Rendl et al., 2005; Wakao et al., 2011; Wong et al., 2012; Mull et al., 2015; Vasyliov et al., 2019).
CD133 / PROM1 (CS)	Negativo/+ en DP ANAG (Lorenz et al., 2008; Biernaskie et al., 2009; Driskell et al., 2011; Ge et al., 2016; Coelho de Oliveira et al., 2017).	ND	Negativo (Chen et al., 2007; Lorenz et al., 2008; Blasi et al., 2011).	Negativo (Crisan et al., 2008).	Negativo (Biernaskie et al., 2009; Driskell et al., 2011; Ge et al., 2016).
CD140 / PDGFR	Positivo (α y β) (Driskell et al., 2015; Ge et al., 2016; Vasyliov et al., 2017)	ND	Positivo (α y β) (Covas et al., 2008).	Positivo (β) (Brachvogel et al., 2005; Covas et al., 2008; Crisan et al., 2008; Wong et al., 2012; Mabuchi et al., 2013; Manole et al., 2016).	Positivo (α y β) (Ge et al., 2016; Vasyliov et al., 2017).
CD146 / MCAM (M)	Positivo (De Oliveira et al., 2017; Izadpanah et al., 2008; R. G.	Negativo (Wakao et al., 2011; Ogura et	Negativo (Covas et al., 2008; Blasi et al.,	Positivo (Covas et al., 2008; Crisan et al., 2008;	Positivo (Vasyliov et al., 2017).

Marcador	hHF-MSCs	Células Muse	Fibroblastos	Pericitos	SDSCs y células melanocíticas
	Vasyliov et al., 2017; Wakao et al., 2011).	al., 2014; Wakao et al., 2018).	2011; Halfon et al., 2011).	Mabuchi et al., 2013; Manole & Simionescu, 2016; Sacchetti et al., 2007; Wakao et al., 2011; Zimmerlin et al., 2013).	
CD166/ ALCAM	Positivo (Lorenz et al., 2008; Coelho de Oliveira et al., 2017; Vasyliov et al., 2017).	ND	Positivo (Lorenz et al., 2008; Cappellesso-Fleury et al., 2010; Blasi et al., 2011; Halfon et al., 2011).	Positivo (Crisan et al., 2008; Wong et al., 2012).	Positivo (Vasyliov et al., 2017).
ALP	Positivo (McElwee et al., 2003; Rendl et al., 2005; Driskell et al., 2011).	Positivo (Kuroda et al., 2010; Wakao et al., 2011; Ogura et al., 2014).	Negativo (Rendl et al., 2005).	Positivo (Crisan et al., 2008; Fisher et al., 2009).	Negativo (Rendl et al., 2005; Driskell et al., 2011).
SOX2 (SC)	Positivo (SKPs y DSCs) (Izadpanah et al., 2006; Biernaskie et al., 2009; Driskell et al., 2013; Yang et al., 2013; Driskell et al., 2015; Lim et al., 2019; Lynch & Watt, 2018; Vasyliov et al., 2019).	Positivo (Kuroda et al., 2010; Heneidi et al., 2013; Kuroda et al., 2013).	Negativo (Mao et al., 2015)	Positivo (Bouacida et al., 2012).	Positivo (Biernaskie et al., 2009; Driskell et al., 2011; Mao et al., 2015; Ge et al., 2016; Vasyliov et al., 2019; Bergeron et al., 2020).

Mediante un gráfico *heatmap* se representó la expresión de los genes de la Tabla 3 para cada una de las poblaciones que pueden crecer en cultivo, y de las que se posee más información.

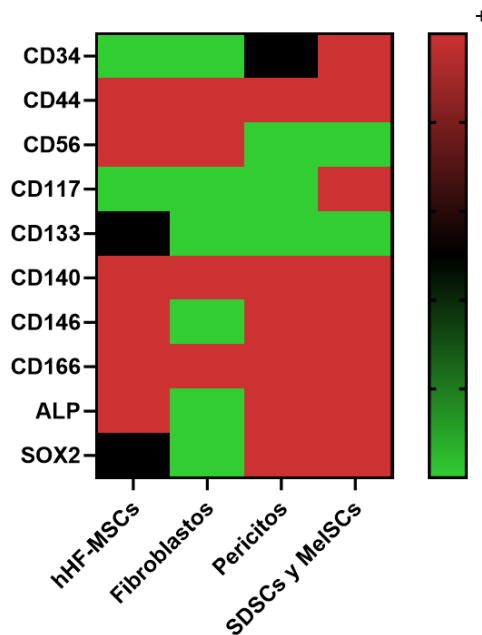


Figura 11. Gráfico *heatmap* que representa el nivel de expresión de cada uno de los genes de la Tabla 3 seleccionados para su análisis. No se representa las células Muse porque para algunos marcadores no se sabe.

2.5 MEDIOS CONDICIONADOS INDUCTORES DE LA OSTEOGÉNESIS PARA AUMENTAR EL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS MSCs.

2.5.1 Estrategias de inducción osteogénica que emplean medios condicionados.

2.5.1.1 Empleo de medios condicionados secretados por osteoblastos.

La inyección de MSCs en el tejido u órgano diana dañado o la inyección de MSCs diferenciadas previamente *in vitro* son estrategias terapéuticas para la regeneración celular. No obstante, tal y como se expone en el apartado 1.1.3, existe una alternativa al reemplazo celular que consiste en la administración de factores de crecimiento para dirigir a las células madre endógenas a su diferenciación específica, y facilitar así la reparación y regeneración de tejidos.

Diversos estudios demuestran que el uso de medios condicionados producidos por osteoblastos y osteocitos derivados de MSCs diferenciadas *in vitro* para la inducción osteogénica de células madre y progenitores endógenos es una alternativa al reemplazo de células de la línea osteogénica (Heino et al., 2004; Maxson & Burg, 2010; L. F. Zhang et al., 2014).

Por todo lo anterior, el estudio de la capacidad de inducir la osteogénesis de los medios condicionados producidos por las hHF-MSCs durante su diferenciación osteogénica puede ser de interés futuro en ensayos de terapia celular.

Los osteoblastos son capaces de producir y liberar factores de crecimiento y citoquinas que intervienen en la osteogénesis, como la proteína morfogenética ósea BMP-2, el factor de crecimiento transformante TFG- β , el factor de crecimiento de fibroblastos FGF-2 y el factor de crecimiento insulínico IGF-1 (Gimble

et al., 2004; Maxson et al., 2008). Se ha demostrado que el empleo de medio condicionado obtenido a partir de osteoblastos (OB-CM) estimula la diferenciación osteogénica de MSCs obtenidas a partir de la diferenciación de iPSCs de ratón (Zhong et al., 2019).

Para la obtención de medios condicionados pueden emplearse osteoblastos comerciales o generar el medio condicionado tras la diferenciación osteogénica de las hHF-MSCs. La expansión de esta población celular previa al proceso de diferenciación puede iniciarse a partir de una densidad de siembra celular alta. Estudios previos con MSCs derivadas de folículo piloso describen haber iniciado el proceso de diferenciación osteogénica tras alcanzar el 60-80% de confluencia (Bai et al., 2017; De Oliveira et al., 2017; Veraitch et al., 2017) e incluso cercanas a la confluencia total (Bajpai et al., 2012; Liu et al., 2010). Para MSCs procedentes de otros tejidos se han descrito confluencias de entre el 60-70% y 80-90% (Brohem et al., 2013; Joseph et al., 2020; Vaculik et al., 2012). Asimismo, en MSCs de rata se ha demostrado que las confluencias del 80% resultan óptimas con propósitos de diferenciación osteogénica, siendo también aceptable el 100% de confluencia (Abo-Aziza & Zaki, 2016).

Los osteoblastos participan en la formación y mineralización de la matriz extracelular del tejido óseo y el 30% de estas células se diferencian a osteocitos. Los osteocitos poseen una forma estrellada con prolongaciones citoplásmicas en todos los sentidos y mantienen la matriz mineralizada (Mohanty et al., 2015). Los depósitos de calcio de la matriz producidos por los osteoblastos pueden observarse tras realizar una tinción con Alizarin Red S (Houlihan et al., 2012; Mohanty et al., 2015).

El análisis de expresión génica tras la diferenciación osteogénica aporta información sobre el estado de diferenciación en el que se encuentra la población celular (Scheideler et al., 2008; Komori, 2010; Murgia et al., 2016; Shen et al., 2019). La obtención de osteoblastos puede ser evidenciada, entre otros, por el aumento en la expresión de los genes *RUNX2*, *Sp7*, osteocalcina, *BMP-6* (Shen et al., 2019) y *BMPR1B* (Scheideler et al., 2008; Komori, 2010; Murgia et al., 2016; Shen et al., 2019). Sin embargo, la expresión de algunos de estos genes es variable según el estado de maduración de los osteoblastos (Komori, 2010). En el caso de la expresión del gen *RUNX2*, un aumento en la expresión es indicativo de la presencia de osteoblastos inmaduros (Komori, 2010) y/o preosteoblastos (Komori, 2010; Shen et al., 2019), mientras que una pérdida de expresión señala la obtención de osteoblastos maduros (Komori, 2010). En la Figura 12 se representa la expresión de *RUNX2* durante la diferenciación osteoblástica (Figura 12-A) y la regulación de la osteogénesis por los genes *Sp7* y *RUNX2* (Figura 12-B).

Asimismo, se ha evidenciado el aumento en la expresión de marcadores adipogénicos y condrogénicos bajo condiciones de inducción osteogénica. Algunos de estos marcadores son el marcador adipogénico *PPAR2* (Komori, 2010) y los marcadores condrogénicos *COL1A1* (Scheideler et al., 2008; Shen et al., 2019), *COL1A2* (Scheideler et al., 2008; Murgia et al., 2016) y *DCN* (Murgia et al., 2016).

A

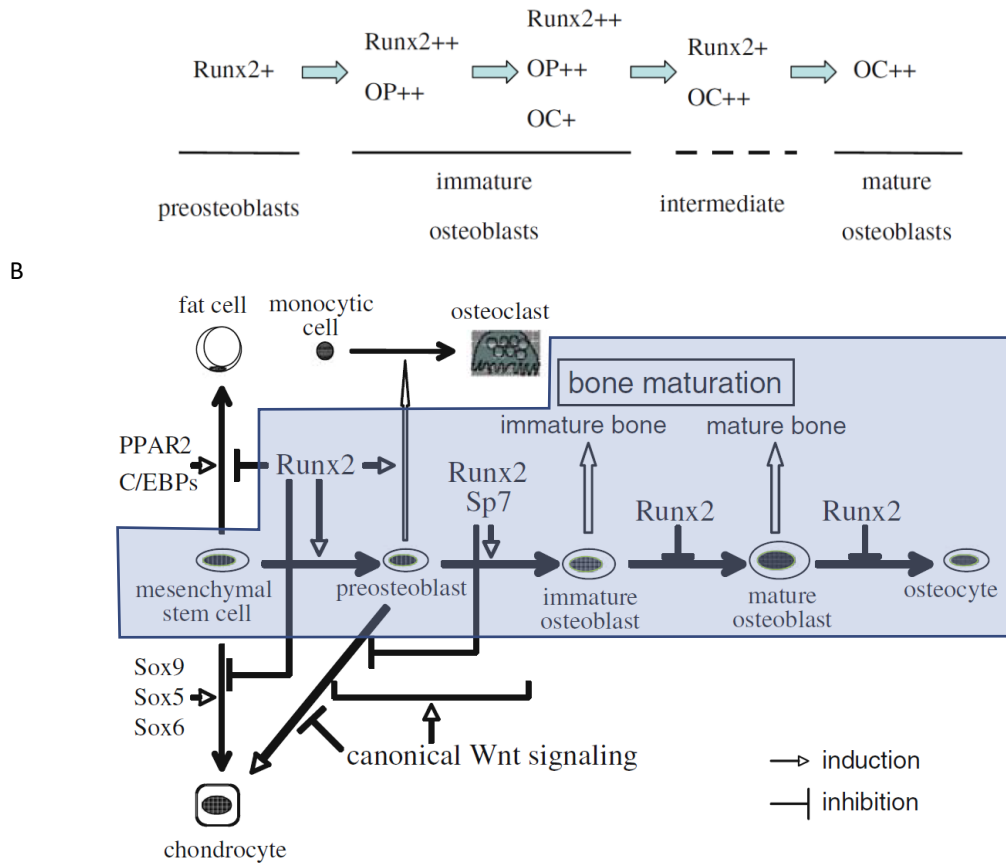


Figura 12. Expresión del gen *RUNX2* durante la diferenciación osteoblástica. A) Expresión de *RUNX2* según el estado de maduración de los osteoblastos; B) Regulación de la osteogénesis por los genes *RUNX2* y *Sp7* (recuadro azul). OP: osteopontina, OC: osteocalcina. Imágenes obtenidas de Komori (2010).

2.5.1.2 Efecto de la concentración del medio condicionado en la inducción osteogénica.

Diversos estudios han evidenciado un aumento en el potencial osteogénico de los medios condicionados obtenidos a partir de osteoblastos (OB-CM) cuando se emplean estos medios inductores a una menor concentración. Esta capacidad ha sido observada en MSCs obtenidas a partir de la diferenciación de células pluripotenciales inducidas (iPSCs) (Zhong et al., 2019). Tal y como se ha descrito en estudios previos, la administración de un 25 a un 50% de medio condicionado producido por osteoblastos combinado con medio basal bajo en glucosa y en factores de crecimiento no inductores de diferenciación, incrementa la diferenciación osteogénica, frente a concentraciones del 50 y 70%, en MSCs obtenidas a partir de la diferenciación de iPSCs de ratón (Maxson et al., 2008; Zhong et al., 2018) y en MSCs de médula ósea de ratón (Birmingham et al., 2012), mientras que concentraciones de medio condicionado al 70% no aumentaron significativamente el potencial osteogénico en MSCs obtenidas tras la diferenciación de iPSCs (Zhong et al., 2018).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 HIPÓTESIS.

Las MSCs adultas son consideradas como una herramienta terapéutica única con menor riesgo de formación de teratomas *in vivo* que las células pluripotentes embrionarias e iPSCs. Aunque pueden aislarse de gran variedad de tejidos, el folículo piloso es una fuente fácilmente accesible de hHF-MSCs con un alto potencial regenerativo sin efectos fibróticos, y sin efecto negativo en el entorno diabético, en contraste con las MSCs de médula ósea y tejido adiposo. Por ello, las hHF-MSCs aportan beneficios frente al empleo de MSCs de otras fuentes de procedencia. En consecuencia, una metodología de aislamiento de MSCs a partir de explantes de folículo piloso que favorezca la migración desde el explante, y el enriquecimiento de esta población celular puede ser altamente efectiva y simplificar las metodologías de aislamiento basadas en la microdissección y digestión enzimática de las regiones mesenquimales del folículo piloso.

Los folículos pilosos contienen, además de células madre mesenquimales, otros tipos celulares distintos a MSCs que pueden aislarse y proliferar en cultivo junto con esta población mesenquimal. También, existen otras poblaciones alrededor del folículo piloso que también pueden proliferar junto con las MSCs. Debido a que se ha observado que algunas de las poblaciones celulares circundantes al folículo piloso, como los pericitos y fibroblastos, pueden generar procesos fibróticos tras su aplicación clínica, un estudio que aporte información sobre cómo detectarlas y retirarlas de la población celular podría facilitar la obtención de una población MSC que puede emplearse en terapia celular sin los efectos indeseados debidos a la presencia de pericitos y fibroblastos.

MSCs procedentes de otros tejidos han demostrado una capacidad proliferativa adecuada para su aplicación en ensayos de terapia celular. El estudio de la capacidad proliferativa de las hHF-MSCs, en comparación con MSCs de otros tejidos de procedencia, que son empleadas en la actualidad en ensayos de terapia celular, podría aportar más conocimiento sobre su capacidad proliferativa y adecuación futura en aplicaciones terapéuticas.

La alopecia androgenética avanzada en pacientes masculinos puede afectar la región occipital del cuero cabelludo y, por tanto, la obtención de MSCs del folículo piloso podría verse afectada. Por esta razón, y para poder aplicar las MSCs de folículo piloso de estos pacientes, o de pacientes no afectados pero de mayor edad, en terapias de reparación autóloga, un estudio de la selección de un suero que pudiese favorecer la migración y proliferación de estas células ayudaría a optimizar el proceso de enriquecimiento de MSCs en estos pacientes. Asimismo, un modelo estadístico predictivo que pudiese aportar información sobre cómo afecta la edad del donante u otros factores relativos a las condiciones de cultivo, podría ayudar a optimizar el proceso de obtención de MSCs de folículo piloso y a conocer la probabilidad de éxito de la obtención de cultivos proliferativos de cualquier paciente.

La senescencia celular de las MSCs tras los subcultivos y pases afecta a la proliferación celular, por lo que, el análisis de los factores que pueden conducir a las MSCs de folículo piloso a estados senescentes podría prevenir una baja viabilidad debida a la senescencia.

Por último, los osteoblastos obtenidos tras la diferenciación de MSCs humanas de médula ósea producen y secretan factores solubles que influyen en la diferenciación osteogénica de MSCs, probablemente de forma similar a como ocurre *in vivo*. Asimismo, existe la evidencia de que los osteoblastos obtenidos de la bóveda craneal de ratón han demostrado la capacidad para secretar medios condicionados en cultivo que inducen la diferenciación osteogénica de MSCs. Por todo ello, una metodología que permitiera la obtención de medios condicionados inductores de osteogénesis tras la diferenciación de las MSCs de folículo piloso aportaría conocimiento para su futuro uso en terapia regenerativa como alternativa a terapias basadas en reemplazo celular.

2 OBJETIVOS.

El objetivo general de este estudio ha sido obtener células madre mesenquimales de folículo piloso (hHF-MSCs) occipital humano por su interés en terapia celular, y generar medios condicionados inductores y potenciadores de la capacidad de diferenciación a linajes mesenquimales utilizando como modelo la inducción osteogénica con vistas a su futura aplicación en medicina regenerativa.

Con este fin, los objetivos específicos de este trabajo han sido:

1. Diseñar una metodología efectiva y simple que favorezca la migración de células del folículo piloso occipital a la superficie de cultivo para establecer un cultivo primario, y seleccionar un método de cultivo que favorezca el enriquecimiento en la fracción de células madre mesenquimales hHF-MSCs que pudieran estar presentes en la población de células adherentes del cultivo primario.

Existen diversos métodos para obtener células adherentes en cultivo primario a partir de folículos pilosos humanos, tales como la disgregación enzimática, o la microdissección láser, que facilitan la migración de las células, o el enriquecimiento de partida en células del compartimento mesenquimal. Estas metodologías pueden alterar las características de las células, por cuyo motivo, este objetivo pretende obtener células adherentes sin la utilización de estos procedimientos, utilizando en su lugar explantes simplemente diseccionados manualmente para eliminar las células del bulbo que rodean al folículo piloso.

2. Favorecer la proliferación celular de las hHF-MSCs, evitando la generación de estados senescentes y analizar la capacidad proliferativa estas células para evaluar su capacidad de crecimiento con fines de investigación y futuro empleo en terapia celular.

La investigación de las características de las células obtenidas del folículo piloso en las condiciones de cultivo a desarrollar en el objetivo 1, requiere alcanzar un elevado número de células viables. Asimismo, ocurre con el uso de estas células con fines terapéuticos. En consecuencia, resulta necesario investigar factores como la edad del donante, el grado de confluencia o la densidad de siembra, que pueden ocasionar pérdida de viabilidad en los cultivos, para tratar de conocer su influencia y desarrollar estrategias destinadas a favorecer una alta viabilidad y proliferación celular.

3. Comprobar la homogeneidad de la población de hHF-MSCs en los cultivos celulares derivados de explantes del folículo piloso.

El método desarrollado para la obtención de células en cultivo tras el cultivo primario y los primeros pases puede favorecer también el crecimiento de otros tipos celulares diferentes de hHF-MSCs. Por ello, es de interés comprobar la existencia de otros tipos celulares, como fibroblastos o pericitos, y valorar la presencia de estas fracciones en la población celular en cultivo.

4. Aumentar el potencial de las hHF-MSCs para diferenciarse a linajes mesodérmicos, tomando como modelo la diferenciación osteogénica.

El potencial de diferenciación de las hHF-MSCs es hacia tres linajes mesodérmicos. Para investigar sobre el aumento de su potencial de diferenciación, se utilizará como modelo la diferenciación osteogénica. Para ello, se realizará el estudio de los efectos de distintos métodos de cultivo basados en diferentes formas de suplementar el medio de cultivo basal. Teniendo en cuenta que el condicionamiento del medio de cultivo es un factor importante para inducir la diferenciación celular, se ensayarán diversas formas de suplementación con medios inductores de osteogénesis y combinaciones de éstos con medios condicionados obtenidos durante el proceso de diferenciación osteogénica de cultivos paralelos en distintos días del proceso de diferenciación.

La consecución de este objetivo supondría una mejora sustancial en la aplicación de las hHF-MSCs en terapia celular.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1 MUESTRAS BIOLÓGICAS: EXPLANTES DE FOLÍCULO PILOSO.

1.1 PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS Y CONSERVACIÓN.

Los explantes de folículo piloso procedieron de donantes de la Clínica Dermatológica Ercilla (Dr. Gorrochategui). Estos explantes se correspondían con excedentes quirúrgicos para el trasplante de cabello de rutina, y fueron recolectados de la región occipital del cuero cabelludo de 12 donantes sanos, 11 varones en edades comprendidas entre los 21 y 42 años, y una donante de 47 años. En todos los casos se procedió a solicitar previamente su consentimiento informado según el proyecto aprobado por el Comité de Ética para la Investigación en Seres Humanos de la Universidad del País Vasco UPV/EHU (CEISH/64/2011/MARTINEZ DE PANCORBO).

Por cada donante se obtuvieron 2 lotes de 10 explantes. Estas muestras biológicas fueron conservadas en refrigeración en un rango de temperatura de entre 2 y 8 °C en medio de cultivo basal Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, cat. Nº: 11965092; Gibco) suplementado con 1% de penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL (cat. Nº: 15140122; Gibco) durante un máximo de 24 horas.

1.2 INICIO DEL CULTIVO.

Antes de proceder al cultivo, las muestras fueron lavadas con PBS 1X (cat. Nº: BE17-516F; Lonza) suplementado con un 10% de penicilina/estreptomina (cat. Nº: 15140122; Gibco) en placas Petri. A continuación, se colocaron 5 explantes de folículo piloso, equidistantes entre sí, por pocillo en placas de 12 pocillos (cat. Nº: 150200; Nunc) sin revestimiento proteico para permitir la migración y expansión de células adherentes y no favorecer la expansión de otras poblaciones celulares, distintas a MSCs, que proliferan en suspensión.

El cultivo de cinco explantes por pocillo en placas de 12 pocillos (Corning) se realizó para facilitar la manipulación y su adherencia a la superficie de cultivo durante los procesos de lavado con PBS 1X (cat. Nº: BE17-516F; Lonza) y de cambios de medio de cultivo requeridos para favorecer el enriquecimiento de las MSCs del folículo piloso.

Una vez que los explantes estuvieron colocados en la superficie de cada pocillo, se adicionó 1 mL de medio de cultivo completo, y se mantuvieron en incubación a 37 °C, con un 5% de CO₂ y en condiciones de humedad. El medio se reemplazó con medio de cultivo completo fresco cada 3 días.

2 MIGRACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO EN MSCs DEL FOLÍCULO PILOSO.

2.1 CULTIVO PRIMARIO.

Para favorecer la migración de las células madre desde el compartimento mesenquimal del folículo piloso se empleó medio de cultivo completo: medio basal DMEM rico en glucosa (cat. Nº: 11965092; Gibco) suplementado con un 30% de suero y un 10% de penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL (cat. Nº: 15140122; Gibco).

En cuanto al suero empleado, dos pocillos de cada donante fueron suplementados con un lisado de plaquetas humano comercial (Stemulate™ Human Platelet Lysate Cell Culture Media Supplement; PL-NH-100; COOK) y el resto fue suplementado con suero heterólogo procedente de donantes para comparar la capacidad proliferativa de las células adherentes obtenidas del folículo piloso entre estos suplementos de factores de crecimiento.

Cada 3 o 4 días se realizaron cuidadosos lavados con PBS 1X, evitando que los explantes se despegaran de la superficie del pocillo durante la adición y retirada del PBS, para retirar las células que pudieran proliferar en suspensión. Asimismo, se realizaron cambios de medio para aportar nutrientes y factores de crecimiento a la población celular en cultivo. Estos lavados y cambios de medio se realizaron hasta que se observó una confluencia del 80-90%, es decir hasta que las células llegaron a cubrir gran parte de la superficie de los pocillos.

Después de varios días, y tras la observación de células adherentes que se expanden por la superficie del pocillo, se retiraron los explantes. Las células adherentes obtenidas tras el cultivo primario fueron denominadas hHFSCs hasta su caracterización como población MSC.

2.2 PASES TRAS EL CULTIVO PRIMARIO.

Una vez alcanzada una confluencia superior al 80 % en el cultivo primario, las células se tripsinizaron, como se detalla en el apartado 3.3, y se llevó a cabo un recuento del número de células totales, así como de la viabilidad de la población. Posteriormente se realizó el primer pase de las células procedentes del cultivo primario (con una densidad de siembra en función del análisis posterior), y se continuó el enriquecimiento de la población de células madre mesenquimales del folículo piloso, en frascos de cultivo de 25 cm² (Corning), suplementado con 30% de suero de lisado de plaquetas HPL al igual que en el cultivo primario.

Cada 3 o 4 días se realizaron lavados con PBS 1X y cambios de medio hasta alcanzar la confluencia deseada según el estudio al que fueron destinadas, tal y como se desarrolla en los esquemas de diseño experimental para cada ensayo en el apartado de Resultados.

La expansión celular se continuó hasta alcanzar los pases 5 a 6 en los que se llevó a cabo la caracterización de las hHFSCs.

3 MANTENIMIENTO Y EXPANSIÓN DE LOS CULTIVOS.

3.1 TIPOS DE SUEROS EMPLEADOS COMO APOORTE DE FACTORES DE CRECIMIENTO.

3.1.1 Lisado de plaquetas humano comercial (HPL).

El lisado de plaquetas humano empleado para la metodología de migración y enriquecimiento de MSCs a partir de explantes de folículo piloso fue un suero rico en plaquetas comercial ya estandarizado (Stemulate™ Human Platelet Lysate Cell Culture Media Supplement; PL-NH-100; COOK).

3.1.2 Suero heterólogo.

El suero heterólogo fue empleado durante el cultivo primario y primer pase para estudiar su capacidad para enriquecer la población MSC del folículo piloso frente al empleo de un lisado de plaquetas.

Este suero fue obtenido tras un proceso de coagulación del suero sanguíneo de los donantes favorecido mediante el empleo de cloruro cálcico (2 mg/mL) a 37 °C durante 24 horas. Tras este periodo se desechó el precipitado de los factores de coagulación y se filtró el suero (filtro con poro 20 µm, ThermoFisher Scientific) para eliminar cualquier posible resto celular o contaminación.

3.1.3 Suero bovino fetal.

El suero bovino fetal inactivado (FBS, GIBCO) fue empleado para la expansión celular de las hHFSCs previa a los ensayos de diferenciación, y para estudios del efecto de este suero en la proliferación celular.

3.2 MEDIOS DE CULTIVO COMPLETOS.

Los medios de cultivo para la expansión de las hHFSCs, o para el mantenimiento de esta población en estado quiescente como control negativo contenían diferentes concentraciones de nutrientes y factores de crecimiento.

El volumen de medio de cultivo recomendado según el frasco o placa de cultivo empleada se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes de medio de cultivo completo recomendados para el mantenimiento y expansión de las hHF-MSCs.

Volumen de medio de cultivo fresco	
Placa de 12 pocillos	1 mL
Placa de 24 pocillos	500 μ L
Placa de 96 pocillos	80 μ L
Frasco de 25 cm²	5 mL
Frasco de 75 cm²	10 mL

3.2.1 Medio de cultivo completo para la expansión y mantenimiento de las hHFSCs.

Los componentes de los medios utilizados para la expansión y mantenimiento de células madre mesenquimales del folículo piloso fueron los siguientes: 60% DMEM rico en glucosa (cat. Nº: 11965092; Gibco), 30% suero (COOK) y 10% de antibiótico penicilina/estreptomicina (cat. Nº: 15140122; Gibco).

3.2.2 Medio de cultivo para los controles negativos de ensayos de diferenciación.

Los ensayos de diferenciación celular requieren habitualmente 21 días para la obtención de hHF-MSCs diferenciadas. Debido a esta larga duración en cultivo, las células que se emplean como control negativo de diferenciación deben permanecer en un estado no proliferativo sin que afecte a su viabilidad. Por esta razón, el medio de cultivo empleado para la población control estaba compuesto de un medio de cultivo basal DMEM bajo en glucosa (cat. Nº: 11965092; Gibco), suplementado con un 10% de suero y un 10% de penicilina/estreptomicina (cat. Nº: 15140122; Gibco). De esta forma, se favoreció una privación suave que mantuvo viables las hHFSCs control durante los 21 días de diferenciación.

3.2.3 Medios para el tratamiento con resveratrol.

El tratamiento con resveratrol se realizó de la siguiente forma:

- Preparamos 10ml de etOH al 65%: 6,5ml etOH absoluto + 3,5ml agua
- Para preparar la dilución madre 100mM del resveratrol se diluyeron 1,32 mg de resveratrol, (conservado en polvo a -20°C) en 57,50 μ l de etanol al 65%. Antes de comenzar, tener en cuenta que hay que protegerlos de la luz y que, una vez preparada la dilución madre se conserva en congelación.

El tratamiento con resveratrol se realizó de la siguiente forma:

- Las muestras y controles de hHF-MSCs expandidas en pocillos de placas de 12 pocillos, por triplicado, se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la confluencia un 80% de confluencia.

- Para analizar el efecto del resveratrol en la recuperación de cultivos. Excepto a los controles, se adicionó resveratrol 10 μ M a cada muestra. Tanto controles como las muestras se mantuvieron en cultivo durante 5 días más para provocar la sincronización celular en fase G0/G1.
- Tras los cinco días, se realizó un lavado, tanto a las muestras como a los controles, y se mantuvieron con medio de cultivo sin suero durante 48 horas para mantenerlas en estado de privación y favorecer la detención del ciclo celular.
- Tras las 48 horas se analizó el ciclo celular, la síntesis de ADN, la apoptosis y la necrosis de las poblaciones hHF-MSC.

3.3 TRIPSINIZACIÓN.

Una vez que las células alcanzaron la confluencia deseada según el ensayo al que iban destinadas, y para poder realizar el posterior pase, se despegaron de la superficie por tripsinización. Para ello, se empleó tripsina al 0,25 % y EDTA al 0,02 % (Gibco) por la actividad proteasa de la tripsina, que puede digerir la matriz extracelular y algún grado de dominios extracelulares de proteínas de adhesión (Vargas et al., 2016). El agente quelante EDTA se empleó porque muchas de las moléculas de adhesión son dependientes de calcio (cadherinas).

Antes de añadir la tripsina, se realizaron dos lavados con PBS 1X (Lonza) para retirar restos de suero que pudieran inactivar la tripsina. Una vez retirado el PBS, se añadió tripsina-EDTA y se mantuvo en incubación durante 5 min a 37 °C. Tras el levantamiento de las células se inhibió rápidamente la acción de la tripsina con un suero de inactivación que contenía DMEM (cat. N°: 11965092; Gibco) suplementado con un 10% de suero para evitar la muerte celular por la acción de la tripsina.

La suspensión celular se llevó a un tubo de fondo cónico de 15 mL para su centrifugación y posterior recuento y pase.

En el caso de levantar las células para caracterizarlas mediante anticuerpos marcados con fluorocromos, hay que tener en cuenta que la tripsina puede destruir el epítipo de la proteína que deseamos detectar, por lo que en estos casos se empleó EDTA 10 mM en PBS (PBS-EDTA, Lonza) para despegarlas de la superficie de adhesión. El protocolo de uso consistió en realizar dos lavados previos de nuestras células con PBS 1X, retirar y añadir el PBS-EDTA. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos facilitando la pérdida de adhesión celular mecánicamente mediante suaves golpes laterales al recipiente de cultivo. Se recogió el contenido del recipiente de cultivo y se introdujo en un tubo de centrifugación de 15 ml, para su posterior recuento celular.

3.4 RECUENTO CELULAR Y VIABILIDAD.

Para llevar a cabo los recuentos celulares, una vez tripsinizadas las células, se procedió a su centrifugación a 1.200 rpm durante 5 min. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadió PBS 1X hasta completar 1 ml de suspensión celular.

Tras resuspender las células mediante agitación manual suave, se mezclaron 10 μ L de la suspensión celular con 10 μ L de azul tripán al 0,4% (Cat. N°: 1450021; Biorad). El recuento celular se realizó en 10 μ L de la mezcla (por duplicado) mediante el contador de células automatizado TC20™ (BioRad), de acuerdo con el método de exclusión con colorante azul tripán. Los resultados mostrados por este equipo indicaron el número de células totales y viables por mL.

3.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO TEÓRICO.

Para analizar la cinética de crecimiento de las hHFSCs se calculó la duplicación de la población (PD), el tiempo de duplicación de la población (PDT) y el valor acumulado de las duplicaciones de la población (cPD).

Para el cálculo de PD y PDT se emplearon las siguientes fórmulas, teniendo en cuenta los recuentos celulares.

$$PD = \frac{\log\left(\frac{Nt}{N0}\right)}{\log 2}$$
$$PDT = t \frac{\log 2}{\log\left(\frac{Nt}{N0}\right)} \qquad PDT = \frac{t}{PD}$$

Donde t es el periodo de tiempo en cultivo en horas, N0 se corresponde con la densidad de siembra y Nt con el número de células en el tiempo t.

El número mínimo de MSCs clínicamente relevante es de 140×10^6 (Petrenko et al, 2020). Para valorar los datos de tiempo y pases necesarios para obtener el número de células clínicamente relevante se calculó el rendimiento teórico celular. Esta predicción teórica se obtuvo utilizando la siguiente fórmula (Petrenko et al., 2020):

$$\text{Rendimiento teórico de MSCs} = NhX \times 2 \text{ cPD}$$

donde NhX es número de células obtenidas tras llegar a confluencia en dicho pase y cPD el número de duplicaciones de la población acumuladas.

3.6 CRIOPRESERVACIÓN.

Para criopreservar las hHFSCs se realizó primero un recuento celular. Tras el recuento, se repitió una centrifugación a 1.200 rpm durante 5 minutos para resuspender el pellet celular en 800 μ l de DMEM rico en glucosa (cat. Nº: 11965092; Gibco). En cada criovial (de 1,5 ml) se introdujeron entre 5×10^5 y 1×10^6 células, y entre los pases 2 y 3.

El medio para preservar en congelación a las hHFSCs estaba compuesto por 800 μ L de DMEM rico en glucosa, 100 μ L de lisado de plaquetas humano o de suero heterólogo (según el tipo de suero con el que se expandieron), y 100 μ L de DMSO (Sigma-Aldrich). Debido a la toxicidad del DMSO se mantuvieron los crioviales en frío dentro de un recipiente que contiene isopropanol (Mr. Frosty; Nalgene) durante su transporte al ultracongelador de -150 °C.

3.7 DESCONGELACIÓN.

Las células se descongelaron y expandieron en los pases 4, 5 y 6.

Para el transporte de los crioviales al laboratorio se empleó un recipiente Mr. Frosty, que permite un descenso gradual de la temperatura. Los crioviales se introdujeron en el baño termostático a 37 °C, evitando la contaminación de la zona del tapón. Asimismo, y hasta su descongelación, se fueron moviendo con movimientos circulares suaves.

Una vez descongelado, añadimos gota a gota el contenido de un vial en un tubo cónico de 15 mL que contenía DMEM frío (cat. Nº: 11965092; Gibco), para evitar la muerte celular por acción de la toxicidad del DMSO.

Tras mezclar suavemente con la mano, y centrifugar posteriormente a 1.200 rpm durante 5 minutos, desechamos el sobrenadante y añadimos las células a un frasco de cultivo de 25 cm². Se observaron al microscopio invertido las células descongeladas flotando y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ en condiciones de humedad.

3.8 MICROSCOPIA.

La observación de la morfología de las células y su expansión en monocapa y/o formación de agregados multicapa se monitorizó bajo un microscopio invertido de contraste de fases (NIKON Eclipse TS 100) y se tomaron imágenes (720×576 μ m²) con una cámara a color (modelo ICD-879P, Ikegami).

4 DIFERENCIACIÓN CELULAR.

4.1 DIFERENCIACIÓN A LINAJES MESODÉRMICOS.

Las hHFSCs se sometieron a tres procesos de diferenciación celular a linaje mesodérmico hacia las líneas adipogénica, osteogénica y condrogénica.

Todos los ensayos de diferenciación se realizaron por triplicado y se emplearon dos tipos de controles: un blanco de la tinción de la superficie de las placas de cultivo vacías y un control negativo de la diferenciación. Como control negativo de la diferenciación se emplearon hHFSCs mantenidas en un estado de privación suave con medio de cultivo basal DMEM bajo en glucosa (cat. N°: 11564446; Gibco) suplementado con un menor porcentaje de suero bovino fetal (10%) (cat. N°: 16140063; ThermoFisher Scientific) para facilitar su quiescencia sin provocar la muerte celular durante los días en los que tuvo lugar la diferenciación celular.

4.1.1 Diferenciación adipogénica.

Antes de la diferenciación celular, las hHFSCs en pase 6 se sembraron por triplicado con una densidad de siembra de 12.500 células/cm² en pocillos de placas de 12 pocillos, y fueron expandidas en medio de cultivo basal DMEM rico en glucosa (cat. N°: 11965092; Gibco) suplementado con un lisado de plaquetas humano comercial (Stemulate™ Human Platelet Lysate Cell Culture Media Supplement; PL-NH-100; COOK) al 30%, hasta alcanzar un 80-90% de confluencia.

Para la diferenciación adipogénica se empleó el medio de inducción del kit de diferenciación de adipogénesis (cat. N°: A1007001; StemPro™; Gibco), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron cambios de medio cada 3-4 días durante 21 días.

Tras la diferenciación, se realizó una tinción con Oil Red (cat. N°: O1391; Sigma-Aldrich) para detectar los depósitos de lípidos formados por las células diferenciadas.

El protocolo de tinción utilizado fue el siguiente:

- Tras aspirar el medio empleado para la expansión de las células se procedió a realizar dos lavados con PBS 1X.
- Para fijar la muestra se añadió 1mL de formaldehído en cada pocillo y se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Durante los 30 minutos de fijación se preparó una solución de Oil Red (Oil Red Working solution) de la siguiente forma:

- La solución Oil Red Working solution se preparó con 3 partes de Oil Red y 2 partes de agua desionizada.
- Posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se filtró con un filtro con poro 0,22 μm (cat. N^o: 431219, Corning).
- Tras el periodo de fijación con paraformaldehído al 4% (cat. N^o: AR1068; Quimigen), se realizaron dos lavados con PBS 1X.
- A continuación, se añadió a cada pocillo 1 mL de isopropanol al 60% y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Tras retirar el isopropanol y dejar secar completamente la placa, se incorporaron en cada pocillo 400 microlitros de una solución de Oil Red (Oil Red Working solution) filtrada y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se retiró esta solución e inmediatamente se realizaron 4 lavados con agua.
- Después del último lavado se añadió agua destilada para observar las células al microscopio y fotografiar. Se observaron vesículas lipídicas en el interior de las células teñidas de rojo.

La cuantificación del Oil Red se realizó según el siguiente protocolo:

- Tras retirar el agua de los pocillos y dejar secar la placa, se añadió a cada pocillo 1,5 mL de isopropanol al 100% durante 10 minutos.
- A continuación, se resuspendió varias veces el isopropanol para recoger todo el Oil Red y se transfirió a un microtubo de 1,5 mL.
- Posteriormente se procedió a la lectura de la densidad óptica a 510 nm en un lector de placas. Como blanco se empleó un pocillo vacío teñido con Oil Red que siguió el mismo protocolo de tinción que las muestras, al igual que se realizó con el control (células sin diferenciar).

4.1.1 Diferenciación osteogénica.

Las hHFSCs en pases 12 a 14 se sembraron por triplicado con una densidad de siembra de 12.500 células/cm² en placas de 12 pocillos, y fueron expandidas en medio de cultivo basal DMEM rico en glucosa (cat. N^o: 11965092; Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 30%, hasta alcanzar un 80-90% de confluencia.

Para la diferenciación osteogénica se empleó un medio de inducción un kit de diferenciación de osteogénesis (cat. N^o: A1007201; StemPro™; Gibco), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron cambios de medio cada 3 o 4 días durante 21 días.

Tras la diferenciación, se realizó una tinción con Alizarin Red O (cat. Nº: TMS-008; Sigma-Aldrich) para detectar la formación de nódulos de calcio tras la mineralización de la matriz secretada por los osteoblastos.

El protocolo de tinción utilizado fue el siguiente:

- Tras aspirar el medio empleado para la expansión de las células se procedió a realizar dos lavados con PBS 1X.
- Para fijar la muestra se añadió 1mL de paraformaldehído al 4% (cat. Nº: AR1068; Quimigen) en cada pocillo y se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Tras el periodo de fijación con paraformaldehído, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agua destilada.
- A continuación, y tras retirar el agua, se añadió a cada pocillo 1 mL de Alizarin Red 40mM y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Posteriormente, se eliminó el colorante y se realizó un lavado con agua destilada realizando movimientos suaves. A continuación, se realizaron dos lavados de 10 minutos con agua destilada. Antes de retirar el agua del último lavado se procedió a observar la formación de nódulos de calcio al microscopio. Estos depósitos de calcio se tiñen de un rojo intenso.

Para la cuantificación del colorante retenido en los depósitos de calcio se siguió el siguiente protocolo:

- Tras retirar el agua de los pocillos y dejar secar la placa, se introdujo ésta en el congelador hasta observar la congelación de la superficie de los pocillos.
- Para extraer el colorante se añadieron a cada pocillo 400 μ L de ácido acético al 10% y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación. Tras este periodo se despegaron mecánicamente las células, se transfirió todo el volumen a un microtubo de 1,5 mL y se agitó vigorosamente con un vortex durante al menos 30 segundos, hasta observar la disolución del colorante.
- Tras calentar las muestras a 85 °C durante 10 minutos e incubar posteriormente en hielo durante 5 minutos, se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15-20 minutos.
- A continuación, se transfirieron 40 μ L del sobrenadante a un nuevo microtubo y se neutralizó el ácido acético con hidróxido amónico al 10%.

- Posteriormente se realizó la lectura de la densidad óptica a 405 nm en un lector de placas. Como blanco se empleó un pocillo vacío teñido con Alizarin Red que siguió el mismo protocolo de tinción que las muestras, al igual que se realizó con el control (células sin diferenciar).

4.1.1.1 *Recuperación de medios condicionados inductores de la osteogénesis.*

Para realizar ensayos de inducción osteogénica a partir de los medios condicionados secretados por los osteoblastos, obtenidos tras la diferenciación de las hHF-MSCs, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Tras el periodo de diferenciación osteogénica, antes de proceder a la tinción, y sin realizar ningún lavado previo, se retiró el medio de los pocillos y se llevó a un tubo cónico de 15 ml.
- A continuación, los medios recolectados se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 min y el sobrenadante se empleó para la inducción osteogénica de hHF-MSCs. En caso de no emplearse inmediatamente debe congelarse a -80°C .

4.1.1 Diferenciación condrogénica.

Las hHFSCs en pases 12 a 14 se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos con fondo en "U", con una densidad de siembra de 200.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas.

Para la diferenciación condrogénica se empleó el kit de diferenciación de condrogénesis (cat. Nº: A1007101; StemPro™; Gibco), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron cambios de medio cada 3-4 días durante 21 días.

Tras la diferenciación, se realizó una tinción con Alcian Blue 8GX (cat. Nº: A3157; Sigma-Aldrich) para detectar la producción de proteoglicanos sulfatados, En las células control negativo (sin diferenciar) se puede observar si se produce una tinción azul pálido en estas muestras sin diferenciar, ya que la observación de las células teñidas de azul pálido es indicativo de la presencia de células madre mesenquimales del folículo piloso que, a diferencia de los fibroblastos, son capaces de teñirse con este colorante y con un tono pálido.

El protocolo de tinción utilizado fue el siguiente:

- Tras aspirar el medio empleado para la expansión de las células se procedió a realizar dos lavados con PBS 1X.
- Para fijar la muestra se añadieron 90 μL de paraformaldehído al 4% (cat. Nº: AR1068; Quimigen) a cada pocillo y se mantuvo durante 3 horas a temperatura ambiente y con movimientos en vaivén.
- Tras el periodo de fijación con paraformaldehído, se realizaron 2 lavados con agua destilada.

- A continuación, y tras retirar el agua, se añadió a cada pocillo 80 µL de ácido acético al 3% y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Posteriormente, se añadieron 80 µL de Alcian Blue al 1% durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente y con movimientos de vaivén.
- Tras retirar el colorante se realizaron dos lavados de 10 minutos con una disolución formada con una mezcla de etanol 98% y ácido acético 98% en una proporción 3:2.
- Tras retirar la solución de lavado se añadió PBS 1X y se capturó la imagen al microscopio. Los proteoglicanos sulfatados se tiñen de azul.

Para la cuantificación del colorante se siguió el siguiente protocolo:

- Para recuperar el colorante se añadió SDS al 1% y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante este periodo se recuperó por raspado todo el contenido del pocillo y se transfirió a un microtubo de 1,5 mL. Posteriormente se favoreció la recuperación del colorante mediante agitación vigorosa en el vórtex.
- A continuación, se incubó la muestra a 90 °C durante 1 hora, agitando vigorosamente los microtubos con el vórtex cada 10 minutos.
- Para finalizar, se realizó la lectura de la densidad óptica a 630 nm en un lector de placas. Como blanco se empleó un pocillo vacío teñido con Alcian Blue que siguió el mismo protocolo de tinción que las muestras, al igual que se realizó con el control (células sin diferenciar).

4.2 DIFERENCIACIÓN A LINAJES ENDODÉRMICOS.

La diferenciación a linajes endodérmicos se llevó a cabo para averiguar si en la población hHFSC habían proliferado células madre con potencial pluripotente, debido a la presencia de células Muse en la dermis.

Para llevar a cabo el proceso de diferenciación celular se procedió a sembrar las hHFSCs en pocillos de tipo transwell con un tamaño de poro de 0,4 µm recubiertos con colágeno tipo IV (cat. Nº: CLS3422-48EA; Corning). La diferenciación se realizó según el protocolo de Wong et al. (2012).

Tras la siembra de las hHFSCs en los transwell, la inducción a la diferenciación se llevó a cabo con 100 ng/ml de activina-A (cat. Nº: 338-AC/CF; R&D Systems) y 25 ng/mL de WNT3A (cat. Nº: 5036-WN/CF; R&D Systems) durante 4 días consecutivos en un medio de cultivo Knockout DMEM-F12 sin suero (cat. Nº: A1370801; Gibco) con penicilina / estreptomycin (cat. Nº: 17-602E; Lonza), aminoácidos no esenciales 100X (cat. Nº: 11140-035; Gibco) y 2-mercaptoetanol 0,5 mM (cat. Nº: 31350-010; Gibco). El tratamiento

con activina-A y Wnt3A durante 4 días es suficiente para inducir a endodermo un gran porcentaje de células determinado por la coexpresión de CXCR4 y cKIT, y los factores de transcripción del endodermo *FOXA2* y *SOX17* (Wong et al., 2012).

Tras la diferenciación celular se procedió a analizar la expresión de los marcadores CD117 y CD184 mediante citometría de flujo (apartado 5.2); así como la expresión génica de los genes *FOXA2* y *SOX17* (apartado 6).

5 CITOMETRÍA DE FLUJO.

5.1 ANTÍGENOS DE SUPERFICIE MESENQUIMALES.

Las células hHFSCs fueron sembradas por duplicado y cultivadas con medio completo hasta alcanzar los pases 4, 5 y 6 para analizar sus antígenos de superficie mediante citometría de flujo. Los marcadores analizados fueron: *CD73*, *CD90* y *CD105* (marcadores mesenquimales), *CD14*, *CD34* y *CD45* (no presentes en células madre mesenquimales), definidos por la ISCT (International Society for Cellular Therapy) para la caracterización mesenquimal (Dominici et al., 2006). Para cada muestra y cada control se empleó una concentración de un millón de células por mililitro.

5.1.1 Anticuerpos

Para el estudio de caracterización de los marcadores de superficie se emplearon anticuerpos primarios conjugados con fluorocromo. Los anticuerpos empleados fueron anti-Human CD73 PE (; eBioscience), anti-Human CD90 (Thy-1) FITC (eBioscience), anti-Human CD105 (Enoglin) APC (Cat. Nº: 17-1057-41; eBioscience), anti-Human CD14 FITC (Cat. Nº: 11-0149-41; eBioscience), anti-Human CD34 APC (Cat. Nº: 17-0349-41; eBioscience), anti-Human CD45 PE (Cat. Nº: 12-9459-41; eBioscience) y como control de uniones indeseadas del anticuerpo se empleó Mouse IgG1 K Isotype Control PE (Cat. Nº: 12-4714-41; eBioscience), adquiridos a Fisher Scientific.

La concentración y especificidad de cada anticuerpo estaba validada para la técnica de citometría de flujo, por lo que se siguieron las instrucciones del fabricante, empleándose las concentraciones de anticuerpo indicadas por el mismo.

5.1.2 Muestras y controles

Cada una de las muestras celulares a analizar (10^6 células) fueron teñidas con tres anticuerpos distintos, marcados cada uno con un fluorocromo distinto: PE, APC y FITC. El análisis de antígenos de superficie que fueron teñidos con diferentes anticuerpos que compartían un mismo fluorocromo se llevaron a cabo en ensayos diferentes.

Como controles para cada una de las citometrías realizadas se emplearon tres controles de solapamiento o superposición espectral, un control de isotipo y un control negativo.

5.1.2.1 Controles de superposición espectral

Al llevar a cabo los ensayos de citometría con tres fluorocromos distintos a la vez, los espectros de emisión podrían llegar a solaparse. Esto puede corregirse mediante un proceso de compensación, mediante el que se estima el solapamiento de los espectros y se elimina de la señal total detectada.

Se prepararon tres controles de solapamiento, para cada ensayo de citometría, consistentes en 10^6 células marcadas únicamente con FITC, 10^6 células marcadas sólo con PE y 10^6 células con APC.

5.1.2.2 Controles de isotipo

Los controles de isotipo son anticuerpos con el mismo isotipo que los anticuerpos primarios que empleamos para la caracterización, pero específicos de un antígeno no presente en la muestra. Están diseñados para reconocer moléculas que nunca están presentes en las células de estudio; así, el marcaje que aparezca será únicamente debido a uniones inespecíficas.

La inmunoglobulina IgG1 kappa de ratón monoclonal se emplea como control de isotipos. Esta IgG1 kappa de ratón es segregada por la estirpe celular P3, que tiene una especificidad de unión desconocida y se utiliza como control de isotipos para anticuerpos IgG1 de ratón. Este control de isotipo comparte un isotipo de la IgG con los marcadores de superficie a analizar en las hHFSCs, por lo que se ha empleado este isotipo para detectar si hay señal inespecífica.

5.1.2.3 Control negativo

El control celular negativo consistió en células sin marcar, ya que sirve como control negativo de fluorescencia y nos permitirá, a su vez, detectar la autofluorescencia propia de las hHFSCs. Algunos componentes celulares como el NADPH son capaces de emitir fluorescencia por sí mismos, enmascarando la señal específica del antígeno. La autofluorescencia propia de las células se corrigió mediante compensación.

5.1.2.4 Control de viabilidad celular

Otro de los controles recomendados en citometría de flujo es el de viabilidad celular. Existen marcadores como el yoduro de propidio que discriminan entre células vivas y muertas, siendo éstas últimas las que quedan teñidas con este marcador. Debido a que la señal de fluorescencia del yoduro de propidio interfiere con la fluorescencia emitida por el fluorocromo PE, no se empleó en estos ensayos, siendo analizada la viabilidad de forma paralela con azul tripán en cámara de recuento.

5.1.3 Protocolo de preparación celular para citometría

Las células hHFSCs fueron tripsinizadas durante 5 minutos a 37°C y lavadas con PBS 1X. Tras un segundo lavado con albúmina de suero bovino al 1% en PBS (PBS-BSA), fueron resuspendidas en 100 µL PBS-BSA a una concentración de 10^6 células/mL⁻¹.

Se incubaron 100 µL de cada suspensión celular con 5 µL del anticuerpo primario correspondiente a cada tubo durante 60 minutos en hielo con una exposición mínima a la luz, siendo mezclados suavemente durante el periodo de incubación. En el caso de los anticuerpos marcados con APC, se añadieron 7,5 µL.

Tras el período de incubación se añadieron 2 mL de PBS-BSA y se mezclaron suavemente. Los tubos fueron centrifugados a 1200 rpm durante 5 minutos y, tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 500 µL de PBS 1X. Posteriormente, se procedió al análisis de las muestras en el citómetro de flujo.

En el caso de que el tiempo entre las tinciones y la introducción al citómetro fueran de más de dos horas, se fijaron las células con paraformaldehído al 0,5%, con el fin de estabilizar el marcaje.

5.2 OTROS MARCADORES DE SUPERFICIE NO MESENQUIMALES.

Para el estudio de caracterización de los marcadores CD117 y CD184, se emplearon anticuerpos primarios conjugados con fluorocromo, siguiendo el mismo procedimiento, y con el mismo número de controles, que para el estudio de los antígenos de superficie por citometría de flujo (apartado 5.1).

Los anticuerpos empleados fueron Anti-Human CD117 (c-Kit) PE (Cat. Nº: 12-1171-82; eBioscience) y Anti-Human CD184 (CXCR4) APC (Cat. Nº: 17-9991-82; eBioscience) y, como isotipo control, Mouse IgG2a K Isotype Control APC (Cat. Nº: 47-4724-81; eBioscience).

5.3 FASES DEL CICLO CELULAR.

Las células hHFSCs fueron sembradas por duplicado y cultivadas con medio completo hasta alcanzar los pases 5 y 6 para analizar su ciclo celular mediante citometría de flujo. Para el estudio del ciclo celular se empleó yoduro de propidio (Cat. Nº: 25535-16-4; Sigma).

La preparación de las células para el análisis del ciclo celular se realizó de la siguiente forma:

- Todas las células de las muestras y controles se cultivaron con medio suplementado con lisado de plaquetas humano comercial hasta alcanzar la confluencia celular y se preparó una suspensión de 1 millón de células en 1 mL de PBS 1X.

- Las muestras y los controles fueron fijados con etanol al 70% frío, tras la adición de 4 mL de etanol gota a gota, y con agitación suave. Tras la adición del etanol, se mantuvieron las muestras a 4 °C durante 60 minutos.
- Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS 1X. En el segundo lavado se mantuvo el PBS durante 15 minutos.
- Tras una centrifugación a 1.200 rpm durante 5 minutos se descartó el sobrenadante y se añadieron 250 microg/ mL de RNasa (RNase Cocktail; cat. Nº: 10036284; Invitrogen).
- A continuación, se añadieron 5 µL de yoduro de propidio a las células que se deseaba analizar para tener una concentración de 5 µg/ mL, mientras que las células control no fueron teñidas con ningún reactivo.
- Posteriormente, se añadió PBS 1X hasta completar 1 mL de medio y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora y se analizó su ciclo celular mediante citometría de flujo.

El yoduro de propidio es un intercalante de ADN que permite detectar las células en fase G2/M, siendo éstas dos veces más brillantes, aproximadamente, que las células en fase G0/G1. Para el cálculo del índice de proliferación se aplicó la siguiente fórmula:

$$IP = (S + G2/M) / (G0/G1 + S + G2/M)$$

5.4 APOPTOSIS Y NECROSIS.

El análisis de la apoptosis y de la necrosis en la población hHFSC se llevó a cabo con el kit CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (cat. Nº: C10427; ThermoFisher Scientific). Este kit permite la detección mediante citometría de flujo de las caspasas 3 y 7 en células apoptóticas (caspasa-3/7 CellEvent™) y detecta las células muertas mediante SYTOX™ AADvanced™.

Las células en cultivo fueron lavadas con PBS 1X (Lonza) para su posterior incubación en tripsina 0,25% durante 5 min a 37 °C. El pellet celular fue resuspendido con PBS-BSA (2% en BSA) y se procedió al inmunomarcaje según las especificaciones de la casa comercial: incubación de 10⁶ células/ mL con 1 µL de CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent durante 45 – 60 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Durante los últimos 5 minutos, se añadió 1 µL de SYTOX™ AADvanced™ 1 mM en DMSO y se mezcló suavemente.

Las muestras se analizaron, sin lavarlas ni fijarlas, mediante citometría de flujo, usando una excitación de 488 nm y recolectando la emisión de fluorescencia con un filtro 530/30 BP o equivalente para CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent y un filtro 690/50 BP o equivalente para SYTOX™ AADvanced™ tinción de células muertas. La autofluorescencia de las células se corrigió mediante compensación.

5.5 ANÁLISIS DE DATOS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO.

Los datos de citometría de flujo se obtuvieron con un citómetro Gallios Flow Cytometer con diez colores y tres láseres (Beckman Coulter), y los datos fueron analizados con el Software Summit v4.3 (Dako) y Gallios software v1.2 (Beckman Coulter) en el Servicio General de Investigación SGIker "Servicio de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina" de la UPVEHU, cuyo personal técnico se encarga del análisis de las muestras preparadas para ser introducidas en el citómetro y del procesamiento y análisis de los resultados crudos obtenidos.

6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.

Los ensayos de expresión génica se realizaron para evaluar el potencial de diferenciación de endodermo de la población hHFSC. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (n=3; pases 5-6).

El resto de los resultados de expresión génica mostrados en este trabajo fueron facilitados por el Grupo BIOMICs (UPV/EHU) para el análisis de la caracterización fenotípica y funcional de las hHFSCs, y por IIS BIOARABA para la orientación sobre la obtención de osteoblastos tras la diferenciación osteogénica de las hHFSCs.

6.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

La extracción del ARN total de las células hHFSCs en pases 5 – 6, previamente tripsinizadas y lavadas con PBS 1X, se realizó en mediante el kit RNeasy Mini Kit (cat. Nº: 74104; Qiagen), siguiendo el siguiente procedimiento:

- Previamente a la extracción de RNA se esterilizó mediante autoclave el homogeneizador de células. Para la extracción del RNA se emplearon 1 millón de células. Se lisaron a temperatura ambiente con 600 µL del tampón de lisis del kit de extracción y tras la centrifugación para retirar el PBS, se disgregó el pellet con pequeños movimientos. La mezcla se pasó al homogeneizador durante 1 minuto para lisar las células.
- Tras la lisis, se añadieron 600 µL de etanol al 70%, se mezcló suavemente y se transfirieron a una columna RNeasy spin con tubo de 2ml. Posteriormente, se centrifugó durante 15 segundos a 10.000 rpm y se descartó el eluido.
- Tras añadir 350 µL de buffer RW1 a la columna RNeasy spin, se centrifugó de nuevo a 10.000 rpm durante otros 15 segundos y se descartó el eluato. Este proceso se realizó de nuevo tras la eliminación de ADN.

- Para eliminar cualquier exceso de ADN se añadieron 80 μL de DNase I incubation mix a la columna y se mantuvo en reposo durante 15 min a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se añadieron 500 μL Buffer RPE a la columna y se repitió el proceso de centrifugación, descartando a continuación lo eluido.
- Finalmente, se pasó la columna a un tubo de 1,5 mL libre de RNasas (cat. Nº: AM12400; Ambion) y se incorporaron 30-50 μL de RNase-free water. Tras una centrifugación a 10.000 rpm durante 1 minuto se recuperó la fracción eluida que contenía el ARN extraído y se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La pureza y concentración del ARN total extraído se estimó mediante espectrometría con Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

6.2 OBTENCIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO.

La retrotranscripción se realizó a partir de 1 μg de ARN total mediante la PCR el kit RT2 First Strand Kit (cat. Nº: 330401; Qiagen) con 1 ciclo de 15 minutos a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un ciclo de 5 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. El ADN complementario (cDNA) obtenido se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

6.3 PCR A TIEMPO REAL.

La amplificación de los cDNA se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System.

Las sondas empleadas para la ampliación del cDNA fueron TaqMan Gene 75 rxns SOX17 (cat. Nº: Hs00751752_s1; ThermoFisher Scientific) y TaqMan Gene 75 rxns FOXA2 (cat. Nº: Hs05036278_s1; ThermoFisher Scientific).

Las condiciones de amplificación para los genes *SOX17* y *FOXA2* fueron las establecidas por el fabricante: 1 ciclo de 10 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 ciclos de 15 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 1 minuto a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las muestras se analizaron por triplicado en una placa de PCR de 96 pocillos con sus correspondientes controles de diferenciación negativos. Se usó el gen de referencia (*housekeeping*) *ACTB* (beta-actin) para la normalización de los datos.

Cada gen analizado genera una amplificación a un ciclo umbral (Ct) que se normalizó con el valor medio Ct de los controles *housekeeping* para poder cuantificar la expresión génica. La cuantificación relativa utiliza los valores Ct de las muestras a analizar, de sus controles y de los controles *housekeeping* en el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: Para obtener el valor normalizado del nivel de expresión de cada gen se realizaron los siguientes cálculos:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de estudio} - Ct \text{ gen de referencia}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control}$$

El nivel de expresión diferencial de los genes de estudio se calculó con la siguiente fórmula

$$\text{Fold Change} = 2 - (\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control})$$

Para los análisis estadísticos se consideraron estadísticamente significativos los valores $p < 0,05$.

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos estadísticos descriptivos de los resultados de este trabajo se presentan como media \pm desviación estándar y como mediana, cuartiles 1 y 3 e intervalo de confianza del 95%. Además, en algunos análisis también se presentan los valores máximo y mínimo que, a su vez, quedan representados en todos los gráficos de cajas y bigotes.

En diferentes partes del estudio estadístico, para la comparación de variables que siguen una distribución normal se ha realizado mediante la prueba *t-Student* para dos grupos. Las variables continuas sin una distribución normal se han analizado aplicando la prueba Kruskal-Wallis para la comparación de tres o más grupos, aplicando la corrección de Bonferroni, y la prueba Wilcoxon-Mann-Whitney para la comparación de dos grupos. Finalmente, la estimación de normalidad de las variables se ha establecido haciendo uso de métodos no paramétricos como Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov. Los datos fueron analizados utilizando el lenguaje de programación estadística R, versión 3.6.1. y mediante el software GraphPad (San Diego, California USA, www.graphpad.com)

La realización de los gráficos se llevó a cabo mediante el programa GraphPad. Este software incluye regresión no lineal con funcionalidades para las comparaciones de modelos estadísticos y el desarrollo de modelos predictivos, por lo que también fue utilizado para tal fin.

Las ecuaciones de los modelos de regresión logística describen los procesos de obtención de un éxito como *log odd*. Un *odd* es una forma alternativa de expresar la posibilidad de ocurrencia de un evento de interés o de presencia de una exposición.

Las curvas ROC muestran

la relación entre la habilidad del modelo para clasificar correctamente los casos positivos y los negativos. La proporción de casos positivos se corresponde con la sensibilidad, mientras que la proporción de casos negativos se corresponde como 1-especificidad.

IV. RESULTADOS

1 OBTENCIÓN DE MSCs A PARTIR DE EXPLANTES DE FOLÍCULO PILOSO DE LA REGIÓN OCCIPITAL DEL CUERO CABELLUDO

1.1 EXPLANTES DE FOLÍCULO PILOSO Y CULTIVO PRIMARIO.

Los explantes de folículo piloso procedieron de donantes de la Clínica Dermatológica Ercilla. Se obtuvieron 2 lotes de 10 explantes de folículo piloso cada uno, procedentes de la zona occipital de 12 donantes varones de 21 a 42 años y de una mujer de 47 años (N=12). Estos explantes procedentes de excedentes quirúrgicos obtenidos de la región occipital del cuero cabelludo fueron aportados con el tejido circundante microdisecionado. Tras su recepción en el laboratorio fueron lavados cuidadosamente con PBS 1X suplementado con un 10% de antibiótico penicilina/estreptomicina. En la Figura 13 se muestra un pocillo con 5 explantes previamente lavados para iniciar el cultivo primario (Figura 13 - A) y la imagen ampliada de algunos explantes (Figura 13 - B).

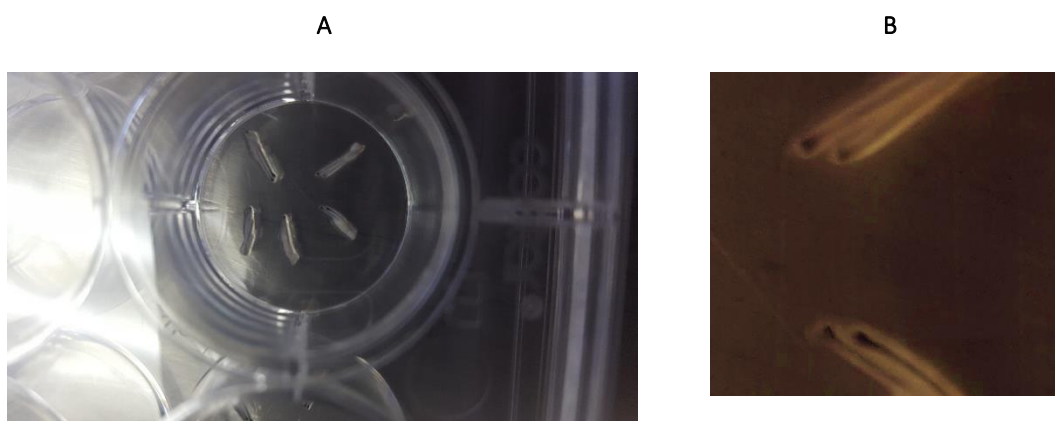


Figura 13. Explantes de folículo piloso. A) pocillo de una placa de 12 pocillos con 5 explantes. B) Folículos pilosos. El tamaño real de los explantes fue de alrededor de 3 mm de largo.

1.1.1 Aislamiento y enriquecimiento de MSCs de folículo piloso.

Al conjunto de células adherentes que se aíslan y proliferan de explantes de folículo piloso las hemos denominado células estromales derivadas de folículo piloso humano (hHFSCs), hasta su caracterización como hHF-MSCs (células madre mesenquimales del folículo piloso humano). Hay que tomar en consideración el hecho de que otras poblaciones celulares multipotentes, que comparten nicho con las hHF-MSCs, y que se encuentran también en otros nichos asociados al folículo piloso y tejidos circundantes, podrían ser aisladas conjuntamente con las hHF-MSCs y confundirse con ellas ya que también cumplen los criterios mínimos propuestos por la International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) para la definición de MSCs.

La selección de células mesenquimales que se aislaron de los explantes de folículo piloso se llevó a cabo de acuerdo con: a) su capacidad para migrar y adherirse a la superficie del frasco de cultivo, y b) con su capacidad de proliferación en función del medio de cultivo empleado. En la Figura 14 se representan los métodos de selección de hHF-MSCs. Como método de enriquecimiento en MSCs derivadas del folículo piloso, y para evitar la adhesión de células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural (SDSCs) localizadas en el bulge, se utilizaron frascos de cultivos sin recubrimientos proteicos y no se suplementó el medio con insulina-transferrina-selenio (ITS).

Durante el proceso de aislamiento y expansión se favoreció la presencia de hHF-MSCs para posteriormente caracterizarlas y analizar la adecuación específica de este tipo celular en futuros ensayos de terapia celular. La proliferación de hHF-MSCs se favoreció mediante el empleo de un lisado de plaquetas humano comercial (HPL), que contiene al menos seis de los principales factores de crecimiento FGF2, PDGF, VEGF, EGF, TGF- β e IGF-1, como suplemento del medio basal DMEM rico en glucosa. Aunque el HPL pueda favorecer el aislamiento de otras poblaciones celulares distintas de MSCs, el porcentaje añadido (30%) fue superior al que habitualmente se emplea para el aislamiento y expansión de poblaciones celulares distintas a MSCs, como los fibroblastos dérmicos, progenitores epidérmicos o queratinocitos (10-20% de suero). El empleo de un 30% de suero como suplemento al medio basal de cultivo demostró una proliferación más eficiente de las hHF-MSCs ((datos obtenidos por el Grupo BIOMICS UPV/EHU).

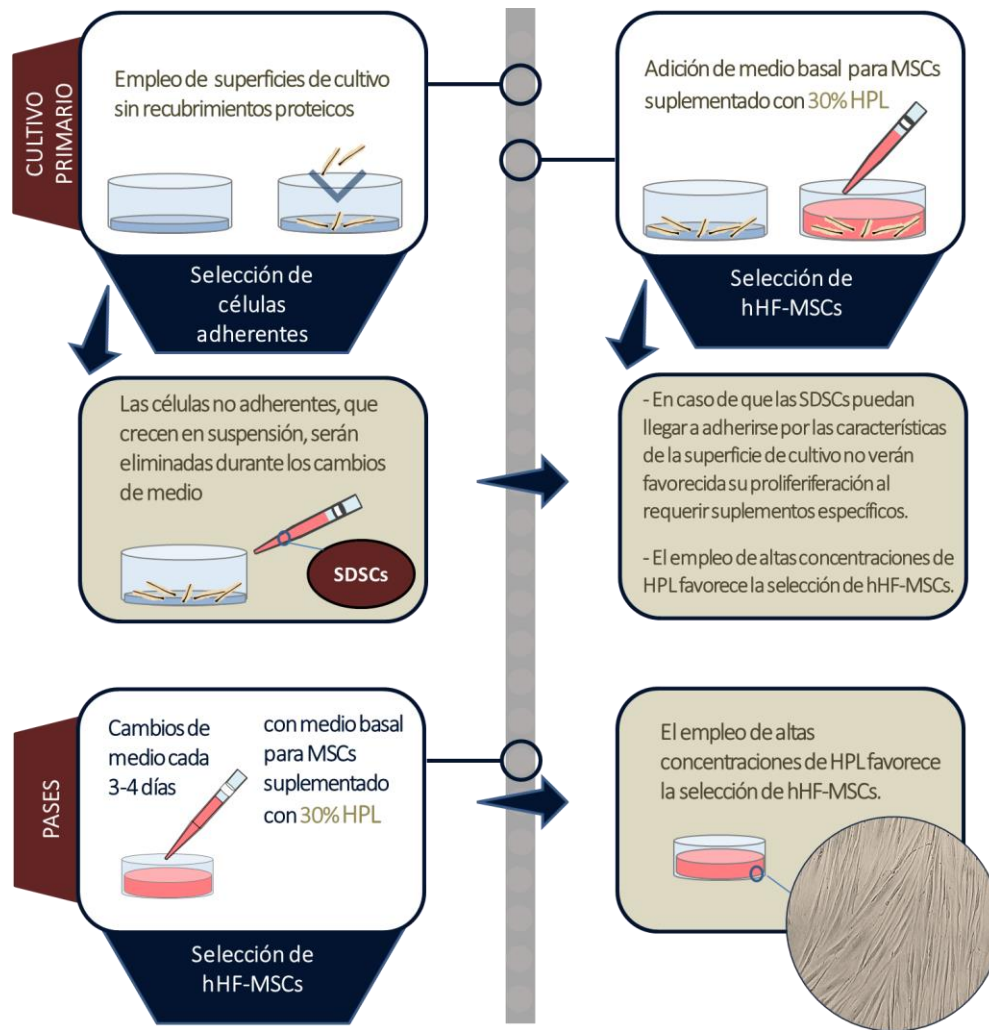


Figura 14. Esquema de los métodos de selección de hHF-MSCs a partir de explantes de folículo piloso y durante la expansión en el cultivo primario y posteriores pases (N=12; por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años). hHFSCs (células estromales adherentes derivadas de folículo piloso humano); hHF-MSCs (células madre mesenquimales de folículo piloso humano); SDSCs (células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural, localizadas en el bulge); HPL (lisado de plaquetas humano comercial). Los cultivos se mantienen en incubación a 37 °C, con un 5% de CO₂ y en condiciones de humedad.

La expansión celular se realizó hasta alcanzar al menos el tercer pase antes de proceder a estudios de caracterización para disminuir la heterogeneidad de la población hHF-MSCs.

1.1.2 Obtención de células adherentes a partir de explantes.

Con el objetivo de obtener MSCs a partir de los explantes primarios se sembraron 10 explantes de cada uno de los 12 donantes (5 explantes por pocillo en placas de 12 pocillos, y por duplicado) con medio de cultivo suplementado con un lisado de plaquetas humano comercial (HPL). Los 10 explantes restantes se cultivaron con suero heterólogo procedente de donantes (HS) como aporte de factores de crecimiento (Figura 15) para estudiar el efecto de este suero en el aislamiento y la capacidad proliferativa de las hHFSCs tras el cultivo primario y primer pase, frente al empleo de HPL, con el objetivo de optimizar la obtención y expansión de estas células.

El cultivo de cinco explantes por pocillo se realizó para facilitar la manipulación y su adherencia a la superficie de cultivo durante los procesos de lavado y de cambios de medio requeridos para favorecer el enriquecimiento de las hHFSCs. Sin embargo, durante dichos procesos, alrededor de un 40% de los explantes se desprendió de la superficie del frasco de cultivo en alguna ocasión, independientemente del suero empleado como suplemento al medio de cultivo. En la Tabla 5 se detalla el número de explantes de folículo piloso obtenidos por cada donante y el número de explantes de los que se consiguió aislamiento de células adherentes durante el cultivo primario.

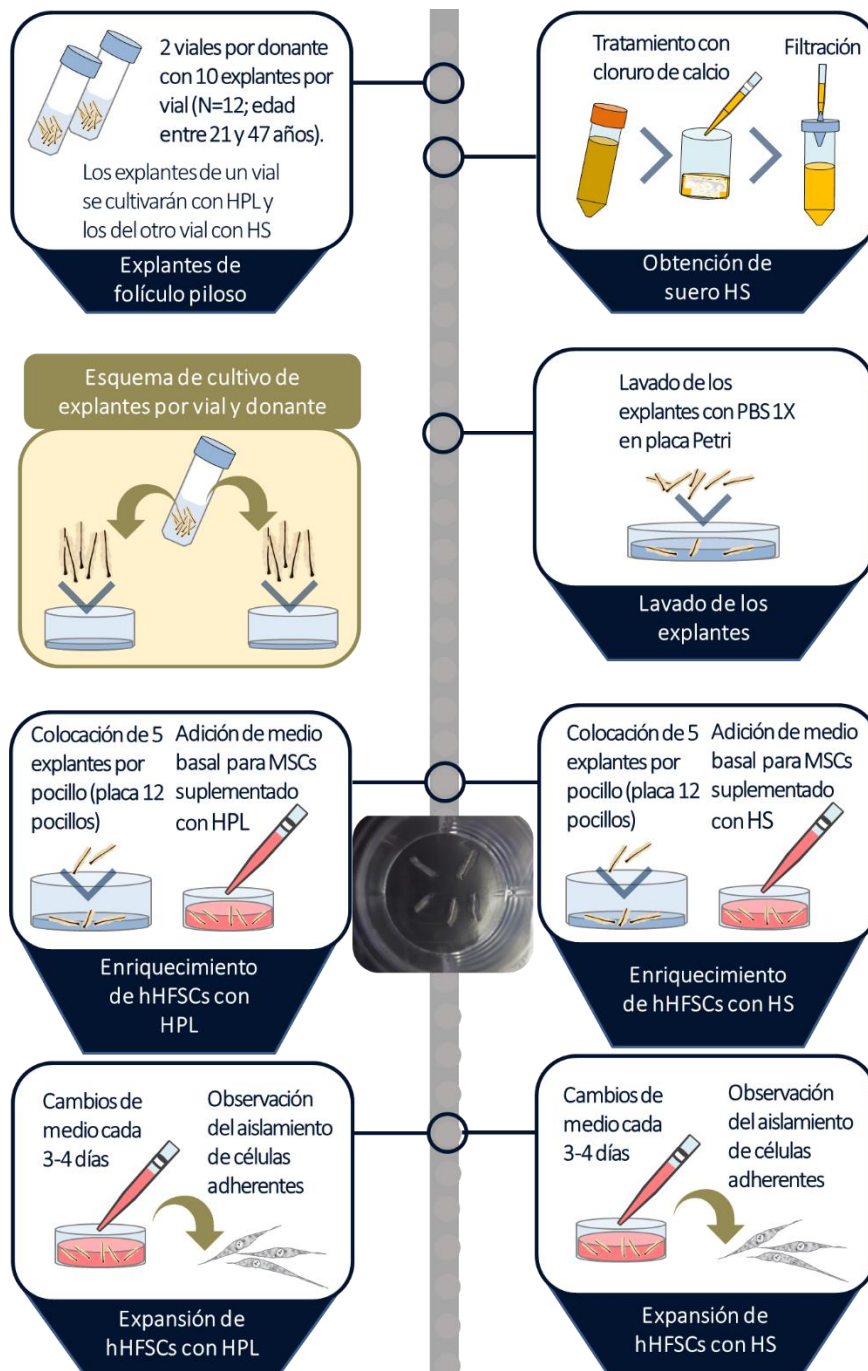


Figura 15. Diseño experimental del aislamiento y enriquecimiento de hHFSCs durante el cultivo primario. De cada donante se obtuvieron 2 viales (10 unidades foliculares por vial). En la figura se representa el proceso de cultivo para el aislamiento de hHFSCs (células estromales adherentes derivadas del folículo piloso humano) mediante el

empleo de un lisado de plaquetas humano comercial (HPL) (N=12; edad de los donantes entre 21 y 47 años) y mediante suero heterólogo (HS) (N=10; edad de los donantes entre 21 y 47 años). En cada pocillo (placa 12 pocillos) se siembran 5 unidades foliculares (por duplicado). Los explantes se mantienen en cultivo, durante al menos dos semanas en incubación a 37 °C, con un 5% de CO₂ y en condiciones de humedad, hasta alcanzar un 80-90% de confluencia.

Tabla 5. Donantes de explantes de folículo piloso por edad y sexo en cultivo para el aislamiento de células estromales. Los explantes donantes pertenecen a 11 varones de edades comprendidas entre los 21 y los 42 años y una mujer de 47 años. En la Tabla pueden observarse el número de explantes que permanecieron adheridos durante el cultivo primario.

Sexo	Edad	Referencia	Nº explantes inicial	Nº de explantes adheridos
Varón	21	V21	10	6
			10	6
Varón	25	V25	10	9
			10	8
Varón	30	V30	10	5
			10	6
Varón	30	V301	10	6
			10	5
Varón	31	V31	10	8
			10	7
Varón	35	V35	10	6
			10	5
Varón	36	V36	10	8
			10	7
Varón	36	V361	10	7
			10	6
Varón	40	V40	10	6
			10	5
Varón	41	V41	10	5
			10	6
Varón	42	V42	10	7
			10	8
Mujer	47	M47	10	7
			10	6

Durante el cultivo primario se observó que las células migraban fuera del explante primario, independientemente del empleo de HPL o HS como suplemento al medio de cultivo basal, desde la región peribulbar, la papila dérmica y la vaina dérmica del folículo piloso, y se expandían en monocapa adheridas a la superficie del frasco de cultivo (Figura 16). En la Figura 16-F se observa esta capacidad de migración sobre la superficie del pocillo y la alta confluencia alcanzada por las hHFSCs tras el cultivo primario.

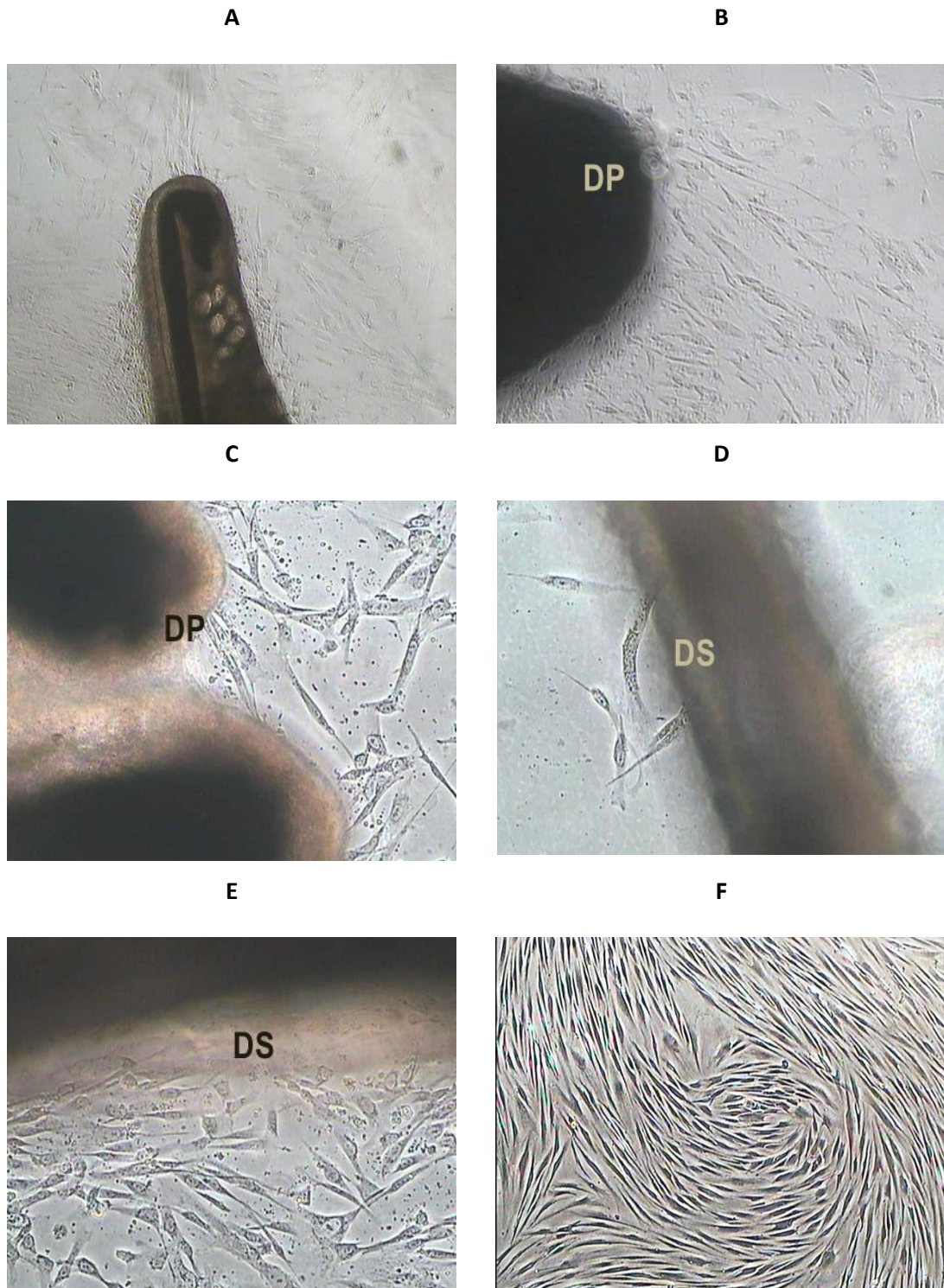


Figura 16. Imágenes obtenidas por microscopia de contraste de fase de los pocillos donde se sembraron los explantes, que muestran el aislamiento y migración de hHFSCs adherentes (células estromales derivadas de explantes de folículo piloso). Las imágenes han sido obtenidas entre los días 7-9 (A-E) y el día 20 (F). Migración desde el explante primario: Aumentos 4X (A-B); 20X (C-E). En la figura C se observan dos unidades foliculares pertenecientes a un único explante. F) Expansión de las hHFSCs hasta alcanzar la confluencia. Esta imagen ilustra la capacidad de migración de las MSCs (Aumentos 4X). La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de $720 \times 576 \mu\text{m}^2$. DP: zona de la papila dérmica, en la que puede observarse la región peribulbar; DS: vaina dérmica.

1.1.3 Expansión de hHFSCs con HPL durante el cultivo primario.

Los explantes de folículos pilosos humanos de los 12 donantes fueron cultivados durante al menos dos semanas hasta alcanzar un 90% de confluencia (Figura 15). Pese al desprendimiento de algunos explantes durante el cultivo primario, se aislaron hHFSCs para cada uno de los 12 donantes, aunque se observó en algunas réplicas una baja expansión celular que causó la obtención de una confluencia celular inferior al 25% (alrededor de 1.500 células viables/cm²) e incluso la pérdida del cultivo (Tabla 6-A).

El número de hHFSCs adherentes aisladas y expandidas durante el cultivo primario con HPL fue de $3,32 \times 10^5$ células totales (valor correspondiente a la mediana, con un intervalo de confianza del 95% de $1,81 \times 10^5$ a $4,75 \times 10^5$) de las cuales $9,80 \times 10^4$ fueron células viables (I.C. del 95% de $7,03 \times 10^4$ a $1,23 \times 10^5$), presentando una viabilidad del 25,98% (I.C. del 95% de 22,97 – 35,58) en los cultivos primarios de los 12 donantes de edades comprendidas entre los 21 y los 47 años (Tabla 6-B). En la Figura 17 se representan los valores estadísticos descriptivos y la dispersión de los datos obtenidos tras el recuento del número de células totales y viables de cada cultivo primario. Los rangos intercuartílicos observados en cada uno de los recuentos mostraron menor amplitud en los recuentos de células viables (Tabla 6-B; Figura 17), lo que indica una menor dispersión de los datos y, por tanto, una mayor uniformidad en los resultados respecto al número de células totales obtenidas del cultivo primario. Asimismo, el análisis de la dispersión de los recuentos de células viables mostró un mayor número de cultivos con recuentos de entre $9,80 \times 10^4$ y $1,24 \times 10^5$ células (rango de la caja menos amplio y por tanto con menor dispersión de datos). Respecto a los valores máximos y mínimos del recuento de células, estos vienen representados por los bigotes del gráfico, no observándose valores atípicos (*outliers*) en los resultados.

Considerando un promedio de 6 folículos por donante y réplica (los datos del número de folículos que se mantuvieron adheridos a la superficie del frasco de cultivo durante el cultivo primario se muestran en la Tabla 5), se ha estimado que se obtienen $5,53 \times 10^4$ células totales y $1,63 \times 10^4$ células viables por folículo durante 20,50 días de duración del cultivo primario (I.C. del 95% de 20 a 23) (Tabla 6-B).

Tabla 6. Obtención de hHFSCs expandidas con lisado de plaquetas humano comercial (HPL) en el cultivo primario. A) Cultivos primarios proliferantes y no proliferantes obtenidos tras la expansión celular con HPL.; B) Datos estadísticos descriptivos del recuento de hHFSCs totales y viables obtenidas en el cultivo primario con HPL, junto con el análisis de la duración en días del cultivo.

8 – A Donantes	Cultivos proliferantes (confluencia celular alcanzada $\geq 25\%$)	Cultivos no proliferantes (confluencia celular alcanzada: $< 25\%$)	Cultivos no proliferantes (pérdida del cultivo)
V21	X		
V25	X		
V30	X		
V301	X		X
V31	X		X
V35	X		X
V36	X	X	
V361	X		X

8 – A Donantes	Cultivos proliferantes (confluencia celular alcanzada $\geq 25\%$)	Cultivos no proliferantes (confluencia celular alcanzada: $< 25\%$)	Cultivos no proliferantes (pérdida del cultivo)
V40			X
V41	X		X
V42	X		
M47	X		X

8 – B	hHFSCs Totales	hHFSCs Viables	Viabilidad (%)	Duración del cultivo (días)
Promedio \pm SD	$3,39 \times 10^5 \pm 1,96 \times 10^5$	$9,01 \times 10^4 \pm 3,75 \times 10^4$	$29,40 \pm 9,59$	$20,11 \pm 3,66$
Mediana	$3,32 \times 10^5$	$9,80 \times 10^4$	25,98	20,50
Moda	$4,85 \times 10^5$	$3,52 \times 10^4$	25,97	20,00
Q1	$1,77 \times 10^5$	$6,91 \times 10^4$	22,42	20,00
Q3	$4,75 \times 10^5$	$1,24 \times 10^5$	35,58	23,00
Mínimo	$9,04 \times 10^4$	$2,01 \times 10^4$	13,31	14,00
Máximo	$9,09 \times 10^5$	$1,36 \times 10^5$	49,85	27,00
Rango intercuartílico	$2,97 \times 10^5$	$5,46 \times 10^4$	36,54	13,00
I. C. (95%)	$1,81 \times 10^5 - 4,75 \times 10^5$	$7,03 \times 10^4 - 1,23 \times 10^5$	22,97 – 35,58	20,00 – 23,00
p-valor respecto a hHFSCs totales		< 0.0001		

Los cultivos no proliferantes alcanzaron una densidad celular inferior al 25% (~ 1.500 células/cm²) tras 3 semanas de cultivo y/o su estado no proliferativo concluyó en una pérdida del cultivo (N = 12, por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años). Todos los cultivos se realizaron empleando HPL como suplemento del medio de cultivo. SD: desviación estándar; Q1 y Q3: cuartiles 1 y 3; I.C.: intervalo de confianza del 95% para la mediana.

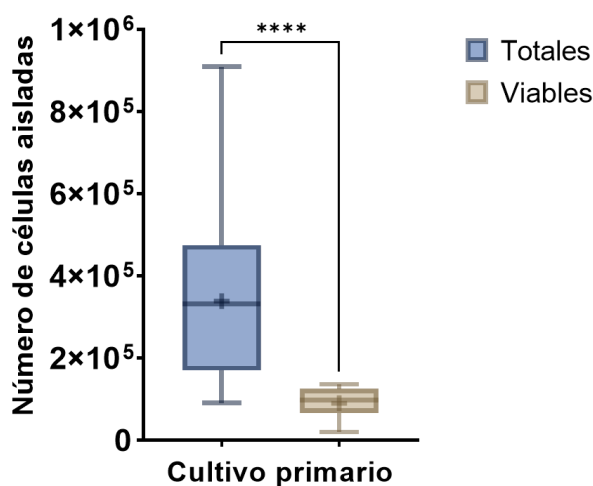


Figura 17. Representación de la dispersión de los resultados obtenidos tras el recuento del número de hHFSCs adherentes totales y viables obtenidas en los cultivos primarios con lisado de plaquetas humano comercial (HPL) como suplemento al medio basal de cultivo (N=12, por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años). El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (+), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). El recuento de células totales y viables muestra diferencias estadísticamente significativas (**** $p < 0,0001$; test Mann-Whitney).

1.1.4 Efecto del suero heterólogo en la expansión de hHFSCs durante el cultivo primario.

En el aislamiento de hHFSCs, tal y como se ha descrito previamente en la Figura 15, se empleó un lisado de plaquetas humano comercial (HPL) y de forma simultánea e independiente, se llevó a cabo el aislamiento de hHFSCs con suero heterólogo (HS) (N = 10; por duplicado), siguiendo el esquema de la Figura 15 para analizar si la expansión de las hHFSCs se ve afectada por el empleo de otros sueros humanos no comerciales durante el cultivo primario.

Con el objetivo de valorar la eficiencia del empleo de suero heterólogo en el aislamiento y proliferación celular de las hHFSCs, se analizó la densidad celular alcanzada y la viabilidad obtenida durante el cultivo primario (Figura 18) y se comparó con los resultados obtenidos tras la expansión celular con HPL (Tabla 7). Al igual que la expansión celular con HPL, con suero HS también se obtuvieron cultivos con una baja expansión celular que causó la obtención de una confluencia celular inferior al 25% (densidad celular alcanzada alrededor de 1.500 células viables/cm²) e incluso la pérdida del cultivo (Tabla 7-A). No obstante, la obtención de hHFSCs viables fue similar con ambos sueros. Tras la expansión celular durante el cultivo primario con suero HS se obtuvo un rendimiento de $6,78 \times 10^4$ células por donante (intervalo de confianza del 95% de $2,51 \times 10^4$ a $1,51 \times 10^5$), mientras que con el empleo de HPL se obtuvieron $1,11 \times 10^5$ células (I.C. del 95% de $6,53 \times 10^4$ a $1,26 \times 10^5$), sin diferencias estadísticamente significativas en cuanto al uso de ambos tipos de suero (Tabla 7-B). El porcentaje de células viables tras la confluencia del cultivo primario fue de 18,60% (I.C. del 95% de 13,12 a 42,82) y 25,92% (I.C. del 95% de 22,97 a 35,47) para cultivos expandidos con HS y HPL, respectivamente; las diferencias observadas no alcanzaron significación estadística (Tabla 7-C).

En la Figura 18 se representan los valores estadísticos descriptivos y la dispersión de los datos obtenidos tras el recuento del número de células viables de cada cultivo primario. En cuanto a las hHFSCs que se aislaron y expandieron con suero heterólogo (HS) se observó un rango intercuartílico superior al obtenido para células expandidas con suero HPL (Tabla 7-B; Figura 18-A), lo que indica que con el empleo de suero HPL se observó una menor dispersión de los datos y, por tanto, una mayor uniformidad en los resultados respecto al empleo de suero HS.

Por otra parte, las células aisladas y expandidas con HS de tres de los donantes mostraron un elevado porcentaje de viabilidad celular (60,94 – 83,43%), en comparación con la viabilidad conseguida con el empleo de suero HPL como suplemento del medio de cultivo de 25,92% (22,79; 35,47). Este aumento en el porcentaje de viabilidad con el uso de HS no pudo correlacionarse con la edad de los donantes, por lo que se consideró que el aumento observado era debido a variaciones en el suero heterólogo. Por esta razón, aunque el suero HS potencia la proliferación celular de hHFSCs, un suero heterólogo comercial más estandarizado, como el suero HPL, puede ofrecer resultados menos variables.

Tabla 7. Obtención de hHFSCs en el cultivo primario. A) Cultivos primarios proliferantes y no proliferantes obtenidos tras la expansión celular con suero heterólogo (HS).; B) Datos estadísticos descriptivos calculados a partir del recuento de hHFSCs viables (B) y del porcentaje de viabilidad (C) en el cultivo primario.

9 – A	Donantes	Cultivos proliferantes (confluencia celular alcanzada $\geq 25\%$)	Cultivos no proliferantes (confluencia celular alcanzada: $< 25\%$)	Cultivos no proliferantes (pérdida del cultivo)
	V21	X		
	V30		X	X
	V301	X		
	V31	X		X
	V35		X	
	V361	X		X
	V40	X		
	V41	X		X
	V42		X	
	M47		X	X

9 – B Células viables	Suero HPL	Suero HS
Promedio \pm SD	$9,21 \pm 3,92 \times 10^4$	$7,60 \pm 4,95 \times 10^4$
Mediana	$1,11 \times 10^5$	$6,78 \times 10^4$
Q1	$5,78 \times 10^4$	$2,89 \times 10^4$
Q3	$1,26 \times 10^5$	$1,16 \times 10^5$
Mínimo	$2,01 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$
Máximo	$1,36 \times 10^5$	$1,56 \times 10^5$
Rango intercuartílico	$1,16 \times 10^5$	$1,46 \times 10^4$
I. C. (95%)	$6,53 \times 10^4 - 1,26 \times 10^5$	$2,51 \times 10^4 - 1,51 \times 10^5$
p-Valor	$> 0,999$	

9 – B Viabilidad (%)	Suero HPL	Suero HS
Promedio \pm SD	$29,38 \pm 9,58$	$28,40 \pm 23,03$
Mediana	25,92	18,60
Q1	22,42	13,37
Q3	35,47	38,92
Mínimo	13,31	9,26
Máximo	49,85	83,43
Rango intercuartílico	36,54	74,17
Intervalo de confianza (95%)	22,97 – 35,47	13,12 – 42,82
p-Valor	$> 0,999$	

Los cultivos no proliferantes alcanzaron una densidad celular inferior al 25% (~ 1.500 células/cm²) tras 3 semanas de cultivo y/o su estado no proliferativo concluyó en una pérdida del cultivo (N = 10, por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años), tras el empleo de dos tipos de suero humano: HPL (lisado de plaquetas humano comercial) y HS (suero heterólogo obtenido de donantes). SD: desviación estándar; Q1 y Q3: cuartiles 1 y 3; I.C.: intervalo de confianza del 95% para la mediana

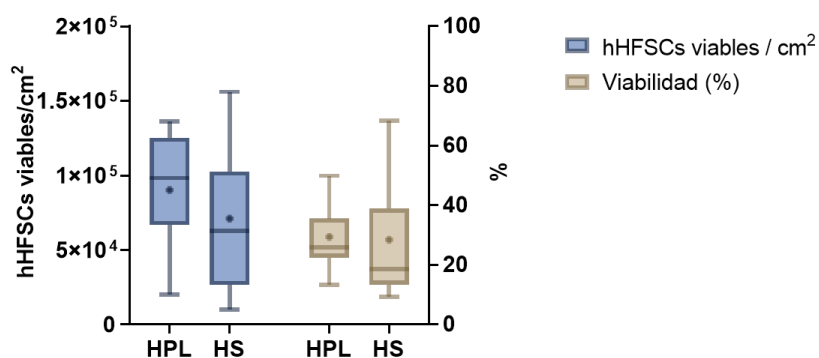


Figura 18. Densidad de hHFSCs viables (células/cm²) y viabilidad celular en porcentaje tras el cultivo primario de hHFSCs expandidas con suero humano heterólogo (HS) y con un lisado de plaquetas humano comercial (HPL); (N=10, por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años). El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (·), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). No se observan diferencias significativas; test Mann-Whitney.

1.1.5 Efecto de la edad de los donantes de explantes de folículo piloso en la expansión de hHFSCs durante el cultivo primario.

Una tasa de proliferación alta en MSCs está relacionada con un potencial de diferenciación a linajes mesodérmicos más fuerte. Por ello, Hemos investigado el efecto de la edad en el aislamiento de las hHFSCs a partir de explantes de folículo piloso y su tasa de proliferación para proporcionar conocimiento sobre el uso de estas células estromales en terapias de reparación autóloga.

Para valorar si la edad de los donantes de folículo piloso pudiera ser un factor para tener en cuenta a la hora de emplear células autólogas en terapia celular, hemos estudiado la viabilidad de hHFSCs obtenida tras el cultivo primario en dos grupos de edad: “menores de 20 años” (de 21 a 35) y “mayores de 35 años” (de 36 a 47 años). Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos de edad, ni en cuanto al número de células viables obtenidas, ni respecto al porcentaje de viabilidad (Tabla 8, Figura 19). Sin embargo, se observó alta diversidad, como indica la elevada dispersión de los resultados obtenidos observada mediante los gráficos de cajas y bigotes de la Figura 19. Tras analizar las incidencias observadas durante el cultivo primario se observó que la pérdida de cultivos se produjo en donantes con una edad superior a 25 años (Tabla 9), lo que parece señalar la importancia de la edad de los donantes.

Tabla 8. Resultados de los recuentos celulares por grupos de edad obtenidos en el cultivo primario.

		Grupo < 35 años	Grupo > 35 años	p-valor
Número de células viables	Promedio ± SD	8,43 ± 4,44 × 10 ⁴	8,26 ± 4,78 × 10 ⁴	> 0,999
	Mediana (Q1; Q3)	8,04 × 10 ⁴	8,51 × 10 ⁴	
	I.C. (95%)	(4,52 × 10 ⁴ ; 1,21 × 10 ⁵)	(3,52 × 10 ⁴ ; 1,24 × 10 ⁵)	
		(4,52 × 10 ⁴ ; 1,21 × 10 ⁵)		
Viabilidad (%)	Promedio ± SD	29,45 ± 19,83	25,73 ± 10,46	> 0,999
	Mediana (Q1; Q3)	21,64	25,72	
	I.C. (95%)	(15,25; 39,33)	(16,92; 30,10)	
		(17,19; 36,56)	(15,49; 30,43)	

n=6 para cada grupo; por duplicado. Los datos se expresan como promedio \pm SD (desviación estándar) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% (I.C.). No se observan diferencias significativas; test Mann-Whitney.

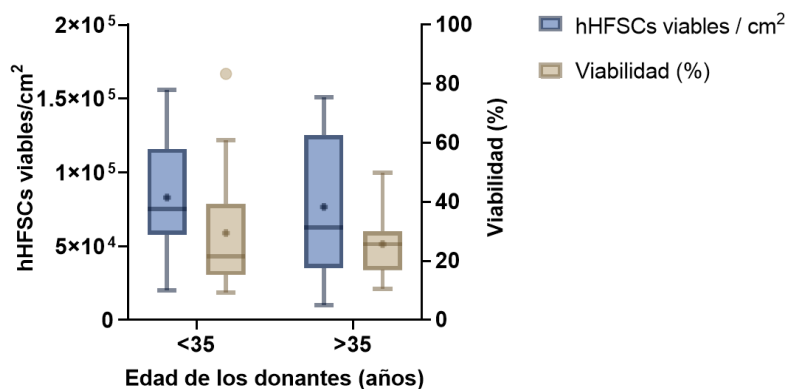


Figura 19. Densidad de hHFSCs viables (células/cm²) y viabilidad celular en porcentaje obtenidas durante el cultivo primario según rangos de edad (N=6, por duplicado para cada grupo de edad). El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (·), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Los valores atípicos se representan con un círculo. No se observan diferencias significativas; test Mann-Whitney.

Tabla 9. Porcentaje de cultivos primarios de hHFSCs que presentan incidencias en la proliferación (confluencia celular alcanzada inferior al 25% y/o pérdida del cultivo) según la edad y tipo de suero como suplemento al medio de cultivo.

Edad de los donantes	Cultivos expandidos con HPL (%)	Cultivos expandidos con HS (%)
21	0	0
25	0	N/D
30	25	50
31	50	50
35	50	100
36	50	50
40	100	0
41	100	50
42	0	100
47	50	100

n=12; por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años). HPL (lisado de plaquetas humano comercial); HS (suero heterólogo).

1.2 EXPANSIÓN DE hHFSCs DURANTE EL PRIMER PASE.

1.2.1 Efecto del empleo de HPL y HS en la duplicación de hHFSCs durante el primer pase.

A pesar la alta variabilidad observada en los cultivos primarios suplementados con suero heterólogo (HS), se procedió a realizar el primer pase y a analizar las cinéticas de crecimiento de las hHFSCs expandidas con suero HS, y compararlas con las observadas en células expandidas con suero HPL (expandidas con lisado de plaquetas humano comercial como suplemento al medio basal de cultivo).

Las hHFSCs adherentes obtenidas tras el cultivo primario procedentes de cada pocillo de cada donante fueron tratadas con tripsina-EDTA para destruir las proteínas transmembranales de adhesión y resuspender las células para su posterior siembra (pase 1).

Tras la tripsinización las hHFSCs adherentes procedentes de cada pocillo de cada donante (N=12; edad de los donantes entre 21 y 47 años) se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie con una densidad de siembra de 1.500 a 5.000 hHFSCs viables/cm² (Figura 20), según la disponibilidad de células adherentes viables tras el cultivo primario, para favorecer la duplicación de las MSCs presentes en la población hHFSC según las recomendaciones de Nekanti et al. (2010) y Fossett & Khan (2012).

Al igual que en el cultivo primario, durante el primer pase se observó una baja expansión celular en algunos cultivos. La baja proliferación tuvo como consecuencia confluencias celulares inferiores al 25% (densidad celular por debajo de 1.500 células viables/cm²) e incluso la pérdida de algunos cultivos (Tabla 10-A).

Tras analizar los datos de la duplicación de la población celular en pase 1 se observaron diferencias significativas entre los valores de duplicación de la población (PD) y tiempo de duplicación de la población (PDT) en las poblaciones de hHFSCs HPL y HS-expandidas. La duplicación de la población de hHFSCs expandida con HPL fue significativamente superior (4,73 con un intervalo de confianza del 95% de 3,93 a 5,15) a la duplicación obtenida tras la expansión con suero HS (2,93 [I.C. del 95% de 2,78 a 4,56]). Asimismo, el tiempo de duplicación fue significativamente inferior para las hHFSCs HPL-expandidas (23,80 horas [I.C. del 95% de 19,63 a 29,99 h]), frente al PDT mostrado por las hHFSCs HS-expandidas (40,99 horas [I.C. del 95% de 29,90 a 43,13]), por lo que el suero HPL mostró una eficiencia significativamente mayor para promover la proliferación de las hHFSCs durante el primer pase tras el cultivo primario (Tabla 10-B; Figura 21).

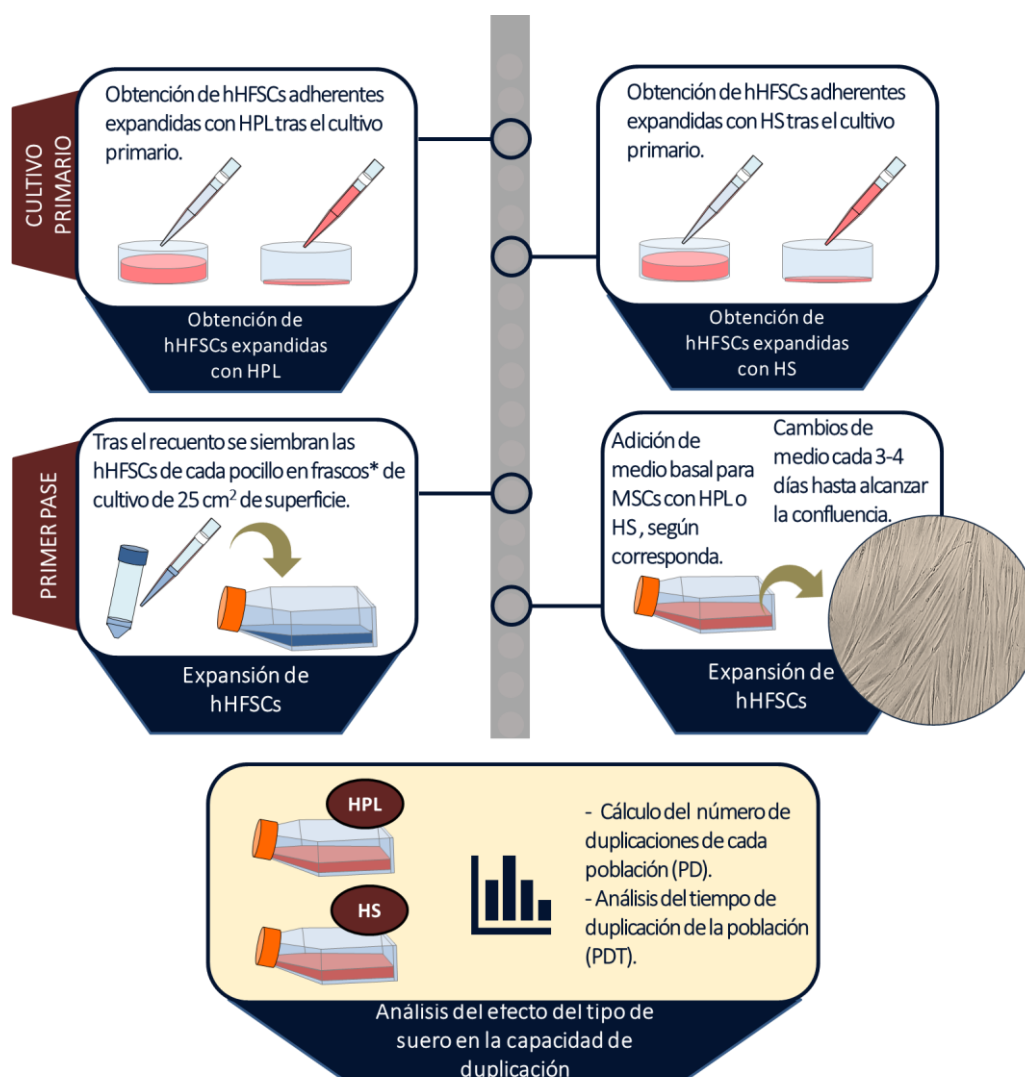


Figura 20. Diseño experimental de la capacidad de duplicación en el primer pase según el tipo de suero empleado en la expansión de hHFSCs obtenidas tras el cultivo primario (N=12; por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años). Las células expandidas con HPL durante el cultivo primario continúan su expansión con este lisado de plaquetas durante el primer pase; mientras que las células HS-expandidas se cultivan con suero HS. hHFSCs (células estromales derivadas de folículo piloso humano); HPL (lisado de plaquetas humano comercial); HS (suero heterólogo). En la Figura se simplifica el pase a un frasco de cultivo de 25 cm², sin embargo, se emplearon diversos frascos de cultivo* para permitir una densidad de siembra de 1.500 a 5.000 células/cm², según disponibilidad de hHFSCs adherentes viables procedentes del cultivo primario). Condiciones de incubación: 37 °C, 5% de CO₂ y humedad.

Tabla 10. Obtención de hHFSCs obtenidas en el primer pase con dos tipos de suero: HPL (lisado de plaquetas humano comercial) y HS (suero heterólogo). A) Porcentaje de cultivos primarios proliferantes y no proliferantes.; B) Valores PD (duplicaciones de la población) y PDT (tiempo de duplicación de la población).

12 – A Donantes	Cultivos proliferantes (densidad celular alcanzada ≥25%)		Cultivos no proliferantes (densidad celular alcanzada: <25%)		Cultivos no proliferantes (pérdida del cultivo)	
	HPL (%)	HS (%)	HPL (%)	HS (%)	HPL (%)	HS (%)
V21	100	100				
V25	100	N/D		N/D		N/D
V30	75	50	25	50		
V301	75		25	50		50
V31	100	75		25		

12 – A		Cultivos proliferantes (densidad celular alcanzada $\geq 25\%$)		Cultivos no proliferantes (densidad celular alcanzada: $< 25\%$)		Cultivos no proliferantes (pérdida del cultivo)	
Donantes							
V35		25	25	25		50	75
V36		100	N/D		N/D		N/D
V361		25	50	75	50		
V40				50	50	50	50
V41			50	50	50	50	
V42				50		50	100
M47				50		50	100

12 – B		Suero HPL	Suero HS	p-Valor respecto a HPL
PD	Promedio \pm SD	4,63 \pm 0,74	3,41 \pm 0,73	0,0008
	Mediana (Q1; Q3)	4,73 (3,93; 5,15)	2,93 (2,83; 4,01)	
	I.C. (95%)	(3,93; 5,15)	(2,78; 4,56)	
PDT (h)	Promedio \pm SD	26,29 \pm 8,52	36,94 \pm 6,61	0,0024
	Mediana (Q1; Q3)	23,80 (19,63; 29,99)	40,99 (31,29; 42,36)	
	I.C. (95%)	(19,63; 29,99)	(29,90; 43,13)	

Los cultivos no proliferantes alcanzaron una densidad celular inferior al 25% (~ 1.500 células/cm²) tras 3 semanas de cultivo y/o su estado no proliferativo concluyó en una pérdida del cultivo. Población hHFSCs expandida con HPL (N=12, por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años) y HS; (N=10, por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años). Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95%. No se observan diferencias significativas; test Mann-Whitney.

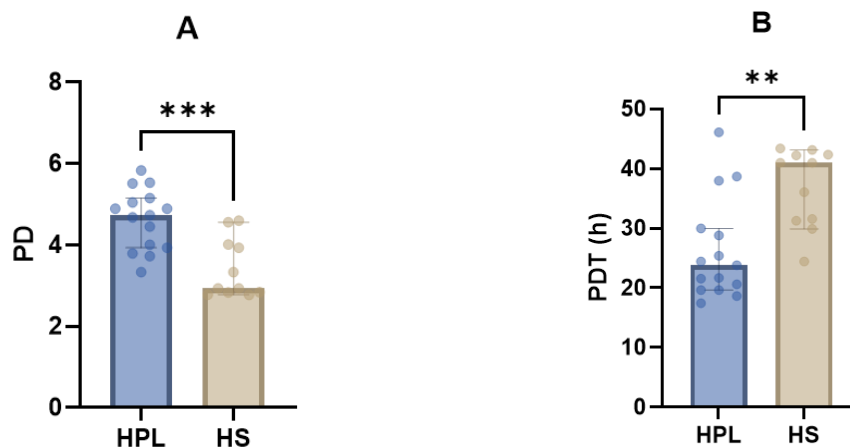


Figura 21. Cinética de crecimiento de hHFSCs en pase 1 expandidas con suero humano heterólogo (HS) y con lisado de plaquetas humano (HPL); HPL (N=12, por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años); HS (N=10, por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años). Los gráficos de diagrama de dispersión con barras representan los datos PD (A) y PDT (B) como mediana e intervalo de confianza (95%) (columnas y barras de error, respectivamente). PD (duplicación de la población); PDT (tiempo de duplicación de la población en horas). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; test Mann-Whitney.

1.2.2 Variaciones asociadas al donante.

Tal y como se observó durante el cultivo primario, algunos cultivos de hHFSCs detuvieron su proceso de proliferación en el primer pase, aún en ausencia de contacto celular, y alcanzaron confluencias inferiores al 25% e incluso se produjo la pérdida del cultivo (Tabla 10-A). Estas incidencias se observaron en cultivos procedentes de donantes con edades superiores a 21-25 años, tanto en hHFSCs expandidas con suero heterólogo como con lisado de plaquetas humano comercial.

1.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE ENRIQUECIMIENTO DE hHFSCs EN EL CULTIVO PRIMARIO Y PRIMER PASE.

1.3.1 Eficacia en el enriquecimiento en hHFSCs y estudio de variables explicativas.

Tras el cultivo primario, y durante el primer pase, se observó que determinadas poblaciones detienen el proceso de proliferación, con un mayor número de incidencias en la expansión de hHFSCs de cultivos procedentes de donantes de entre 30 y 47 años (n=12), tal y como se ha expuesto en los apartados anteriores 1.1 y 1.2, por lo que se ha tratado de determinar si la edad es una variable explicativa de la eficacia en la obtención de hHFSCs en cultivo durante las etapas iniciales de aislamiento y expansión (cultivo primario y primer pase).

En la Tabla 11 se muestra el porcentaje de cultivos que sufrió algún tipo de incidencia en su proliferación, desde el cultivo del explante de folículo piloso hasta su recuento tras el primer pase, en función de la edad de los donantes y el tipo de suero empleado. La Figura 22 muestra la tendencia al aumento en el número de cultivos no proliferantes en función del aumento de la edad del donante, tanto en hHFSCs expandidas con HPL ($R^2 = 0,79$), como con HS ($R^2 = 0,64$).

Tabla 11. Porcentaje de cultivos de hHFSCs que presentan incidencias en la proliferación tras el cultivo primario y el primer pase según la edad y tipo de suero como suplemento al medio de cultivo.

Edad de los donantes	Cultivos expandidos con HPL (%)	Cultivos expandidos con HS (%)
21	0	0
25	0	N/D
30	25	66,66
31	16,66	33,33
35	66,66	85,72
36	41,66	50
40	100	66,66
41	100	50
42	66,66	100
47	83,33	100

Una incidencia se identifica como una confluencia celular alcanzada inferior al 25% y/o pérdida del cultivo; n=12; pase 1; por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años. HPL (lisado de plaquetas humano comercial); HS (suero heterólogo).

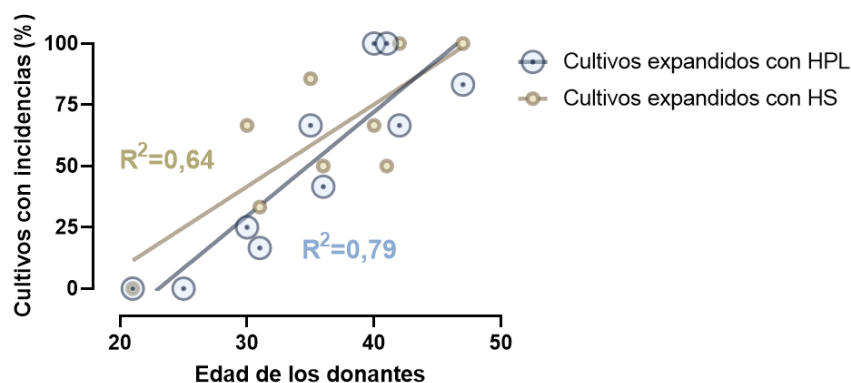


Figura 22. Gráfico de dispersión del porcentaje de cultivos de hHFSCs que presentan incidencias en la proliferación según la edad del donante y el empleo de lisado de plaquetas humano comercial (HPL) o suero heterólogo (HS) como suplemento al medio basal de cultivo. El gráfico muestra las líneas de regresión lineal ($R^2 < 0,80$).

La eficacia en la obtención de hHFSCs para todos los cultivos procedentes de cada uno de los donantes de 21 a 47 años se valoró según los criterios descritos de la Tabla 12, teniendo en cuenta el recuento de células adherentes viables, además de la pérdida de subcultivos descrita en los apartados 1 y 2. Con el objetivo de comprobar si los datos se ajustan a un modelo de regresión logística, se realizó una codificación de la variable “Eficacia en la obtención de hHFSCs” (Tabla 12).

Tabla 12. Codificación de la variable de respuesta binaria “Eficacia en la obtención de hHFSCs” para la modelización estadística de los resultados tras el cultivo primario y primer pase.

	Criterio 1	Criterio 2	Valor asignado al cumplir al menos uno de los dos criterios
No eficaz	Pérdida del cultivo (no proliferantes)	Confluencia alcanzada inferior al 25% tras el cultivo	0
Eficaz		Confluencia alcanzada igual o superior al 25% tras el cultivo	1

El valor 0 representa los subcultivos no proliferantes (subcultivos perdidos o que no alcanzaron un 25% de confluencia); mientras que el valor 1 representa un aislamiento eficaz de hHFSCs. Los resultados de eficacia obtenidos para las posibles variables explicativas “edad del donante” y “suero empleado como fuente de aporte de factores de crecimiento” se resumen en la Tabla 13; el resto de las condiciones de cultivo se mantuvieron constantes durante todo el proceso. El diseño experimental para la obtención de hHFSCs, desde el cultivo de explantes hasta la obtención de una población hHFSC en primer pase, se representa en las Figuras 14, 15 y 20.

Tabla 13. Eficacia en la obtención de hHFSCs tras el cultivo primario y primer pase (resultados mostrados como observaciones totales para facilitar su lectura) según las posibles variables explicativas: edad de los donantes y suero empleado como fuente de factores de crecimiento (HPL: lisado de plaquetas humano comercial; HS: suero heterólogo).

Edad	Fuente de factores de crecimiento	Eficacia 0 en el cultivo (número de cultivos)	Eficacia 1 en el cultivo (número de cultivos)
21	HPL	0	6
21	HS	0	6
25	HPL	0	6
25	HS	N/D	N/D
30	HPL	3	9
30	HS	8	4

Edad	Fuente de factores de crecimiento	Eficacia 0 en el cultivo (número de cultivos)	Eficacia 1 en el cultivo (número de cultivos)
31	HPL	1	5
31	HS	2	4
35	HPL	4	2
35	HS	6	1
36	HPL	5	7
36	HS	3	3
40	HPL	2	0
40	HS	4	2
41	HPL	6	0
41	HS	3	3
42	HPL	2	0
42	HS	6	0
47	HPL	5	0
47	HS	6	0

Los resultados tras la codificación de la eficacia para el análisis de la obtención de hHFSCs tras el cultivo primario y primer pase frente a la edad del donante se representan en la Figura 23. Los cultivos procedentes de donantes con edades superiores a los 25 años muestran subcultivos en los que no se obtienen de forma eficaz hHFSCs. Asimismo, el aumento en la edad disminuye el número de subcultivos proliferativos (observado por la intensidad de color en el gráfico de dispersión, es decir, se observa una tendencia en la disminución de la eficacia en la obtención de hHFSCs conforme aumenta la edad del donante.

Otra forma de observar este patrón es examinar el número de casos de eficacia en la obtención de hHFSCs por grupo de edad, utilizando el valor 0,5 de eficacia como parámetro de comparación (Figura 24). Como puede observarse, existe una tendencia lineal en la disminución de la eficacia en la obtención de hHFSCs conforme aumenta la edad del donante. Los resultados muestran más casos de eficacia por encima de 0,50 según disminuye la edad del grupo de donantes, mientras que por debajo del valor medio de eficacia se muestran más casos de incidencias según aumenta la edad del grupo de donantes. Es decir, las Figuras 23 y 24 indican que existe una asociación entre la edad y la eficacia en la obtención de hHFSCs. Por tanto, la edad del donante puede ser una variable explicativa de la eficacia de obtención de las hHFSCs y puede informar sobre la probabilidad de que ocurra el evento codificado como 1 (obtención eficaz de células viables tras el cultivo primario y primer pase) dentro de un modelo predictivo, en el que se incluye el factor “fuente de factores de crecimiento” como otra posible variable explicativa de la eficacia en la obtención de hHFSCs.

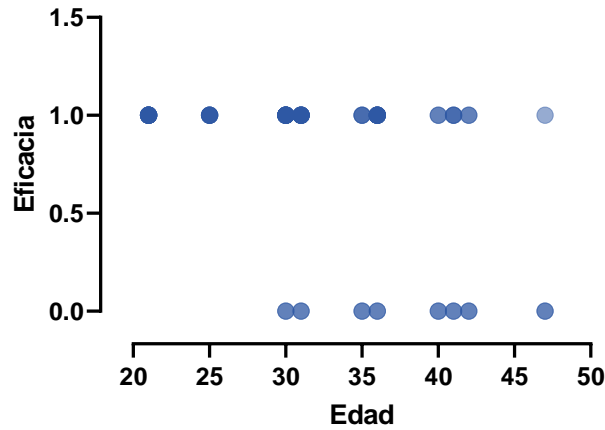


Figura 23. Eficacia en el obtención de hHFSCs tras el cultivo primario y primer pase según la edad de los donantes de explantes de foliculo piloso. La mayor intensidad de color se relaciona con un mayor número de observaciones. Eficacia 0: cultivo no proliferante o confluencia alcanzada inferior al 25%; 1: confluencia alcanzada tras el cultivo igual o superior al 25%.

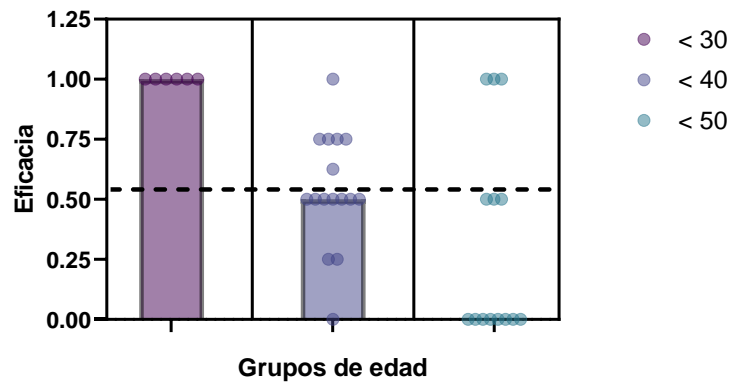


Figura 24. Eficacia en el obtención de hHFSCs tras el cultivo primario y primer pase según grupos de edad de los donantes de explantes de foliculo piloso. El gráfico tipo nested de la comparación entre grupos de edad muestra los resultados como mediana (columnas) y dispersión de los datos (círculos). La línea discontinua separa los cultivos con una eficacia mayor de 0,50 (se sitúa algo más elevada para permitir la visualización de los datos).

1.3.2 Generación de un modelo estadístico predictivo.

La generación de un modelo matemático predictivo para el enriquecimiento en hHFSCs, a partir de explantes de foliculo piloso y tras el cultivo primario y primer pase, tiene el objetivo de determinar cuáles son los procesos que pueden ayudar a diseñar procedimientos más eficientes de obtención de hHFSCs, y a su vez, ayudar a interpretar los resultados.

Para el modelado estadístico a partir de nuestros datos, se seleccionó como variable de respuesta la eficacia en la obtención de hHFSCs tras el cultivo primario y el primer pase, y como variable explicativa a estudiar se analizó la edad del donante, según los resultados obtenidos en el apartado anterior (1.3.1.).

Un modelo de regresión logística funciona cuando la variable de respuesta es binaria; en nuestro caso la respuesta se estableció como obtención de hHFSCs eficaz (valor 1) y no eficaz (valor 0) (Tabla 12). El ajuste de la edad del donante a un modelo de regresión logística simple se representa en la Figura 25. Tal y como puede observarse, con los resultados de nuestro estudio, la curva describe una función ligeramente sigmoidea, lo cual indica que, para edades más avanzadas, el valor de la función sigmoide es cercano a 0

(obtención de hHFSCs no eficaz), mientras que para donantes más jóvenes (<20 años) la función se acerca a 1 (obtención de hHFSCs eficaz). Asimismo, en la zona sombreada de la Figura 25 se representan las edades a partir de las cuales disminuye la probabilidad de éxito en la obtención de hHFSCs (intervalo de confianza del 95% de la mediana de 31,87 a 36,44 años; Tabla 14).

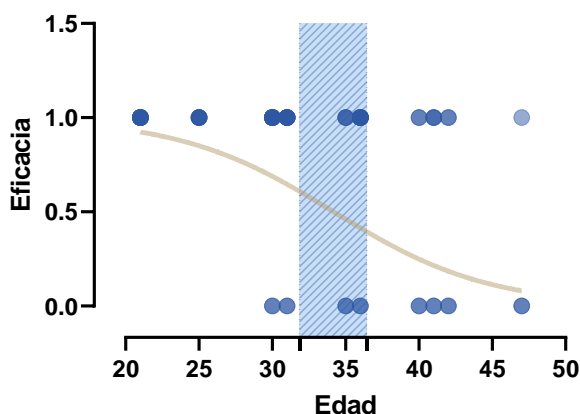


Figura 25. Regresión logística. 0: Obtención de hHFSCs no eficaz; 1: Obtención eficaz (confluencia igual o superior al 25% tras el cultivo primario y primer pase). La mayor intensidad de color en los datos se relaciona con un mayor número de observaciones (N=12; por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años). El área sombreada muestra el intervalo de confianza del 95% (Tabla 14), por debajo del cual hay una mayor probabilidad de obtener hHFSCs de forma eficaz tras el cultivo primario y el primer pase.

El modelo de regresión logística simple describe el proceso de obtención más eficaz de las hHFSCs durante las primeras fases del aislamiento, desde el cultivo del explante a la obtención de células en pase 1, mediante la ecuación $\log odds = 6,482 - 0,1896 * X$ (Tabla 14).

En la Tabla 14 se muestra el valor medio de X que mejor ajusta un modelo de regresión logística (X=34,19 años, con un intervalo de confianza del 95% de 31,87 a 36,44 años), por lo que, aplicando la ecuación $\log odds = 6,482 - 0,1896 * X$, donde X = 34,19 años, se obtiene un valor $\log odds$ de 0, y por tanto una eficacia de 1. Es decir, a partir de explantes de folículo piloso de donantes con edades inferiores a 34 años (con un I.C. del 95% de 32 a 36 años aproximadamente) se pueden obtener hHFSCs eficazmente de forma significativa tras el cultivo primario y primer pase, mientras que con explantes procedentes de donantes con edades superiores se aumenta la probabilidad de que la obtención de hHFSCs no sea eficaz ($p < 0,0001$; Tjur's R squared = 0,27). Los resultados de ajuste al modelo de regresión logística muestran que el valor β_1 (variable explicativa "edad del donante") es negativo, por lo que al aumentar la edad del donante decrecerá la probabilidad de obtener hHFSCs de forma eficaz. El valor *odd ratio* indica, a su vez, que por cada año en la edad del donante la probabilidad de obtener hHFSCs se multiplica por 0,8273, es decir, disminuye la probabilidad de obtener hHFSCs de forma eficaz tras el cultivo primario y el primer pase.

El área bajo la curva (AUC) muestra un valor superior al 0,50 (0,7754 [I.C. del 95% de 0,6953 a 0,8554]) (Tabla 14; Figura 26).

Tabla 14. Regresión logística simple. Variable de respuesta (β_0): eficacia en la obtención de hHFSCs (0: no eficaz; 1: eficacia en la obtención de hHFSCs tras el cultivo primario y el primer pase); variable explicativa (β_1): edad de los

donantes. El modelo de regresión logística simple describió la eficacia en la obtención de hHFSCs mediante la ecuación $\log odds = \beta_0 + \beta_1 x$, siendo $\beta_0 = 6,482$, $\beta_1 = -0,1896$ y X la edad del donante.

Eficacia en la obtención de hHFSCs	
Best-fit values	
β_0	6,482
β_1	-0,1896
X at 50%	34,19
Std. Error	
β_0	1,310
β_1	0,03756
X at 50%	1,108
95% CI (profile likelihood)	
β_0	4,100 to 9,270
β_1	-0,2696 to -0,1214
X at 50%	31,87 to 36,44
Odds ratios	
β_0	653,4
β_1	0,8273
95% CI (profile likelihood) for odds ratios	
β_0	60,32 to 10611
β_1	0,7637 to 0,8857
Is slope significantly non-zero?	
Z	5,048
P value	<0,0001
Deviation from zero?	Significant
Likelihood ratio test	
Log-likelihood ratio (G squared)	38,07
P value	<0,0001
Reject Null Hypothesis?	Yes
P value summary	****
Area under the ROC curve	
Area	0,7754
Std. Error	0,04086
95% confidence interval	0,6953 to 0,8554
P value	<0,0001
Goodness of Fit	
Tjur's R squared	0,2669
Cox-Snell's R squared	0,2626
Model deviance, G squared	135,1
Equation	$\log odds = 6,482 - 0,1896 * X$
Data summary	
Rows in table	125
Rows skipped (missing data)	0
Rows analyzed (#observations)	125
Number of 1	61
Number of 0	64
Number of parameter estimates	2
#observations/#parameters	62,5
# of 1/#parameters	30,5
# of 0/#parameters	32,0

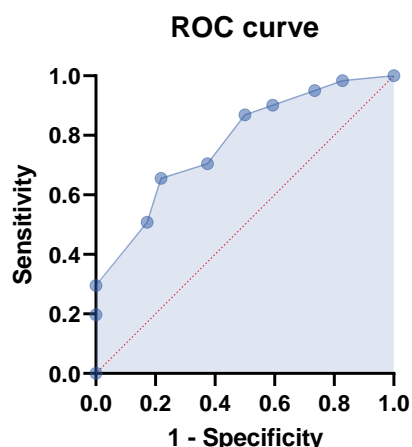


Figura 26. Gráfico de curva ROC. Cada punto de la curva ROC informa de su sensibilidad (eje Y) y 1-especificidad (eje X). La línea diagonal discontinua recibe el nombre de diagonal de referencia o línea de no-discriminación. El AUC (área bajo la curva) se corresponde con la zona sombreada y tiene un valor superior a 0,50 (0,7754; Tabla 14).

Por todo lo anterior, los resultados de eficacia en la obtención de hHFSCs de nuestro estudio, tomando como variable explicativa la edad de los donantes, se ajustaron de forma significativa a un modelo de regresión logística simple. No obstante, y dado que existe al menos otra variable que puede justificar la eficacia en la obtención de hHFSCs dentro de un modelo predictivo, además de la edad del donante se incluyó el suero empleado para la expansión celular, como fuente de aporte de factores de crecimiento, en la estimación de un modelo de regresión logística múltiple, ya que la capacidad proliferativa de las hHFSCs expandidas con suero heterólogo (HS) como suplemento al medio basal de cultivo fue significativamente inferior a las obtenidas con lisado de plaquetas humano comercial (HPL) (apartado 1.2.1).

Por tanto, para la generación de un modelo de regresión logística múltiple predictivo se seleccionaron como variables de entrada: a) la edad de los donantes de explantes de folículo piloso y b) el empleo de suero heterólogo frente a la adición de HPL como suplemento al medio de cultivo (n=12; por duplicado; edad de los donantes entre 21 y 47 años) como variable independiente categórica. En la Tabla 15 se muestran los resultados del modelo de ajuste generado a partir de los datos de la Tabla 13.

Tabla 15. Modelo de regresión logística múltiple generado para la obtención eficaz de hHFSCs a partir de explantes de folículo piloso y en las primeras fases de aislamiento: cultivo primario y pase 1.

Model				
Parameter estimates	Variable	Estimate	Standard error	95% CI (profile likelihood)
β_0	Intercept	6,848	1,358	4,388 to 9,752
β_1	Edad?	-0,1881	0,03807	-0,2695 to -0,1191
β_2	Suero HS?	-0,8597	0,4289	-1,719 to -0,02812
Odds ratios	Variable	Estimate	95% CI (profile likelihood)	
β_0	Intercept	942,3	80,46 to 17188	
β_1	Edad?	0,8285	0,7637 to 0,8877	
β_2	Suero HS?	0,4233	0,1792 to 0,9723	
Sig. diff. than zero?	Variable	Z	P value	P value summary
β_0	Intercept	5,042	<0,0001	****

Model					
β_1	Edad?	4,942	<0,0001	****	
β_2	Suero HS?	2,004	0,045	*	
Model diagnostics	Degrees of Freedom	AICc	Negative log likelihood value		
Intercept-only model	124	175,2	86,61		
Selected model	122	137,2	65,52		
Multicollinearity	Variable	VIF	R2 with other variables		
β_0	Intercept				
β_1	Edad?	1,013	0,01246		
β_2	Suero HS?	1,013	0,01246		
Area under the ROC curve					
Area	0,7997				
Std. Error	0,03882				
95% confidence interval	0,7236 to 0,8758				
P value	<0,0001				
Classification table	Predicted 0	Predicted 1	Total	% Correctly classified	
Observed 0	41	23	64	64,06	
Observed 1	12	49	61	80,33	
Total	53	72	125	72	
Negative predictive power (%)	77,36				
Positive predictive power (%)	68,06				
Classification cutoff	0,5				
Pseudo R squared					
Tjur's R squared	0,2943				
Cox-Snell's R squared	0,2864				
Nagelkerke's R squared	0,382				
Hypothesis tests	Statistic	P value	Null hypothesis	Reject Null Hypothesis?	P value summary
Hosmer-Lemeshow	7,89	0,4443	Selected model is correct	No	ns
Data summary					
Rows in table	135				
Rows skipped (missing data)	10				
Rows analyzed (#observations)	125				
Number of 1	61				
Number of 0	64				
Number of parameter estimates	4				
#observations/#parameters	31,3				
# of 1/#parameters	15,3				
# of 0/#parameters	16				

Los resultados obtenidos mostraron que, tanto el aumento de la edad de los donantes, como el empleo de suero HS, frente al empleo de HPL como suplemento al medio de cultivo, disminuyen de forma

significativa la probabilidad de obtener hHFSCs tras el cultivo primario y primer pase, siendo el aumento de la edad del donante una variable explicativa más fuertemente relacionada con la eficacia en la obtención de hHFSCs ($p < 0,0001$). Por cada año que se incremente la edad del donante, y siempre que se tenga en cuenta la variable “suero” incluida en el modelo, la probabilidad de obtener hHFSCs se multiplica por 0,8285 (I.C. del 95% de 0,7637 a 0,8877); es decir disminuye la probabilidad de éxito.

Además, el modelo predictivo confirma que el empleo de suero heterólogo disminuye la eficacia en la obtención de hHFSCs tras el primer pase, tal y como habíamos observado a partir de la comparación de los datos estadísticos descriptivos (apartado 1.2.1).

La selección del modelo mostrado en la Tabla 15 se realizó en base a: a) el AICc (Criterio de Información de Akaike corregido); b) la multicolinealidad, c) la curva ROC y área bajo la curva, d) la tabla de clasificación de casos esperados frente a observados, así como los correctamente clasificados, e) el poder predictivo del modelo, f) los valores pseudo- R^2 de Tjur, Cox-Snell y Nagelkerke, g) la prueba de hipótesis de Hosmer-Lemeshow, y h) el número de observaciones de parámetros con valor 1 y 0.

En cuanto al valor AICc y pseudo- R^2 se siguió el criterio de selección de un modelo con un AICc menor y pseudo- R^2 mayor, ya que, aunque el significado de los parámetros pseudo- R^2 no aportan la misma información que en los modelos de regresión lineal, en un modelo de regresión logística ayudan a seleccionar el modelo que mejor se ajusta según aumenta su valor.

El análisis de multicolinealidad mostró un valor VIF cercano a 1, lo que indica una menor correlación entre las variables y, por tanto, un mejor ajuste a un modelo de regresión logística. Tanto el valor VIF como los valores pseudo- R^2 demostraron la no existencia de multicolinealidad.

La curva ROC mostró una alta sensibilidad y especificidad del modelo predictivo, como puede apreciarse en la Figura 27-A. Asimismo, el área bajo la curva ROC fue de 0,7997 (I.C. del 95% de 0,7236 a 0,8758) (Tabla 15).

Asimismo, se comprobó si el modelo de regresión logística es predictivo según el test de hipótesis de Hosmer-Lemeshow, en el que el valor de p debe ser superior a 0,05 para que el modelo predictivo seleccionado se considere correcto, y se comprobó que el poder de predicción de los casos positivos y negativos fuese superior al 62,50%. Los resultados mostraron que el poder de predicción del modelo fue del 77,36% para los casos negativos y del 68,06% para los casos positivos. Sin embargo, la interpretación gráfica de la clasificación de los casos observados que realizó el modelo (Figura 27-B), mostró una distribución de la probabilidad de predicción uniforme, tanto para los casos observados con una obtención no eficaz de hHFSCs (Observed 0), como para los casos observados de éxito en la obtención de hHFSCs (Observed 1). Es decir, para los casos observados 0 no se observó que la mayoría de ellos tuviesen probabilidades de predicción por debajo de 0,5; o por encima de 0,5 en el caso de los casos observados 1. No obstante, las predicciones de este tipo de gráfico están únicamente basadas en las variables

explicativas e ignoran la variable de respuesta. En la tabla de clasificación de la Tabla 15 se muestra un alto porcentaje de casos correctamente clasificados para los casos observados 0 y 1.

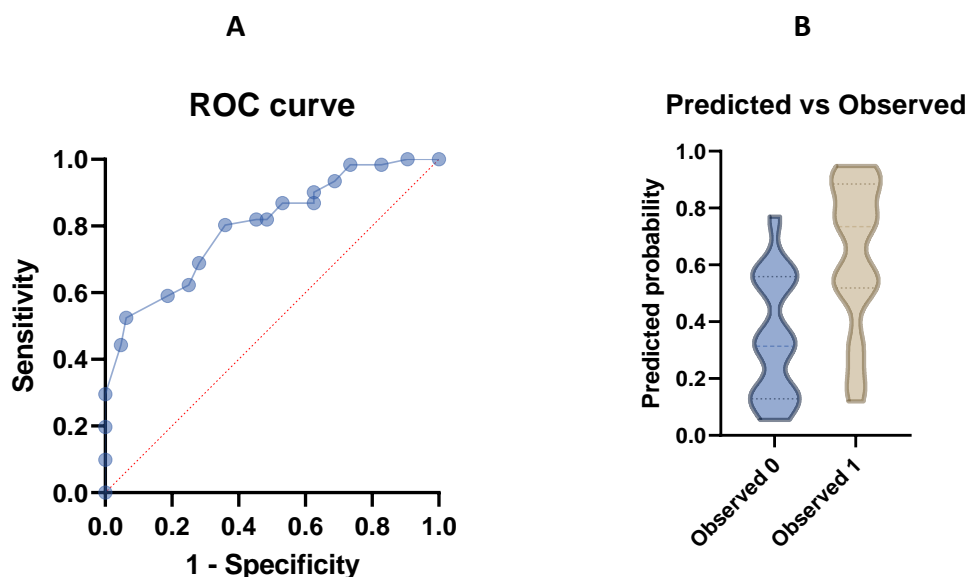


Figura 27. Curva ROC (A) y gráfico tipo violín de la distribución de la probabilidad de predicción de los casos observados. A) Curva ROC. Cada punto de la curva ROC informa de su sensibilidad (eje Y) y 1-especificidad (eje X). La línea diagonal discontinua recibe el nombre de diagonal de referencia o línea de no-discriminación. B) Casos observados: 0 (no proliferativos); 1 (cultivos con resultados de obtención de hHFSCs eficaz); mediana (línea discontinua media); cuartiles 1 y 3 (líneas punteadas).

El empleo de este modelo predictivo generado para la optimización en los procesos de obtención de hHFSCs puede emplearse para predecir la probabilidad de éxito en la obtención de hHFSCs proliferativas, tras el cultivo primario y el primer pase, a partir de la edad del donante, y empleando HPL o HS como suplemento al medio de cultivo. En la Tabla 16 se muestran diferentes ejemplos de predicción derivados de este modelo generado para la obtención eficaz de hHFSCs. Con los datos de que disponemos para la generación del modelo, y tras el análisis de resultados de ajuste de nuestros al datos al mismo, podemos predecir, por ejemplo, que si la edad del donante de explantes de folículo piloso fuese de 25 años y se emplease HPL como suplemento al medio de cultivo, la probabilidad de obtener con éxito hHFSCs tras el primer pase sería del 90%, mientras que, en las mismas condiciones de cultivo, un donante de 45 años presentaría una probabilidad de éxito del 17% (R^2 de Tjur = 0,2943; p (Hosmer-Lemeshow) = 0,4443; poder predictivo del 68,06%). Una mejor predicción podría realizarse aumentando el número de donantes del experimento y, probablemente, incluyendo en los ensayos únicamente MSCs previamente aisladas mediante *sorting* para evitar la heterogeneidad durante estas fases iniciales de la obtención de hHFSCs a partir de explantes de folículo piloso. En caso de ser posible, sería interesante analizar también si la variable género del donante está fuertemente asociada al éxito o fracaso en la obtención de hHFSCs.

Tabla 16. Ejemplo de predicción obtenida en base al modelo de la Tabla XX.

Edad	Predicción (probabilidad de éxito)	
	HPL	HS
25	0,90	0,78

Edad	Predicción (probabilidad de éxito)	
30	0,77	0,59
35	0,57	0,36
40	0,34	0,18
45	0,17	0,08

La obtención de hHFSCs en fase 1 obtenidas a partir de explantes de folículo piloso de un donante de 25 años, y aisladas y expandidas con lisado de plaquetas humano comercial (HPL), tienen un 90% de probabilidad de ser eficazmente obtenidas tras el primer pase; mientras que esa probabilidad disminuye (78%) en caso de que se emplee suero heterólogo (HS). Conforme aumenta la edad del donante la probabilidad de obtener hHFSCs en fase 1 disminuye.

1.4 OBTENCIÓN DE hHFSCs A CORTO Y MEDIO PLAZO.

1.4.1 Expansión de las hHFSCs hasta el quinto pase.

La expansión de las hHFSCs hasta el pase 5 fue necesaria para obtener un número suficiente de células viables para: su caracterización como hHF-MSCs, el análisis de su capacidad proliferativa y la generación de un stock para su criopreservación y utilización en sucesivos ensayos. La expansión de todos los cultivos se realizó con lisado de plaquetas humano comercial (HPL) debido a que mostró una mayor eficacia para la obtención de hHFSCs durante el cultivo primario y primer pase, frente al empleo de suero heterólogo (apartado 1.3).

Las hHFSCs fueron subcultivadas en los sucesivos pases hasta el pase 5 según el diseño experimental de la Figura 28, con diferentes densidades de siembra según la disponibilidad de hHFSCs viables tras cada subcultivo.

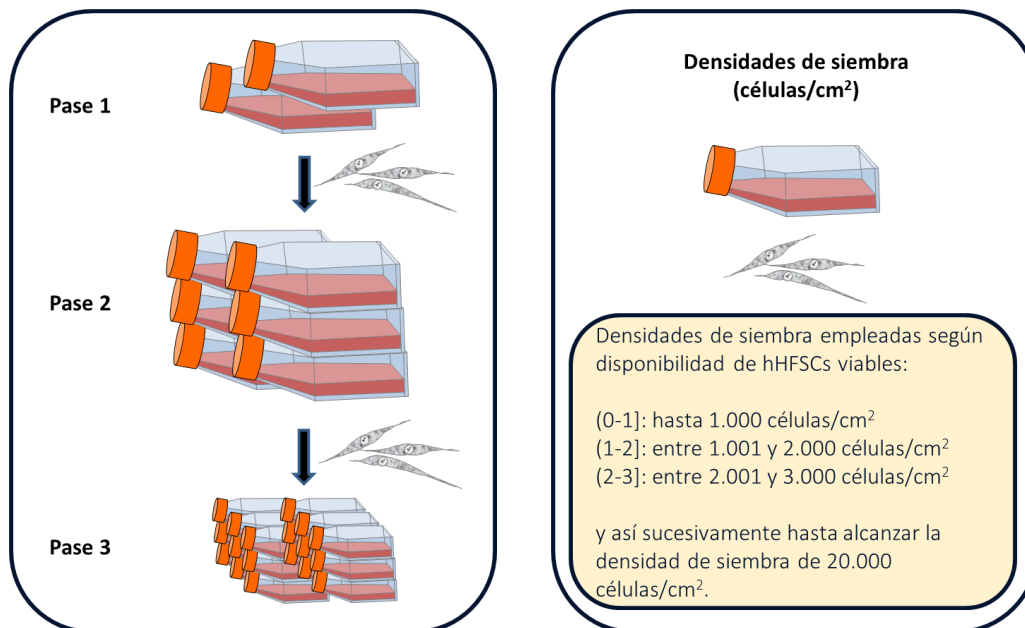


Figura 28. Diseño experimental de los primeros pases tras el cultivo primario para cada uno de los 12 donantes de folículo piloso (edad de los donantes entre 21 y 47 años). En el esquema no se representan los pases 4 y 5. Las diferentes densidades de siembra se emplearon en función de la disponibilidad de hHFSCs viables. Todos los

cultivos emplearon HPL (lisado de plaquetas humano comercial) como suplemento al medio basal de cultivo. Condiciones de incubación: 37 °C, con un 5% de CO₂ y en condiciones de humedad.

Las hHFSCs mostraron capacidad de proliferación hasta confluencias del 60 – 70 % y confluencia total (~ 67.000 células/cm²) en algunos subcultivos. No obstante, los recuentos celulares obtenidos a partir de las diferentes densidades de siembra mostraron una alta dispersión (Tabla 17, Figura 29) debida a que en determinados subcultivos se detenía el proceso de proliferación aún en ausencia de contacto celular, tal y como se observó tras el cultivo primario.

Tabla 17. Recuentos de hHFSCs viables obtenidos a partir de las diferentes densidades de siembra y resultados de los p-valores de la comparación entre pares. A) Valores estadísticos descriptivos; B) Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni.

A – Densidad de siembra (x10 ⁶ células/cm ²)	Número de cultivos	Promedio ± SD	Mediana (Q1; Q3)	I.C. (95%)
(0-1]	6	16101 ± 15945	7267 (5328; 34570)	(3314; 40000)
(1-2]	22	33884 ± 13078	32660 (23190; 43200)	(23320; 43200)
(2-3]	18	30219 ± 18389	29079 (12770; 48000)	(12880; 48000)
(3-4]	13	42349 ± 23880	34533 (28867; 52133)	(25467; 52133)
(4-5]	22	35096 ± 21179	28920 (20520; 44100)	(20520; 39067)
(5-6]	14	44486 ± 24156	37333 (29767; 50100)	(25467; 50800)
(6-7]	13	33477 ± 17164	33067 (25067; 35667)	(24000; 36533)
(7-8]	10	29356 ± 15338	34960 (18120; 37900)	(9240; 38000)
(8-9]	15	36216 ± 1434	35733 (34933; 37333)	(34933; 37333)
(9-11]	15	38249 ± 25563	41600 (18480; 67733)	(18480; 67733)
(11-14]	21	53298 ± 21589	56000 (31860; 71600)	(31960; 70000)
(14-20]	17	51094 ± 19291	45600 (35900; 68800)	(37000; 65200)

B – Densidad de siembra (x10 ⁶ células/cm ²)	(1-2]	(2-3]	(3-4]	(4-5]	(6-7]	(7-8]	(9-11]	(11-14]	(14-20]
(0-1]	>0,99	>0,99	>0,99	0,649	>0,99	>0,99	>0,99	0,022	0,026
(1-2]	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
(2-3]	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
(3-4]	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
(4-5]	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
(5-6]	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
(6-7]	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
(7-8]	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
(8-9]	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
(9-11]	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
(11-14]	0,577	0,088	>0,99	0,151	0,4648	0,9553	>0,99	>0,99	>0,99
(14-20]	0,720	0,123	>0,99	0,210	0,5453	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99

Todos los cultivos (n=163; 12 donantes entre 21 y 47 años; pases 1 a 5) fueron expandidos con HPL (lisado de plaquetas humano comercial) como suplemento al medio de cultivo basal. SD (desviación estándar); Q1 y Q3 (cuartiles 1 y 3); I.C. (intervalo de confianza del 95% para la mediana).

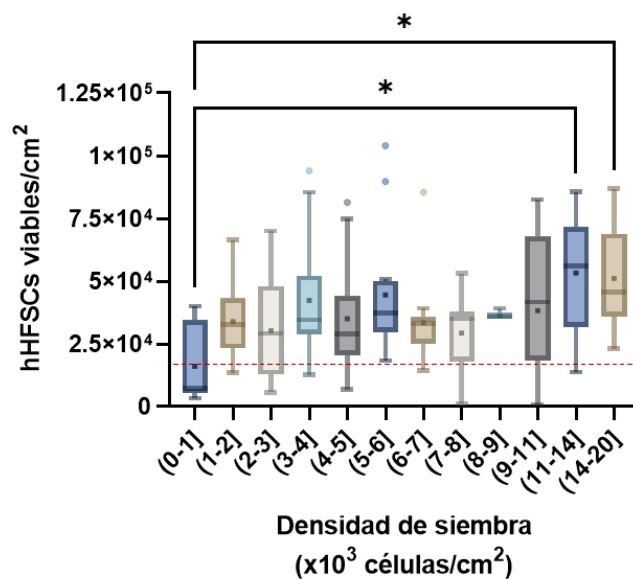


Figura 29. Representación de la dispersión de los resultados obtenidos tras el recuento del número de hHFSCs adherentes viables obtenidas a partir de diferentes densidades de siembra. Todos los cultivos (n=163; 12 donantes entre 21 y 47 años; pases 1 a 5) fueron expandidos con HPL (lisado de plaquetas humano comercial) como suplemento al medio de cultivo basal. El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (\cdot), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Los valores atípicos se representan con un círculo. El recuento de células muestra diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$; prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni). La línea roja discontinua indica el límite a partir del cual se obtienen confluencias superiores al 25% (~ 16.750 células/cm²; calculado según el valor: confluencia total = 67.000 células/cm²).

Para intentar reactivar el crecimiento de las hHFSCs que habían detenido su proliferación se procedió a tripsinizar las células y volver a resembrarlas, teniendo en cuenta que, de haber células quiescentes, éstas tienen la capacidad de entrar de nuevo en la fase S. Las resiembras se realizaron en una misma área de cultivo o inferior, según el recuento de células viables, para favorecer el proceso de duplicación, adicionando a su vez medio completo fresco. Con este procedimiento, se consiguió en algunos casos reiniciar el proceso de duplicación. De esta manera, un nuevo subcultivo de las hHFSCs favoreció que las células se adaptasen al nuevo medio y entrasen de nuevo en el ciclo celular de forma sincronizada. Sin embargo, en algunos casos no fue posible recuperar la población celular en cultivo tras la tripsinización y la renovación del medio completo, lo que sugiere que las células se encontraban mayoritariamente en estado de senescencia. Tras impulsar esta proliferación, los subcultivos que pudieron recuperarse fueron utilizados junto con los que no presentaron incidencias durante su expansión. A partir del primer pase y tras cada pase, las células fueron seleccionándose en base a la habilidad para proliferar más eficazmente.

Para valorar si el aumento en el número de pases influye en la viabilidad de los cultivos se analizó el número de células viables entre los pases 1 a 5 (Tabla 18; Figura 30). La viabilidad no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pases. Los p-valores obtenidos de la comparación entre pares mediante la prueba de Kruskal-Wallis y ajustados por el método de Bonferroni se muestran en la Tabla 18-B.

Tabla 18. Recuentos celulares de la población hHFSC según el pase (pases 1 a 5). A) Estadísticos descriptivos; B) Resultados de los p-valores de la comparación entre pares. Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni.

20 – A		P1	P2	P3	P4	P5
hHFSCs viables (x10 ⁶)	Promedio ± SD	0,34 ± 0,17	0,35 ± 0,18	0,34 ± 0,17	0,39 ± 0,24	0,37 ± 0,12
	Mediana	0,37	0,32	0,35	0,35	0,35
	(Q1; Q3)	(0,21; 0,46)	(0,22; 0,42)	(0,26; 0,38)	(0,21; 0,48)	0,29; 0,40)
	I.C. (95%)	(0,21; 0,46)	(0,26; 0,37)	(0,31; 0,36)	(0,28; 0,39)	(0,30; 0,39)

20 – B: p-Valores	P1	P2	P3	P4
P2	> 0,999			
P3	> 0,999	> 0,999		
P4	> 0,999	> 0,999	> 0,999	
P5	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999

Todos los cultivos (n=163; 12 donantes entre 21 y 47 años) fueron expandidos con HPL (lisado de plaquetas humano comercial) como suplemento al medio de cultivo basal. Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% (I.C.) para la mediana.

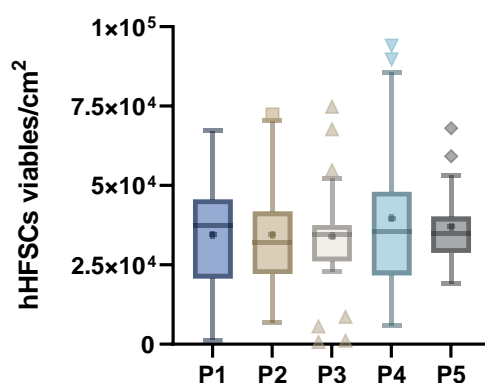


Figura 30. Viabilidad de las hHFSCs (células/cm²) según el pase (pases 1 a 5). Todos los cultivos (n=163; 12 donantes entre 21 y 47 años) fueron expandidos con HPL (lisado de plaquetas humano comercial) como suplemento al medio de cultivo basal. A) Número de hHFSCs viables/cm²; B) porcentaje de viabilidad. Los gráficos de cajas y bigotes muestran la media (·), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Los valores atípicos se representan con un círculo. No se observan diferencias significativas; prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni.

1.4.2 Estudio del efecto de la densidad celular de siembra en la capacidad de duplicación de las hHFSCs.

Con el objetivo de analizar el efecto que ejerce la densidad de siembra sobre la proliferación celular de las hHFSCs se analizó la duplicación de la población (PD) a partir del recuento de células viables obtenido según las diferentes densidades de siembra (Tabla 17), que incluyen tanto los cultivos proliferantes como los que mostraron incidencias en su expansión. Los resultados PD obtenidos para los n=163 cultivos entre los pases 1 a 5, de 12 donantes de 21 a 47 años (Tabla 19) se representaron mediante un gráfico de dispersión en función de la densidad de siembra y de la edad de los donantes (Figura 31-A). El gráfico muestra una tendencia a la disminución de la duplicación de la población cuando se aumenta la

densidad de siembra en cultivos procedentes de donantes de los diferentes rangos de edad: 1 (edad de 20 a 29 años); 2 (de 30 a 39 años) y 3 (de 40 a 49 años). Asimismo, a partir de una densidad de siembra de 5.000 hHFSCs/cm² se observa un mayor número de cultivos que no tienen la capacidad de duplicar su población. Entre 5.000 y 8.000 hHFSCs/cm² no se observan diferencias significativas (Figura 31-B; Tabla 19). Sin embargo, densidades de siembra superiores a 9.000 hHFSCs/cm² muestran una disminución significativa de la duplicación de la población respecto a la densidad de siembra de 5.000 hHFSCs/cm². En la Tabla 19 se muestran los estadísticos descriptivos respecto a los valores PD analizados en el gráfico B de la Figura 31.

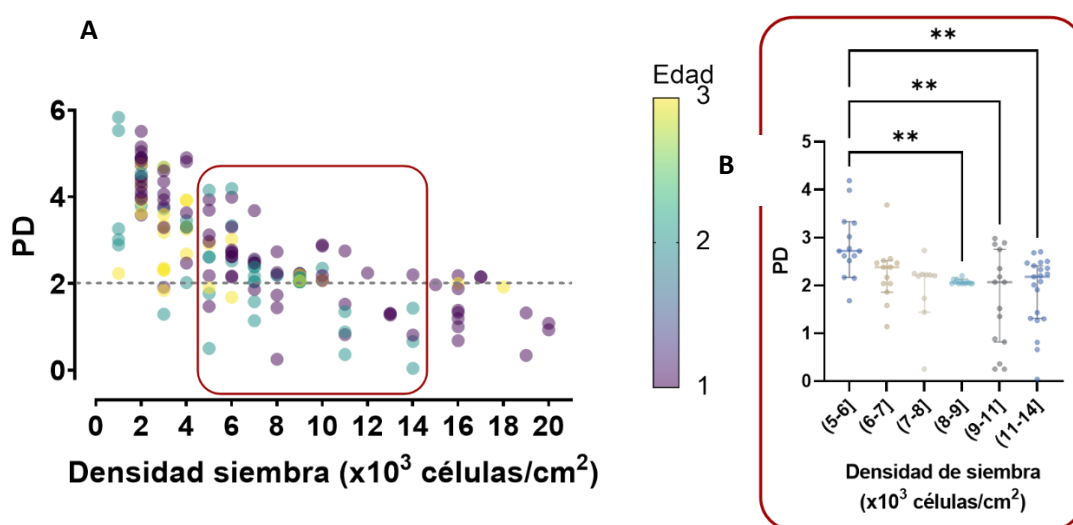


Figura 31. Gráfico de dispersión que representa las variables: densidad de siembra, edad del donante y duplicación de la población. El recuadro rojo indica la zona donde se observa un mayor número de cultivos que no duplican su población (por debajo del valor PD=2) y a su vez una disminución de casos en los que se observa duplicación de la población. En el gráfico B se muestra la significación estadística entre las densidades de siembra de 5.000 a 14.000 células/cm² englobadas en el recuadro del gráfico principal; ****p<0.01**; prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni. Rangos de edad representados: 1 (de 20 a 29 años); 2 (de 30 a 39 años) y 3 (de 40 a 49 años).

Tabla 19. Duplicación de la población hHFSC (PD) y resultados de los p-valores de la comparación entre pares para las densidades representadas en el gráfico B de la Figura 31.

Densidad de siembra (x10 ⁶ células/cm ²)	Promedio ± SD	Mediana (Q1; Q3)	I.C. (95%)	p-Valores
(5-6]	2,80 ± 0,69	2,70 (2,40; 3,30)	(2,25; 3,30)	
(6-7]	2,30 ± 0,60	2,40 (2,00; 2,50)	(1,90; 2,50)	0,407
(7-8]	1,90 ± 0,69	2,20 (1,70; 2,20)	(1,40; 2,30)	0,168
(8-9]	2,10 ± 0,05	2,10 (2,00; 2,10)	(2,00; 2,10)	0,003
(9-11]	1,70 ± 1,00	2,10 (0,82; 2,80)	(0,82; 2,80)	0,009
(11-14]	1,90 ± 0,73	2,20 (1,30; 2,40)	(1,30; 2,40)	0,008

Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni. Todos los cultivos (n=163) fueron expandidos con HPL (lisado de plaquetas humano comercial) como suplemento al medio de cultivo basal. N=12; pases 1 a 5; edad de 21 a 47 años. SD (desviación estándar); Q1 y Q3 (cuartiles 1 y 3); I.C. (intervalo de confianza del 95% para la mediana).

Al disminuir la densidad de siembra por debajo de 5.000 células/cm² se observó un aumento en el número de cultivos proliferativos. Estos resultados indican que la disminución de la densidad de siembra favorece

la proliferación, probablemente por la mayor disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento por célula.

A la vista del efecto que tiene la densidad de siembra sobre la duplicación celular, sería conveniente emplear densidades de siembra inferiores a 5.000 células/cm². No obstante, las densidades de siembra de 5.000 a 8.000 células/cm² mostraron un mayor número de cultivos proliferativos respecto a cultivos con incidencias en su expansión.

El empleo de densidades de siembra muy altas (más de 14.000 células/cm²) puede favorecer en poco tiempo el contacto celular y, por tanto, un efecto de inhibición de la proliferación por contacto. Por esta razón, y tras la observación de un número de cultivos no proliferativos mayoritario para estas densidades de siembra (Figura 31), sería conveniente evitar densidades de siembra altas. No obstante, densidades de siembra de 9.000 a 14.000 células/cm² pueden emplearse cuando la expansión de hHF-MSCs *in vitro* no esté destinada a ensayos futuros de reemplazo celular en pacientes.

1.4.3 Optimización de la de la metodología de obtención de hHFSCs.

1.4.3.1 Estudio de la densidad de siembra como variable explicativa de la capacidad de duplicación de las hHFSCs.

La observación de los datos representados en la Figura 31 y el análisis de los datos parecen indicar que la densidad de siembra es una variable explicativa de la capacidad de duplicación celular de las hHFSCs. Para estudiar si ésta es una variable explicativa se codificaron los valores obtenidos para la duplicación de la población (PD) (Figura 31) como: 1 (valor PD igual o superior a 2,25 [límite inferior del intervalo de confianza del 95% para la mediana en cultivos con una densidad de siembra de 5.000 células/cm²]; 0 (duplicación de la población por debajo de 2,25). La representación de los resultados de eficacia obtenidos se muestra en la Figura 32. Como puede observarse, el modelo de regresión logística simple muestra una función sigmoidea característica de los modelos de regresión logística. El análisis de los resultados obtenidos tras el ajuste a este modelo de regresión se muestra en la Tabla 20.

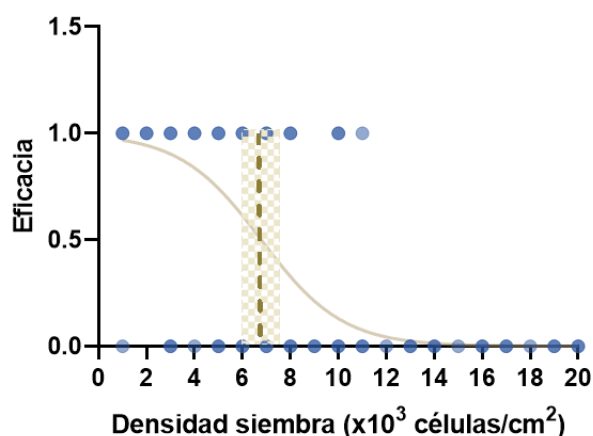


Figura 32. Regresión logística de la eficacia según la capacidad de duplicación de la población hHFSC en función de la densidad de siembra. 0: Duplicación de la población hHFSC no eficaz (PD < 2.25); 1: Duplicación de la población eficaz (PD ≥ 2.25). La mayor intensidad de color en los datos se relaciona con un mayor número de observaciones (n=163 de 12 donantes de 21 a 47 años; pases 1 a 5). La línea vertical discontinua muestra la densidad media por debajo de la cual hay una mayor probabilidad de obtener hHFSCs proliferativas (el área sombreada muestra el intervalo de confianza del 95%; datos obtenidos de la Tabla 20).

Tabla 20. Regresión logística simple. Variable de respuesta (β_0): eficacia según la capacidad de duplicación de la población hHFSC (0: PD < 2.25; 1: PD ≥ 2.25; variable explicativa (β_1): densidad de siembra. El modelo de regresión logística simple describe la eficacia mediante la ecuación $\log \text{odds} = \beta_0 + \beta_1 * X$; siendo $\beta_0 = 4,006$, $\beta_1 = -0,5899$ y X la densidad de siembra.

Eficacia en la duplicación de la población hHFSC	
Best-fit values	
β_0	4,006
β_1	-0,5899
X at 50%	6,791
Std. Error	
β_0	0,618
β_1	0,09101
X at 50%	0,3874
95% CI (profile likelihood)	
β_0	2,899 to 5,340
β_1	-0,7865 to -0,4276
X at 50%	6,050 to 7,599
Odds ratios	
β_0	54,93
β_1	0,5544
95% CI (profile likelihood) for odds ratios	
β_0	18,16 to 208,5
β_1	0,4554 to 0,6521
Is slope significantly non-zero?	
Z	6,482
P value	<0,0001
Deviation from zero?	Significant
Likelihood ratio test	
Log-likelihood ratio (G squared)	100,6
P value	<0,0001
Reject Null Hypothesis?	Yes
P value summary	****
Area under the ROC curve	
Area	0,9037
Std. Error	0,02428
95% confidence interval	0,8561 to 0,9513
P value	<0,0001
Goodness of Fit	
Tjur's R squared	0,5159
Cox-Snell's R squared	0,4607
Model deviance, G squared	124,8
Equation	$\log \text{odds} = 4,006 - 0,5899 * X$
Data summary	
Rows in table	163
Rows skipped (missing data)	0
Rows analyzed (#observations)	163
Number of 1	86
Number of 0	77
Number of parameter estimates	2
#observations/#parameters	81,5

Eficacia en la duplicación de la población hHFSC	
# of 1/#parameters	43
# of 0/#parameters	38,5

El modelo de regresión logística simple describe el proceso de obtención de cultivos de hHFSCs proliferativos según la densidad de siembra mediante la ecuación $\log \text{odds} = 4,006 - 0,5899 * X$ (Tabla 20). El valor medio de X que mejor ajusta un modelo de regresión logística es igual a $6,79 \times 10^3$ células/cm², con un intervalo de confianza del 95% de $6,050$ a $7,599 \times 10^3$ células/cm². Aplicando la ecuación $\log \text{odds} = 4,006 - 0,5899 * X$, donde $X = 6,79 \times 10^3$ células/cm² se obtiene un valor log odds de 0, y por tanto una eficacia de 1. Es decir, a partir de densidades de siembra de $6,79 \times 10^3$ células/cm² (con un I.C. del 95% de $6,050$ a $7,599 \times 10^3$ células/cm²) se pueden obtener eficazmente cultivos proliferativos de hHFSCs de forma significativa entre los pases 1 a 5 tras el cultivo primario, mientras que a partir de dichas densidades de siembra se aumenta la probabilidad de que la duplicación de la población de hHFSCs no sea eficaz ($p < 0,0001$; Tjur's R squared = 0,52). Los resultados de ajuste al modelo de regresión logística muestran que el valor β_1 (variable explicativa "densidad de siembra") es negativo, por lo que al aumentar la densidad de siembra decrecerá la probabilidad de obtener hHFSCs con capacidad de duplicación de forma eficaz. El valor *odd ratio* indica, a su vez, que por mil células en la densidad de siembra la probabilidad de obtener hHFSCs con capacidad duplicativa se multiplica por 0,5899, es decir, disminuye la probabilidad de obtener hHFSCs de forma eficaz.

El área bajo la curva (AUC) muestra un valor superior al 0,50 y cercano a 1 (0,9037 [I.C. del 95% de 0,8561 a 0,9513]) (Tabla 20; Figura 33).

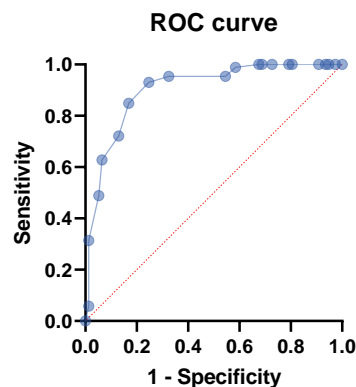


Figura 33. Gráfico de curva ROC. Cada punto de la curva ROC informa de su sensibilidad (eje Y) y 1-especificidad (eje X). La línea diagonal discontinua recibe el nombre de diagonal de referencia o línea de no-discriminación. El AUC (área bajo la curva) se corresponde con la zona sombreada y tiene un valor superior a 0,50 (0,9037; Tabla 20).

Por todo lo anterior, los resultados de eficacia en la obtención de hHFSCs con capacidad de duplicación, tomando como variable explicativa la densidad de siembra, se ajustaron de forma significativa a un modelo de regresión logística simple.

1.4.3.2 Modelado estadístico para la optimización de la metodología de obtención de hHF-MSCs.

La generación de una metodología optimizada podría facilitar la producción de un mayor número de hHF-MSCs con una óptima capacidad de duplicación y, en un futuro, la generación de hHF-MSCs como productos de terapia celular que exhiban de manera consistente y robusta el rango deseado de propiedades terapéuticamente significativas. Por ello se procedió a realizar un análisis de regresión logística en el que se consideró la densidad de siembra y el efecto de la edad de los donantes para comprender qué variable es más explicativa o está más fuertemente asociada a la capacidad de duplicación de las hHFSCs durante los primeros pases tras el cultivo primario (pases 1 a 5). Aunque la variable “densidad de siembra” se ajustó de forma significativa a un modelo de regresión logística simple (apartado 1.4.2), no obstante, y dado que existe al menos otra variable que puede justificar la eficacia en la obtención de hHFSCs proliferativas dentro de un modelo predictivo, se incluyó la edad de los donantes de explantes de folículo piloso en la estimación de un modelo de regresión logística múltiple, ya que la eficacia en la obtención de hHFSCs en el cultivo primario y primer pase se ve afectada con el aumento de la edad del donante de explantes de folículo piloso, tal y como se mostró en el apartado 1.3 de Resultados, y podría afectar también en pases posteriores.

El modelo estadístico desarrollado para ayudar a identificar las combinaciones óptimas de los parámetros que predicen los mejores resultados experimentales para conseguir hHFSCs con una óptima capacidad de duplicación se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. Modelo de regresión logística múltiple generado para la optimización de la metodología de obtención de hHFSCs con capacidad de duplicación en los primeros pases tras el cultivo primario (pases 1 a 5).

Model				
Parameter estimates	Variable	Estimate	Standard error	95% CI (profile likelihood)
β_0	Intercept	6,941	1,475	4,267 to 10,09
β_1	Densidad siembra	-0,6384	0,09933	-0,8547 to -0,4627
β_2	Edad	-0,08472	0,03532	-0,1568 to -0,01711
Odds ratios	Variable	Estimate	95% CI (profile likelihood)	
β_0	Intercept	1033	71,30 to 24200	
β_1	Densidad siembra	0,5281	0,4254 to 0,6296	
β_2	Edad	0,9188	0,8549 to 0,9830	
Sig. diff. than zero?	Variable	Z	P value	P value summary
β_0	Intercept	4,707	<0,0001	****
β_1	Densidad siembra	6,427	<0,0001	****
β_2	Edad	2,399	0,0165	*
Model diagnostics	Degrees of Freedom	AICc	Negative log likelihood value	
Intercept-only model	162	227,5	112,7	

Model				
Selected model	160	124,9	59,38	
Multicollinearity	Variable	VIF	R2 with other variables	
β_0	Intercept			
β_1	Densidad siembra	1,029	0,02811	
β_2	Edad	1,029	0,02811	
Area under the ROC curve				
Area	0,9132			
Std. Error	0,02243			
95% confidence interval	0,8692 to 0,9571			
P value	<0,0001			
Classification table	Predicted 0	Predicted 1	Total	% Correctly classified
Observed 0	65	12	77	84,42
Observed 1	10	76	86	88,37
Total	75	88	163	86,5
Negative predictive power (%)	86,67			
Positive predictive power (%)	86,36			
Classification cutoff	0,5			
Pseudo R squared				
Tjur's R squared	0,5402			
Cox-Snell's R squared	0,4804			
Nagelkerke's R squared	0,6412			
Hypothesis tests	Statistic	P value	Null hypothesis	Reject Null Hypothesis?
Hosmer-Lemeshow	6,653	0,5745	Selected model is correct	No
Data summary				
Rows in table	163			
Rows skipped (missing data)	0			
Rows analyzed (#observations)	163			
Number of 1	86			
Number of 0	77			
Number of parameter estimates	4			
#observations/#parameters	40,8			
# of 1/#parameters	21,5			
# of 0/#parameters	19,3			

Con los datos disponibles tras el cultivo de hHFSCs entre los pases 1 a 5 (n=163; 12 donantes de 21 a 47 años), los resultados obtenidos tras el análisis de regresión logística múltiple (Tabla 21) mostraron que, tanto el aumento en la densidad de siembra, como el aumento de la edad de los donantes, disminuyen de forma significativa la probabilidad de obtener hHFSCs con capacidad de duplicación, siendo la densidad

de siembra la variable explicativa más fuertemente relacionada con la capacidad de duplicación de la población hHFSC ($p < 0,0001$). Por cada mil células que se incremente la densidad de siembra, la probabilidad de obtener hHFSCs se multiplica por 0,5281 (I.C. del 95% de 0,4254 a 0,6296); es decir disminuye la probabilidad de éxito.

El modelo predictivo confirma que la edad de los donantes disminuye la eficacia en la obtención de cultivos proliferativos de hHFSCs entre los pases 1 y 5.

Además de las variables anteriormente expuestas, y debido a que la capacidad proliferativa de las células en cultivo a menudo se ve comprometida durante los múltiples subcultivos y pases, se valoró si la variable “número de pases” podría afectar a la obtención óptima de hHFSCs. La inclusión de esta variable como posible variable explicativa dentro de un modelo estadístico no mostró un efecto significativo en la capacidad de duplicación de la población, al menos con los datos disponibles de los pases 1 a 5, y la introducción de este parámetro en un modelo de regresión logística no generó un modelo de mejor ajuste, por lo que no se seleccionó para la generación del modelo estadístico predictivo.

La selección del modelo mostrado en la Tabla 21 siguió los mismos valores de diagnóstico del modelo de regresión que los utilizados en el apartado 1.3.2.

El análisis de multicolinealidad mostró un valor VIF cercano a 1, lo que indica una menor correlación entre las variables y, por tanto, un mejor ajuste a un modelo de regresión logística. Tanto el valor VIF como los valores pseudo- R^2 demostraron la no existencia de multicolinealidad.

La curva ROC mostró una alta sensibilidad y especificidad del modelo predictivo, como puede apreciarse en la Figura 34-A. Asimismo, el área bajo la curva ROC fue cercana a 1 (0,9132, con un intervalo de confianza del 95% de 0,8692 a 0,9571).

Asimismo, se comprobó si el modelo de regresión logística es predictivo según el test de hipótesis de Hosmer-Lemeshow, en el que el valor de p debe ser superior a 0,05 para que el modelo predictivo seleccionado se considere correcto, y se comprobó que el poder de predicción de los casos positivos y negativos fuese superior al 62,50%. Los resultados mostraron que el poder de predicción del modelo fue del 86,67% para los casos negativos y del 86,36% para los casos positivos. Asimismo, la interpretación gráfica de la clasificación de los casos que realizó el modelo (Figura 34-B) mostró un gráfico de dispersión tipo violín, que demuestra el buen funcionamiento del modelo para la predicción de cultivos proliferativos (Observed 1) como la de aquellos cuya capacidad de duplicación se ve alterada (Observed 0). En este gráfico, podemos ver que la mayoría de los cultivos con capacidad de duplicación había pronosticado probabilidades de éxito o fracaso en la duplicación muy por encima o por debajo de 0,5, respectivamente (con una mediana inferior a 0,20), es decir, si la mediana está situada en la parte inferior del gráfico para los Observed 0 significa que el modelo está haciendo una buena predicción para este grupo, de igual forma, pero por la parte superior para las predicciones de alta eficacia en la duplicación. También

podemos ver que el modelo funcionó también bien al clasificar el grupo de cultivos no proliferativos (con una mediana superior a 0,80). De igual forma, en la clasificación de la Tabla 21 se muestra un alto porcentaje de casos correctamente clasificados para los casos observados 0 (84,42%) y 1 (88,37%).

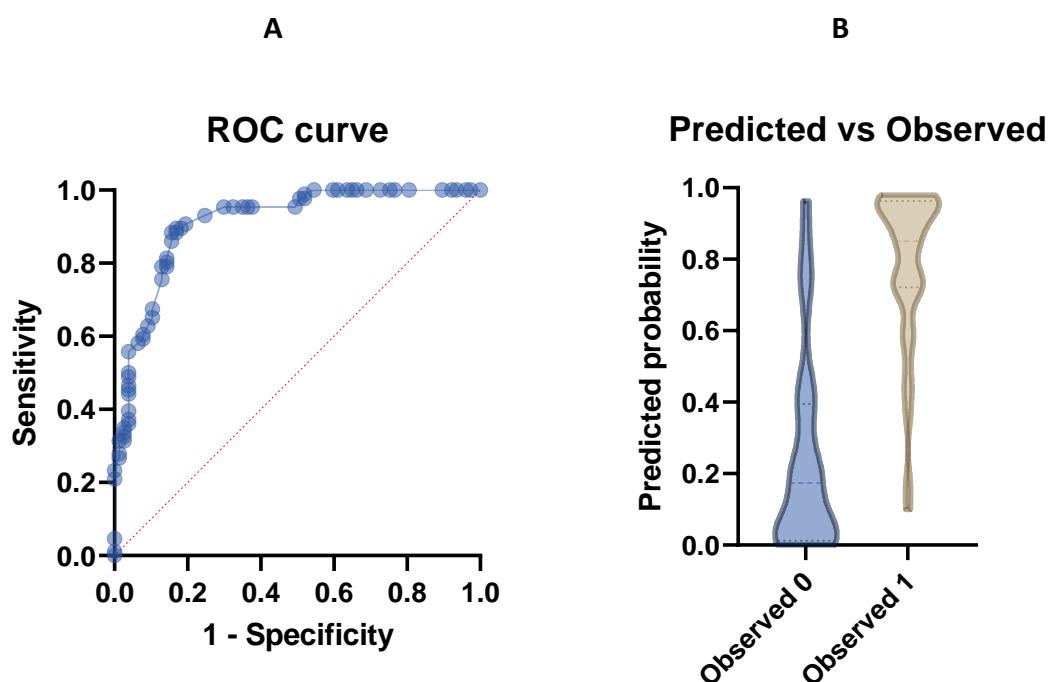


Figura 34. Curva ROC (A) y gráfico tipo violín de la distribución de la probabilidad de predicción de los casos observados. A) Curva ROC. Cada punto de la curva ROC informa de su sensibilidad (eje Y) y 1-especificidad (eje X). La línea diagonal discontinua recibe el nombre de diagonal de referencia o línea de no-discriminación. B) Casos observados: 0 (no proliferativos); 1 (cultivos con capacidad de duplicación); mediana (línea discontinua media); cuartiles 1 y 3 (líneas punteadas).

El empleo de este modelo predictivo generado para la optimización en los procesos de obtención de hHFSCs entre los países 1 y 5 puede emplearse para predecir la probabilidad de éxito en la obtención de hHFSCs con capacidad de duplicación, a partir de la densidad de siembra y la edad del donante. En la Tabla 22 se muestran diferentes ejemplos de predicción derivados de este modelo generado para la obtención eficaz de hHFSCs con capacidad proliferativa. Con los datos de que disponemos para la generación del modelo, y tras el análisis de resultados de ajuste de nuestros al datos al mismo, podemos predecir, por ejemplo, que si la edad del donante de explantes de foliculo piloso fuese de 25 años, y se emplease una densidad de siembra de 5.000 células/cm², la probabilidad de obtener con éxito hHFSCs con capacidad de duplicación sería del 83,62%, mientras que, en las mismas condiciones de cultivo, un donante de 45 años presentaría una probabilidad de éxito del 48,40%, disminuyendo aún más la probabilidad de obtener hHFSCs proliferativas (12,14%) si la densidad de siembra se aumentase a 9.000 células/cm² (R^2 deTjur = 0,5402; p (Hosmer-Lemeshow) = 0,5745; poder predictivo del 86,36%).

Tabla 22. Ejemplo de predicción obtenida en base al modelo de la Tabla 21.

Edad	Predicción (probabilidad de éxito)	
	Densidad de siembra (5.000 células/cm ²)	Densidad de siembra (8.000 células/cm ²)

Edad	Predicción (probabilidad de éxito)	
20	88,64	53,46
25	83,62	42,93
30	76,97	32,99
35	68,64	24,38
40	58,89	17,43
45	48,40	12,14
50	38,04	8,29
55	28,67	5,59
60	20,83	3,73

1.5 EFECTO DEL EMPLEO DE SUERO BOVINO FETAL EN LA EXPANSIÓN CELULAR PARA SU POSTERIOR DIFERENCIACIÓN A LINAJES MESODÉRMICOS.

Con la finalidad de estudiar los efectos del empleo de suero bovino fetal (FBS) en la proliferación de hHFSCs (caracterizadas como hHF-MSCs en los apartados 2 y 3 de Resultados) en pases altos (6-12) se ha llevado a cabo la comparación de los resultados con los obtenidos en la expansión con HPL (lisado de plaquetas humano comercial) en los mismos pases. Ambas poblaciones fueron expandidas hasta alcanzar el 90% de confluencia para comparar los tiempos de duplicación de cada población celular. En hHF-MSCs el valor PDT tras la expansión con suero FBS fue 78,21 horas (con un intervalo de confianza del 95% de 72,66 a 88;40), significativamente superior al mostrado por las células expandidas con HPL (39,68 h [I.C. del 95% de 38,43 a 45,80]) (Tabla 23; Figura 35-B), de modo que la comparación resultó en un PDT casi el doble de veces más rápido cuando las células fueron expandidas con suero HPL que el mostrado por las hHF-MSCs expandidas con FBS.

La confluencia se alcanzó antes en células expandidas con HPL debido a su mayor capacidad de proliferación (Figuras 35-A y B), a pesar de su menor tamaño. La población hHF-MSC expandida con FBS mostró un aumento del diámetro del 28,35% (Figura 35-C).

Tabla 23. Estadísticos descriptivos de los recuentos de células viables por donante y réplica.

		Suero HPL	Suero FBS	p-valor
hHF-MSCs por donante y réplica (x 10⁶)	Promedio ± SD	1,34 ± 0,51	1,32 ± 0,18	0,5685
	Mediana (Q1; Q3)	1,41 (0,97; 1,66)	1,33 (1,14; 1,47)	
	I.C. (95%)	(1,18; 1,61)	(1,12; 1,49)	
PDT (h)	Promedio ± SD	42,72 ± 7,07	79,68 ± 7,83	< 0,0001
	Mediana (Q1; Q3)	39,68 (38,38; 45,99)	78,21 (73,12; 87,10)	
	I.C. (95%)	(38,43; 45,80)	(72,66; 88;40)	

Valores PDT (tiempo de duplicación de la población) calculados para la población hHF-MSC expandida con dos tipos de suero: HPL (lisado de plaquetas humano comercial) y FBS (suero bovino fetal comercial); n=2, por triplicado; pases 6-12; edad de los donantes 21 y 31 años). Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% (I.C.); resultados de los p-valores de la comparación entre las dos poblaciones obtenidos mediante la prueba Mann-Whitney.

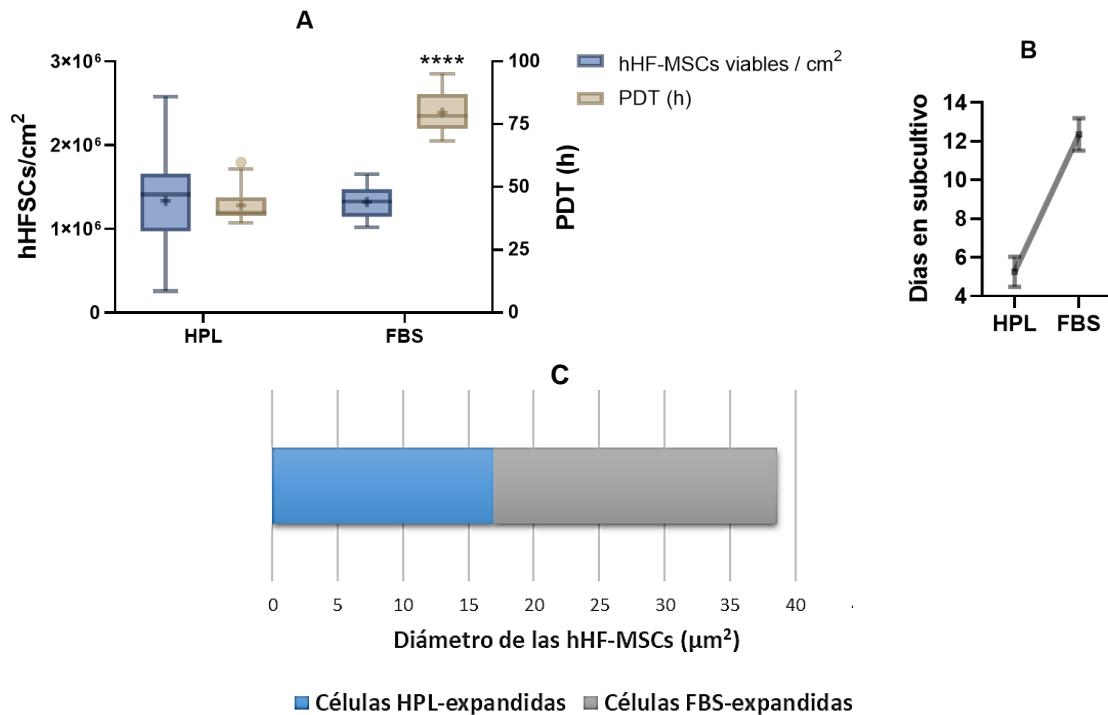


Figura 35. Proliferación de las hHF-MSCs expandidas con suero bovino fetal (FBS) y con lisado de plaquetas humano comercial (HPL); (N=2, por triplicado; pases 6 a 12; edad de los donantes 21 y 31 años). A) Recuento de viables y tiempo de duplicación de la población (PDT) en horas. El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (+), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Los valores atípicos se representan con un círculo. ***p<0.001; test Mann Whitney. El gráfico B representa los días de cultivo hasta alcanzar el 90% de confluencia. C) Gráfico de barras apiladas que representa el aumento del diámetro de las hHF-MSCs expandidas con suero FBS (21,73 μm^2 ; Azuaje-Hualde et al., 2021) respecto al diámetro que presentaron las mismas células expandidas con suero de plaquetas humano comercial (HPL) (16,93 μm^2).

El empleo de FBS en estos ensayos tuvieron como objetivo la expansión previa de las hHF-MSCs para su empleo posterior en ensayos de diferenciación y transfección celular, ya que se ha descrito que las MSCs no pierden sus propiedades al ser previamente expandidas con FBS en este tipo de ensayos (Gregory et al., 2006; Matthyssen et al., 2017). El uso de FBS estuvo motivado por el menor coste para la expansión de los cultivos.

2 CARACTERIZACIÓN DE LAS hHFSCs DE FOLÍCULO PILOSO HUMANO DE LA REGIÓN OCCIPITAL.

2.1 CULTIVO DE hHFSCs PARA SU CARACTERIZACIÓN.

La población celular derivada de los explantes de folículo piloso se seleccionó por su capacidad de adherencia a la superficie plástica del frasco de cultivo. Asimismo, el medio de cultivo de estas células se empleó para favorecer el aislamiento de MSCs procedentes del folículo piloso (apartado 1 de Resultados). La capacidad de adhesión celular es uno de los criterios mínimos propuestos por la ISCT para la definición de población MSC (Dominici et al., 2006).

El conjunto de células adherentes del folículo piloso humano (hHFSCs) obtenidas a partir de explantes de 12 donantes se expandieron mediante sucesivos pases con un medio de cultivo basal suplementado con un lisado de plaquetas humano comercial (HPL) para obtener el número necesario de células viables para su criopreservación, caracterización, estudio de su capacidad proliferativa y de la producción de factores inductores de la diferenciación osteogénica. El diseño experimental se muestra en la Figura 36.

Para la caracterización de las hHFSCs se emplearon cultivos procedentes de donantes de entre 21 y 31 años en pases entre 4 y 6; no obstante, la demostración de su potencial multipotente se llevó a cabo también con pases altos. Las densidades de siembra empleadas fueron de 8.000 células/cm² para los estudios de la morfología e inmunofenotipo mesenquimal por citometría de flujo y de 12.500 células/cm² para los ensayos de diferenciación a linajes mesodérmicos. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con un lisado de plaquetas humano comercial (HPL), con la excepción de las hHFSCs destinadas a su diferenciación osteogénica y condrogénica que se expandieron con suero bovino fetal (FBS). La selección de las diferentes densidades de siembra, del empleo de HPL e incluso la selección de donantes se realizó teniendo en cuenta la disponibilidad de células viables y proliferativas, el análisis realizado previamente sobre el efecto de estas variables en la obtención eficaz de las hHFSCs y los ensayos a los que se destinan, tal y como se expone en los análisis del apartado 1 de Resultados.

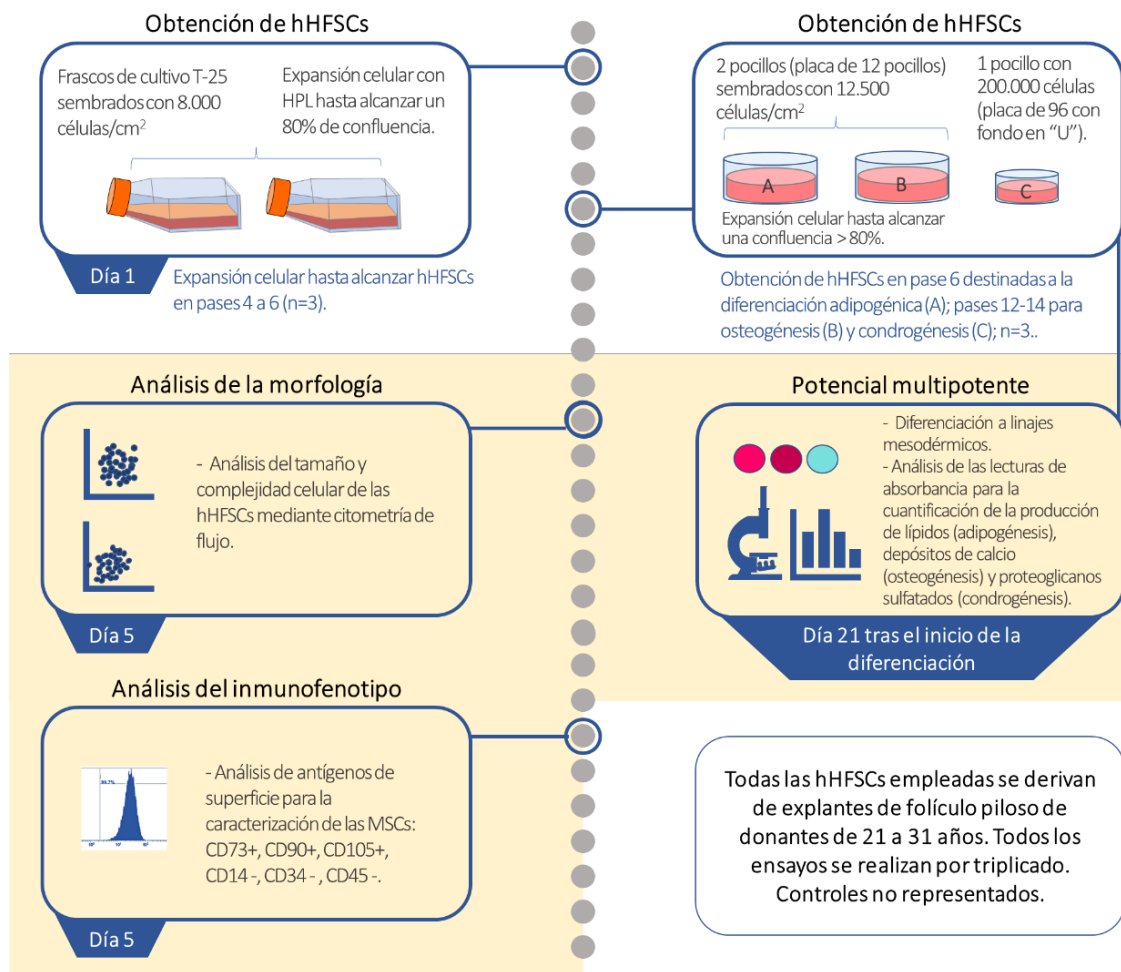


Figura 36. Esquema general del diseño experimental para la obtención de hHFSCs destinadas a la caracterización como hHF-MSCs siguiendo los criterios mínimos propuestos por la ISCT.

2.2 MORFOLOGÍA.

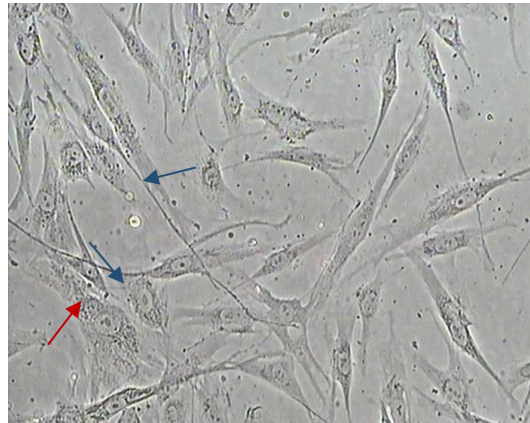
La morfología de las hHFSCs (células estromales derivadas de folículo piloso humano) fue observada a microscopía de contraste de fases y se apreció morfología fusiforme similar a los fibroblastos y la presencia de células con morfologías poligonales aplanadas (no compactas), así como células con una morfología más alargada y dendrítica (Figura 37). Asimismo, se observaron algunas células con morfología tricúspide (Figura 37; B y F). No se observaron morfologías poligonales compactas ni agregados similares a cuerpos embrioides.

Al alcanzar la confluencia, se apreciaron cambios en la morfología: un mayor aplanamiento celular (Figura 37 F – I) y agregaciones multicapa cuando se produjeron estados de confluencia total (Figura 37 – I).

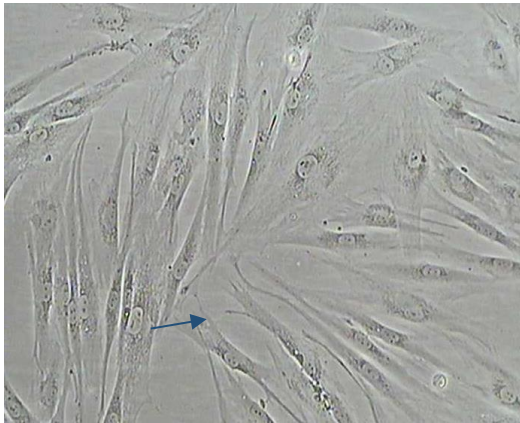
A



B



C



D



E



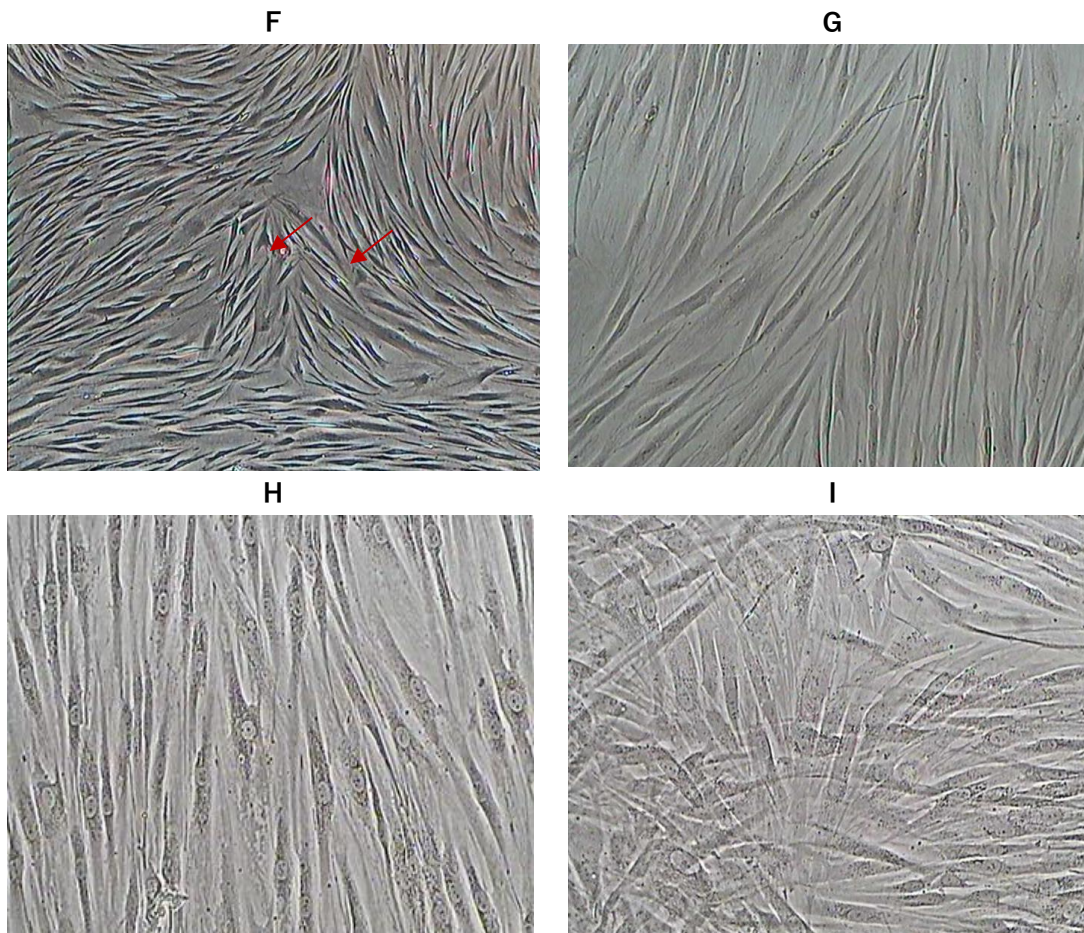


Figura 37. Imágenes de hHFSCs aisladas a partir de explantes de folículo piloso y subcultivadas hasta el pase 6. A) morfologías fusiformes y alargadas en pase 1; 10X aumentos; B-C) morfologías fusiformes y algunas células poligonales aplanadas y dendríticas, todas características de las MSCs del folículo piloso; pases 1 y 3; 10X aumentos; D) morfologías poligonales aplanadas características de las células de la papila dérmica; pase 6; 20X; E) morfologías fusiformes y morfologías dendríticas; pase 6, 40X; F – H) células en confluencia; pase 6; 4X, 10X y 20X; I) células en confluencia con agregaciones multicapa; pase 6; 20X. Las flechas azules señalan algunas células con morfología más alargada y dendrítica, mientras que las flechas rojas señalan algunas células con morfología tricúspide. La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de 720 x 576 μm^2 .

En los casos en que los cultivos celulares detuvieron su proliferación, y no pudieron recuperarse tras la tripsinización y la renovación del medio completo, las células llegaron a mostrar la morfología mostrada en la Figura 38.

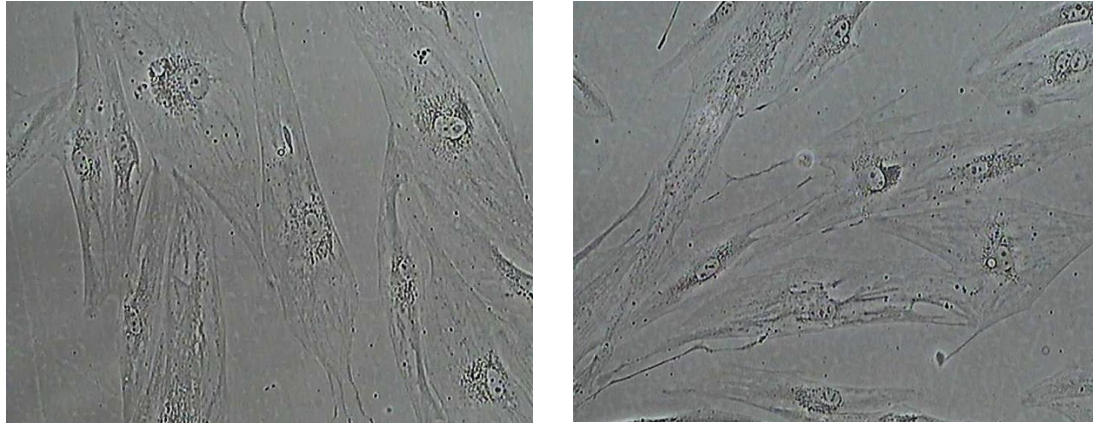


Figura 38. Imágenes de hFSCs no proliferantes (10X aumentos) en los primeros subcultivos tras el cultivo primario. La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de $720 \times 576 \mu\text{m}^2$.

Además del estudio morfológico por microscopía, para comprobar si se observan cambios en la morfología a lo largo de los pases 4 y 6, se llevó a cabo un estudio de su tamaño y complejidad celular mediante citometría de flujo (Figura 39).

El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo en 10.000 células de cada cultivo. Los gráficos indicaron el tamaño y la complejidad celular determinados por la dispersión frontal (FS) y dispersión lateral (SS), respectivamente (Figura 39). Los gráficos muestran cada punto como un evento (partícula que ha sido excitada por el láser) y representan mediante colores la frecuencia relativa (densidad) de las poblaciones. Los resultados obtenidos por citometría no mostraron un cambio significativo del tamaño celular, ni cambios en la complejidad celular entre los pases 4 y 6.

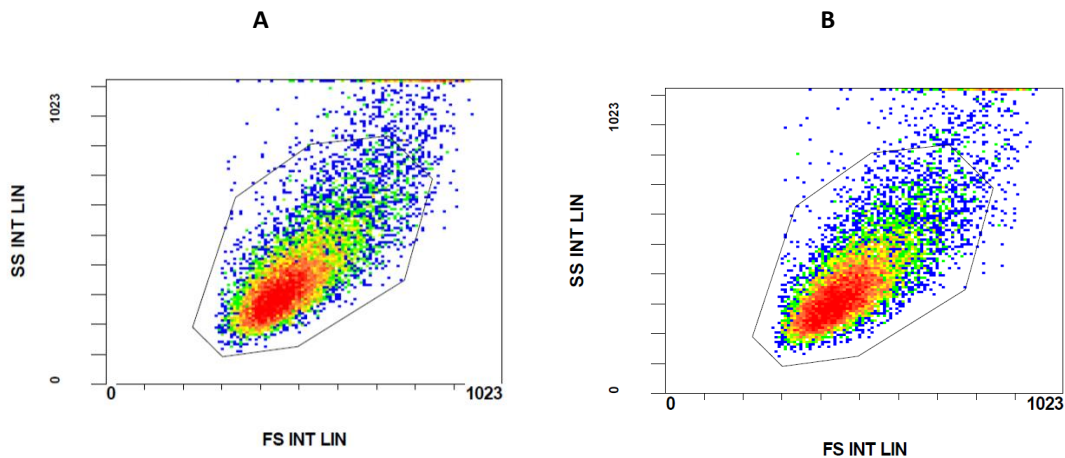


Figura 39. Gráficos de dispersión lateral (SS) y dispersión frontal (FS). A) hFSCs en pase 4; B) pase 6. Los gráficos muestran cada punto como un evento (cualquier partícula que haya sido excitada por el láser). Por tal motivo, el desplazamiento de los puntos hacia la derecha indica un aumento de tamaño celular (FS); mientras que el desplazamiento de los puntos hacia arriba mostraría un aumento de la complejidad celular (SS). Las poblaciones con mayor número de eventos (mayor frecuencia relativa) se representan mediante colores cercanos al rojo.

2.3 ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPO.

Se analizaron los antígenos de superficie recomendados por la ISCT (Dominici et al., 2006) mediante citometría de flujo, para caracterizar la población hHFSC. Este estudio se realizó en hHFSCs en pases 4 y 6 debido a que: a) el número mínimo de hHFSCs clínicamente relevante se alcanza entre los pases 2 y 3 (apartado 3.5 de Resultados), b) en estos pases la población hHF-MSc puede ser más homogénea que en el pase 3, y c) en terapia celular se emplean generalmente pases bajos para evitar la pérdida de capacidad proliferativa de las células debida a procesos de senescencia celular por el aumento del número de subcultivos y pases.

El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo en 10.000 células de cada cultivo (Figura 40). Se aplicó el proceso de compensación al análisis de datos, que fue definido mediante los controles de superposición espectral y el acotamiento de las subpoblaciones de interés.

El análisis por citometría de flujo demostró que los cultivos celulares en pases 4 y 6 de hHFSCs expresan los marcadores mesenquimales característicos de las MSCs, CD73, CD90 y CD105 en pase 4 (99,68%; 99,96% y 99,59%, respectivamente) (Figura 40) y en pase 6 (99,94%, 99,98% y 99,96%, respectivamente) (Figura 41). En contraste, los marcadores hematopoyéticos CD14, CD34 y CD45 no fueron detectados o fueron inferiores al 2% (Figura 41).

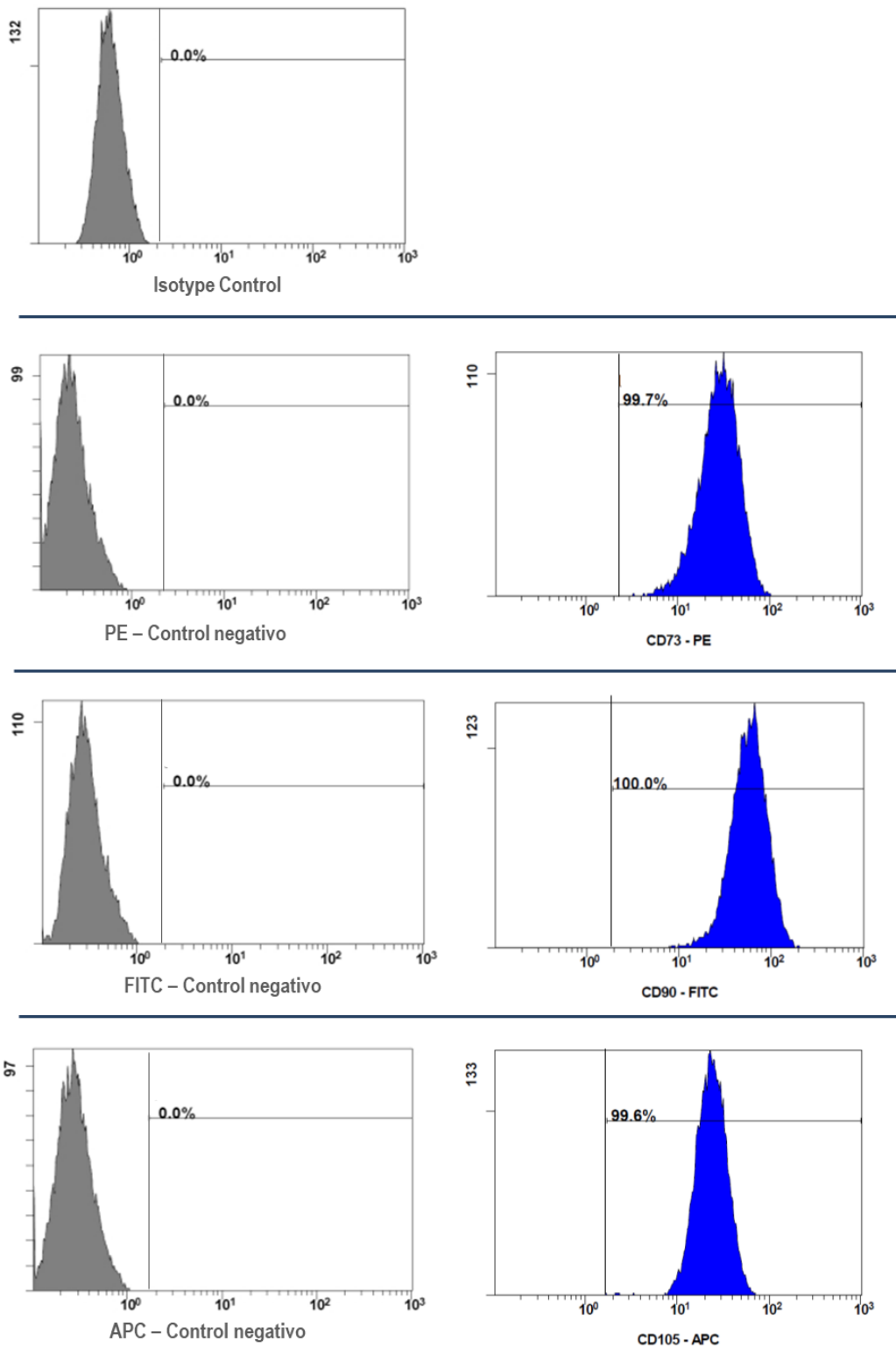


Figura 40. Análisis por citometría de flujo de los antígenos MSCs (CD73, CD90 y CD105) de hHFSCs en fase 4. 1×10^6 células fueron incubadas con anticuerpos primarios conjugados anti CD73-PE, CD90-FITC y CD105-APC. Los controles de isotipo fueron incubados con Mouse IgG1 K Isotype Control-PE, mientras que los controles negativos no fueron incubados con ningún anticuerpo. Los porcentajes indican la fracción de células positivas para un marcador específico.

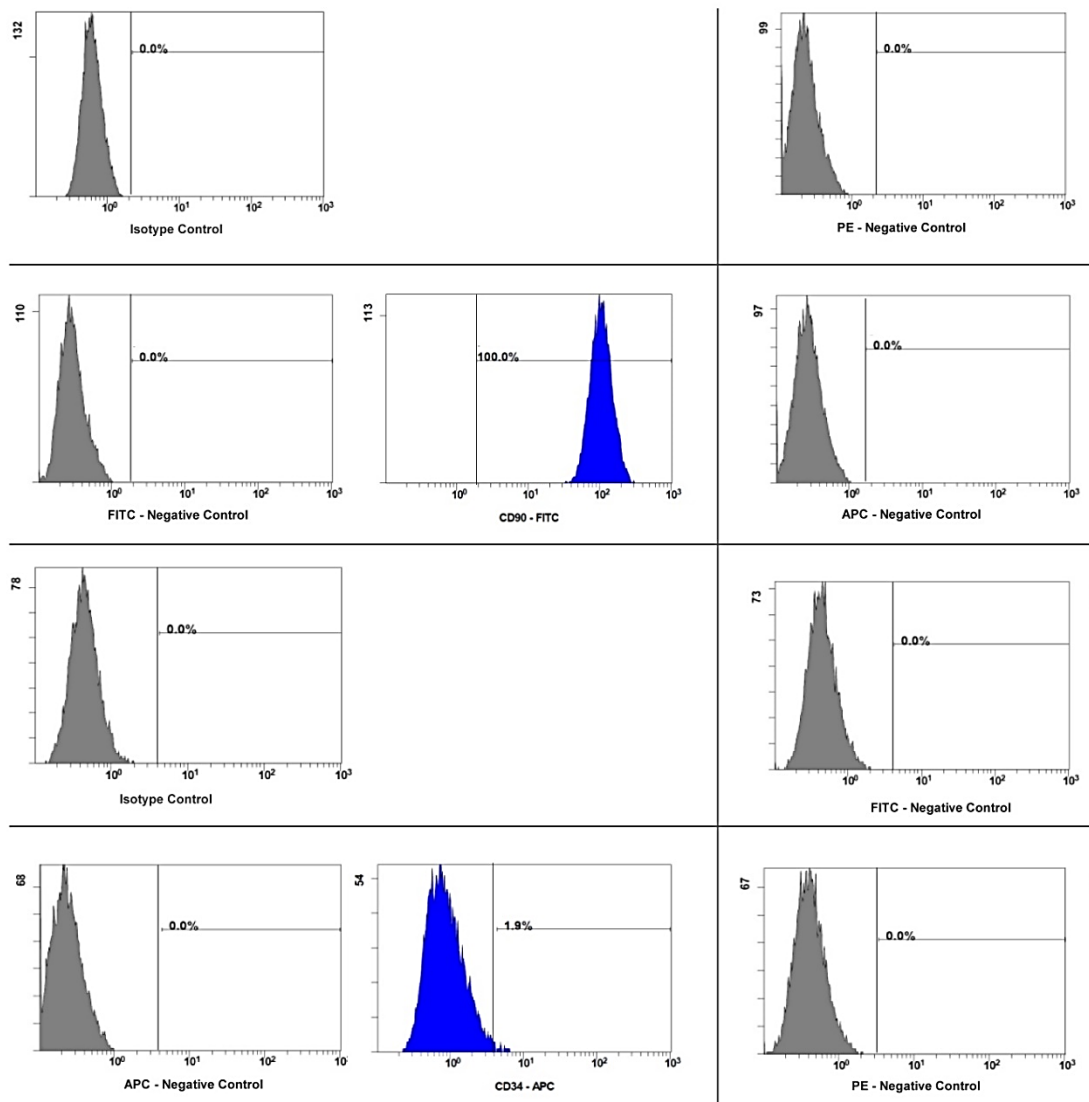


Figura 41. Inmunofenotipo de hHFSCs obtenido mediante citometría de flujo. 1×10^6 células en pase 6 fueron incubadas con anticuerpos primarios conjugados anti CD73-PE, CD90-FITC, CD105-APC, CD14-FITC, CD34-APC y CD45-PE. Los controles de isotipo fueron incubados con Mouse IgG1 K Isotype Control-PE, mientras que los controles negativos no fueron incubados con ningún anticuerpo. Los porcentajes indican la fracción de células positivas para cada marcador específico.

Los gráficos de distribución de las poblaciones celulares de acuerdo con la coexpresión de cada pareja de antígenos de superficie (CD90 vs. CD105, CD90 vs. CD73 y CD73 vs. CD105), tanto en pase 4 como en pase 6, se muestran en la Figura 42. Para obtener el porcentaje de la población de hHFSCs, que coexpresa los marcadores CD73, CD90 y CD105 característicos de las MSCs, tanto en pase 4 como en 6, se emplearon diagramas de Venn. Los resultados revelan, la coincidencia de la expresión de los tres antígenos en más del 99% de las hHFSCs, en ambos pases (Figura 43).

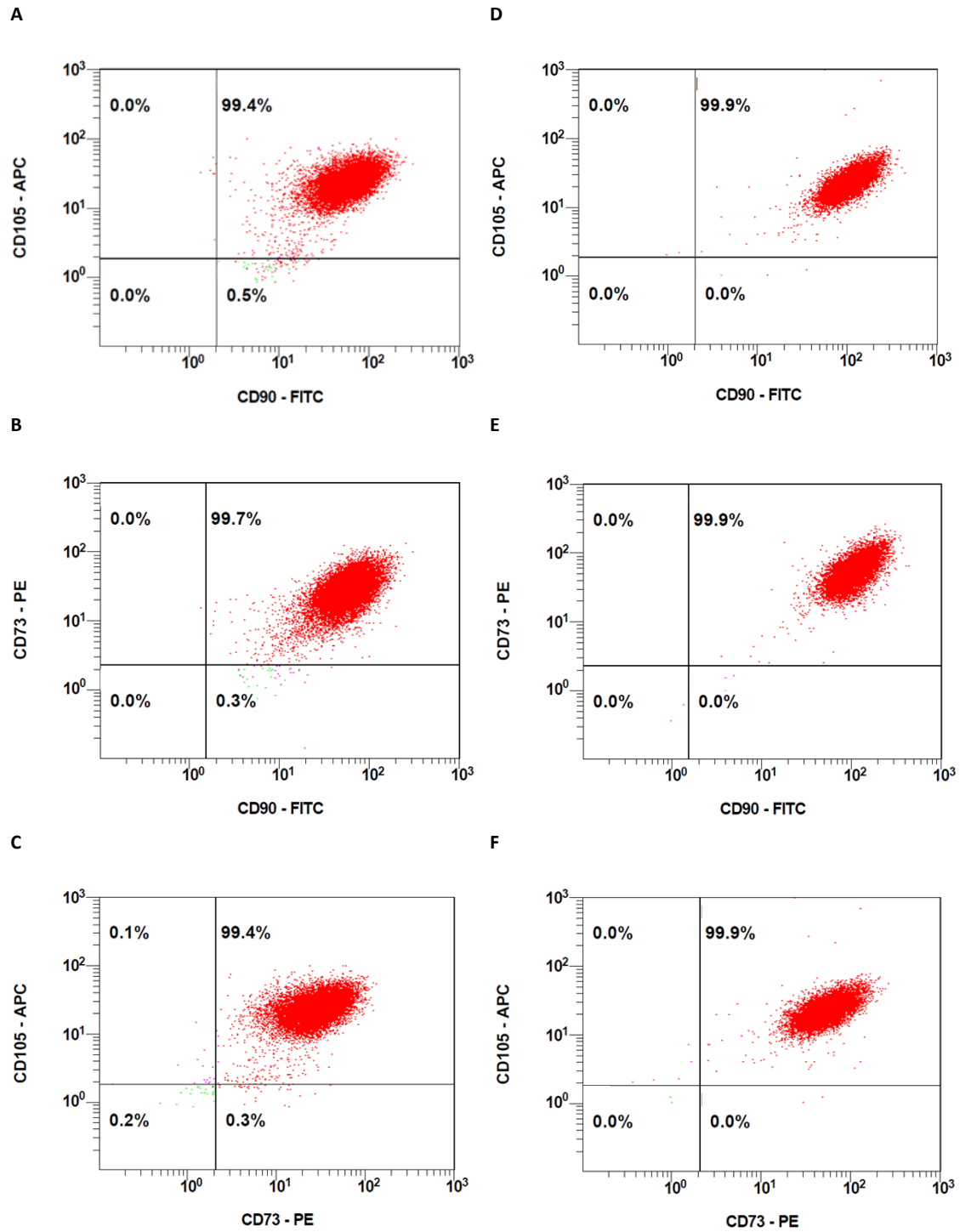


Figura 42. Gráficos de distribución de las poblaciones celulares según la coexpresión (recuadro superior derecho) de parejas de antígenos de superficie en fase 4 (A, B y C) y en fase 6 (D, E, y F).

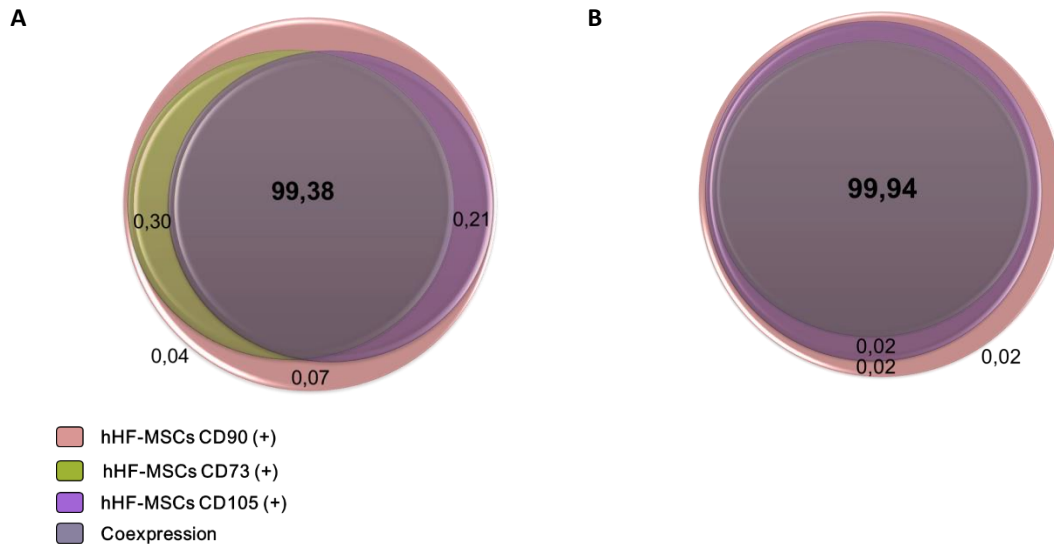


Figura 43. Diagramas de Venn de expresión de los marcadores CD90, CD73 y CD105 en las poblaciones hHFSCs en pase 4 (A) y pase 6 (B). (A) 99,38% de las células en pase 4 coexpresan los tres marcadores MSCs CD73, CD90 y CD105 como puede observarse en la intersección de cada subconjunto. (B) 99,9% de las células coexpresan los tres marcadores en pase 6.

Los datos de citometría de flujo muestran la presencia de una población de hHFSCs capaz de mantener un perfil de antígenos de superficie MSCs estable durante el cultivo a lo largo de los pases, ya que los antígenos mesenquimales CD73, CD90 y CD105 continúan expresándose por encima del 95% de la población celular en pase 6, e incluso por encima de este pase y, al menos, hasta el pase 11 (Tabla 24; Figura 44). No obstante, se observó una disminución significativa cuando se aumentó el número de pases en el porcentaje de hHFSCs que coexpresaban los 3 marcadores mesenquimales.

Tabla 24. Coexpresión de los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105 en hHFSCs entre los pases 4 a 12 obtenida mediante citometría de flujo.

Coexpresión de marcadores mesenquimales			p-valor respecto a P4-6
Pases 4-6	Promedio \pm SD	99,85 \pm 0,17	0,5685
	Mediana (Q1; Q3)	99,99 (99,99; 99,99)	
	I.C. (95%)	(99,99; 99,99)	
Pases 7-9	Promedio \pm SD	97,00 \pm 2,00	0,0083
	Mediana (Q1; Q3)	97,00 (95,00; 99,00)	
	I.C. (95%)	(95,00; 99,00)	
Pases 10-11	Promedio \pm SD	96,00 \pm 2,40	0,0005
	Mediana (Q1; Q3)	97,00 (94,00; 98,00)	
	I.C. (95%)	(94,00; 98,00)	

Valores estadísticos descriptivos de la coexpresión (n=3; pases de 4 a 12 agrupados). Los datos de los pases 7-11 han sido cedidos por el Grupo BIOMICs (UPV/EHU). Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni. Entre los pases 7-9 y 10-11 no hay diferencias significativas.

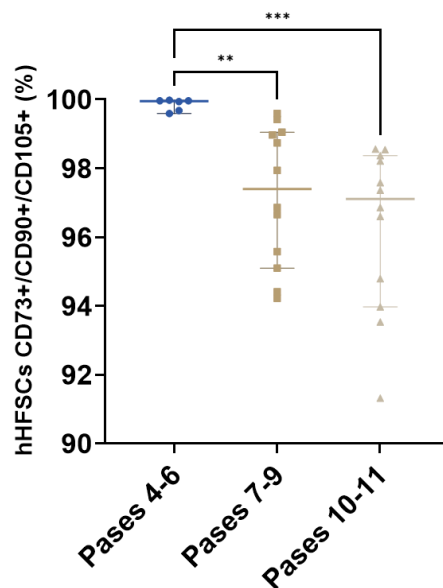


Figura 44. Coexpresión de antígenos de superficie mesenquimales CD73, CD90 y CD105 en hHFSCs obtenidos por citometría de flujo de subpoblaciones en cultivo desde el pase 4 a 12. Datos de los pases 7-11 han sido cedidos por el Grupo BIOMICs (UPV/EHU). Los datos están expresados como mediana e intervalo de confianza del 95%. N=3; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni.

2.4 ESTUDIO DEL POTENCIAL MULTIPOTENTE *IN VITRO* DE LAS hHFSCs PARA SU DIFERENCIACIÓN A LINAJES MESODÉRMICOS.

La potencialidad de las hHFSCs derivadas del explante de folículo piloso fue estimada mediante la inducción a la diferenciación hacia los tres linajes mesodérmicos: adipogénico, osteogénico y condrogénico para poder caracterizarlas como MSCs, siguiendo los criterios mínimos marcados por la ISCT (Dominici et al., 2006). El diseño experimental general del cultivo de las hHFSCs para su posterior inducción a la diferenciación hacia los tres linajes, y los tipos de análisis que se realizaron, se muestran resumidos en la Figura 45.

Para poder comparar el potencial de diferenciación a cada uno de los tres linajes mesodérmicos para una misma población hHF-MSCs, todos los cultivos emplearon hHF-MSCs procedentes de un donante de 25 y otro de 31 años, entre los pases 6 a 14. Se realizaron experimentos independientes para obtener al menos tres réplicas técnicas.

Los ensayos de diferenciación mesodérmica también habían sido realizados previamente por el Grupo Consolidado BIOMICs (UPV/EHU) quienes habían obtenido resultados cualitativos de tinción similares (n=3).

La Figura 45 muestra el esquema del proceso de diferenciación a los tres linajes mesodérmicos. Las hHFSCs fueron expandidas en medio de cultivo basal suplementado con lisado de plaquetas humano comercial (HPL) en el caso de la población celular destinada al ensayo de inducción adipogénica; mientras que para

obtener un número suficiente de células para las diferenciaciones osteogénica y condrogénica se empleó suero bovino fetal (FBS). Las células se sembraron con una densidad de siembra alta, 12.500 células/cm² en pocillos de placas de 12 pocillos en el caso de las diferenciaciones adipogénica y osteogénica y 200.000 células por pocillo de placa de 96 pocillos en "U", en el caso de la diferenciación condrogénica. Los cultivos para la diferenciación adipogénica y osteogénica se expandieron hasta alcanzar una confluencia de 80-90%. En todos los ensayos de diferenciación se emplearon dos tipos de controles (no representados en la Figura 45): un control de la tinción sobre la superficie de las placas de cultivo vacías y un control negativo de la diferenciación. Como control negativo de la diferenciación se emplearon hHFSCs mantenidas en un estado de privación suave con medio de cultivo basal bajo en glucosa suplementado con un menor porcentaje de suero bovino fetal (10%) para facilitar su quiescencia sin provocar la muerte celular durante los días en los que tuvo lugar la diferenciación celular.

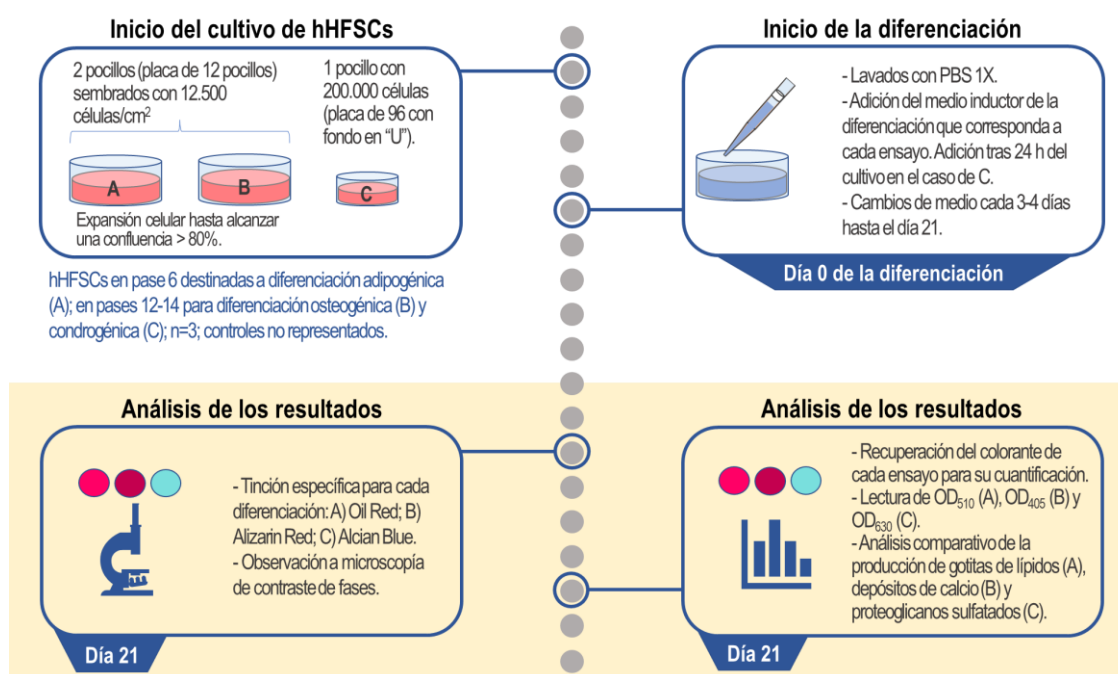


Figura 45. Esquema general del diseño experimental del cultivo de hHFSCs para su posterior inducción a diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica. Se muestran así mismo los análisis que se llevaron a cabo para comprobar su capacidad de diferenciación hacia los tres linajes mesodérmicos. Los controles de cada ensayo no están representados en el esquema. hHFSCs (células estromales derivadas de folículo piloso humano).

En todos los ensayos se emplearon medios de inducción comerciales específicos del linaje mesodérmico. En todos los ensayos se realizaron cambios de medio cada 3-4 días durante 21 días.

Los resultados a microscopía y la posterior cuantificación de los diferentes productos celulares generados tras la diferenciación de las hHF-MSCs a cada uno de los linajes mesodérmicos mostraron que la población hHFSC posee potencial de diferenciación a los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico; potencial que, como ya se ha puntualizado, deben mostrar las MSCs para ser caracterizadas como tal. El análisis cualitativo de la diferenciación adipogénica se llevó a cabo tras la tinción con Oil Red, que permite detectar la presencia de depósitos de lípidos característicos de los adipocitos. Tras el análisis cualitativo de la

adipogénesis, se determinó de forma cuantitativa el potencial adipogénico mediante la lectura de la densidad óptica a 510 nm (OD_{510}) del colorante extraído de las poblaciones diferenciadas (Tabla 25; Figura 46). Los resultados mostraron una presencia significativa de lípidos por parte de las hHFSCs diferenciadas.

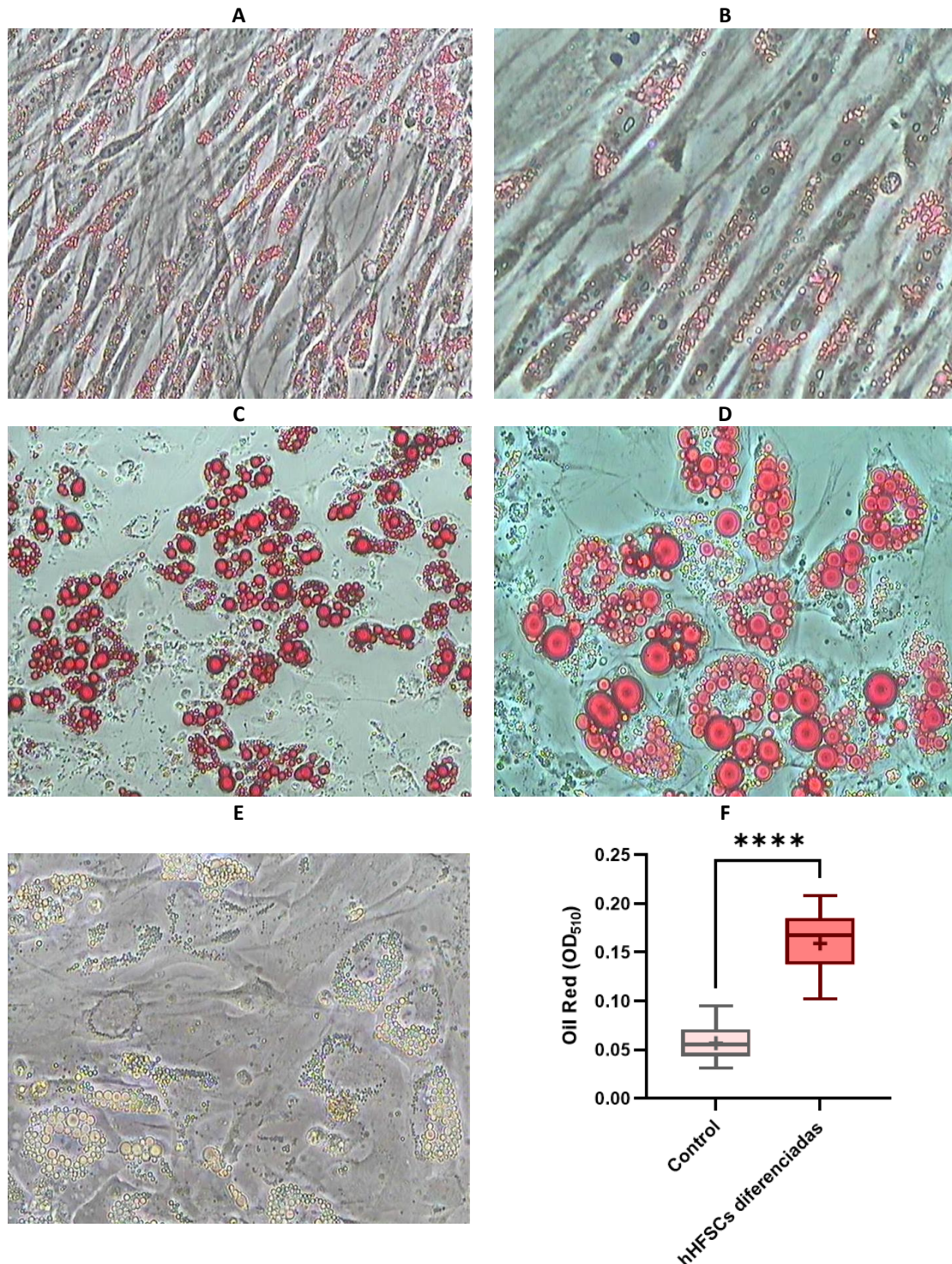
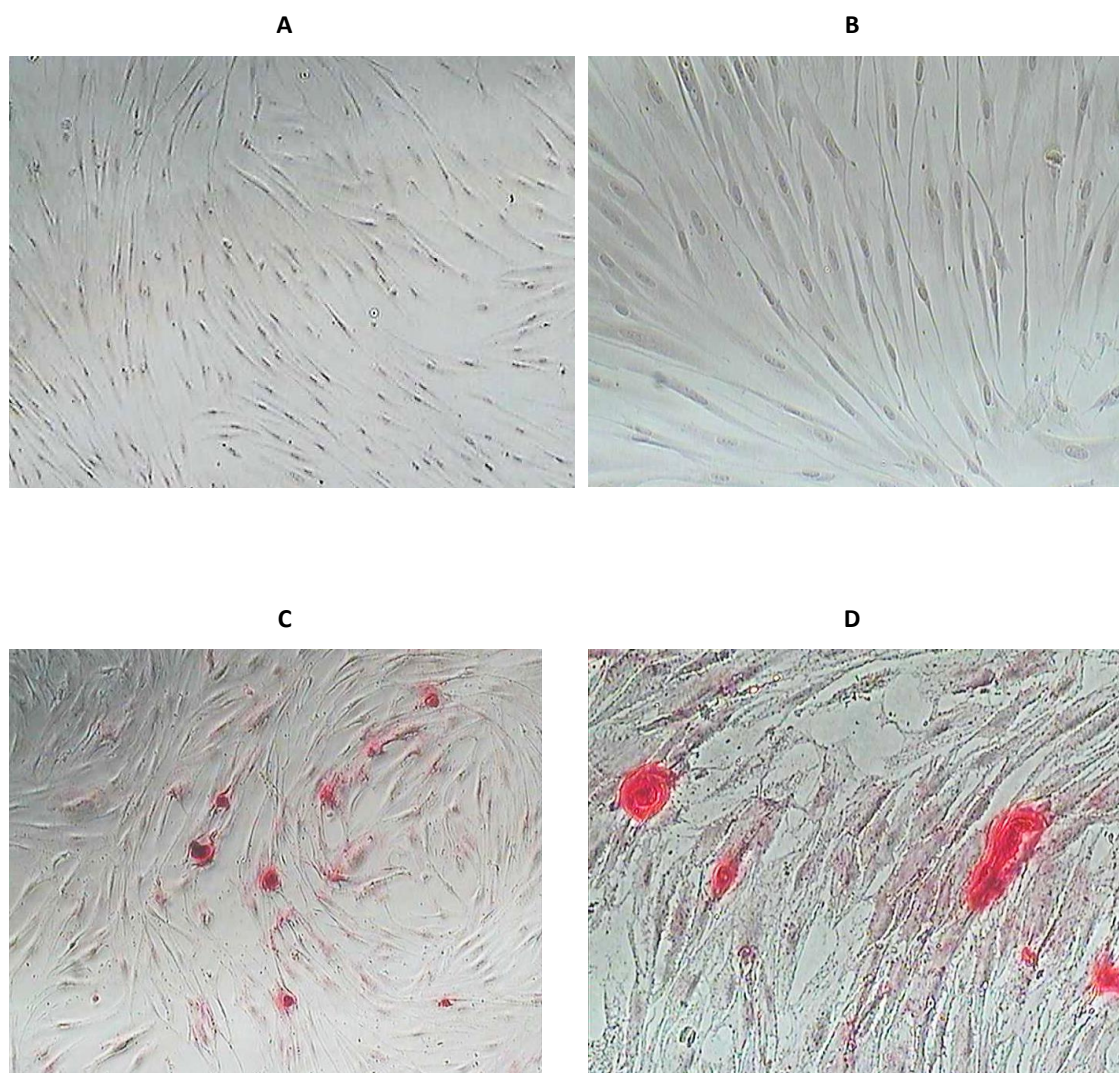


Figura 46. Potencial adipogénico de las hHFSCs tras 21 días de diferenciación. A-E: Imágenes obtenidas a microscopía tras tinción con Oil Red. Control negativo de diferenciación (A y B) a 20X y 40X aumentos, respectivamente. hHFSCs diferenciadas (C – D) a 10X y 20X aumentos. Morfología de las hHFSCs correspondiente al día 16 del proceso de diferenciación (E). La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de $720 \times 576 \mu\text{m}^2$. F: Cuantificación de Oil Red. El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (X), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja,

respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Las diferencias significativas se muestran frente a la población control no diferenciada; **** $p < 0.0001$; test Mann-Whitney.

La inducción osteogénica fue analizada mediante la detección de la mineralización de la matriz de los osteoblastos con la tinción con Alizarin Red S, que tiñe los nódulos de calcio producidos durante la diferenciación. La presencia de nódulos de calcio producidos por los osteoblastos derivados de las hFSCs se muestra en la Figura 47 A-D. Asimismo, en la Figura 47 – E se observa una morfología similar a osteoblasto en los últimos días de diferenciación. Además de la observación de los resultados de la tinción, y tras disolver los nódulos mineralizados, se llevó a cabo la lectura de la densidad óptica a 405 nm (OD_{405}). (Tabla 25; Figura 47-F). Los resultados mostraron que las hFSCs poseen un potencial osteogénico significativo, aunque, al igual que mostraron las imágenes de los nódulos de calcio, la lectura a 405 nm mostró un potencial de diferenciación osteogénica inferior a los observados para otras MSCs.



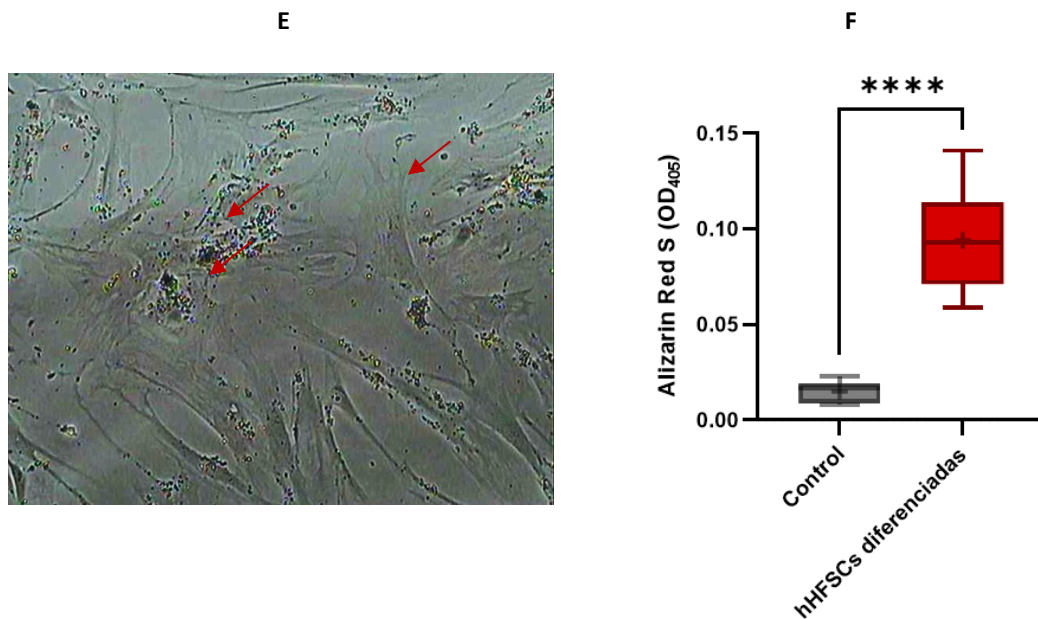


Figura 47. Potencial osteogénico de las hHFSCs tras 21 días de diferenciación. A-E: Imágenes obtenidas a microscopía tras tinción con Alizarin Red. Control negativo de diferenciación (A y B) a 4X y 10X aumentos, respectivamente. hHFSCs diferenciadas (C – D) a 4X y 10X aumentos. Morfología de las hHFSCs durante el proceso de diferenciación (E). Las flechas señalan una morfología similar a osteoblasto. La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de 720 x 576 μm^2 . F: Cuantificación de Alizarin Red. El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (X), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Las diferencias significativas se muestran frente a la población control no diferenciada; **** $p < 0.0001$; test Mann-Whitney.

El potencial de las hHFSCs para la diferenciación condrogénica se analizó mediante la tinción con Alcian Blue, que tiñe los proteoglicanos sulfatados. Tras el análisis cualitativo de la condrogénesis, se determinó de forma cuantitativa el potencial condrogénica mediante la lectura de la densidad óptica a 630 nm (OD_{630}) del colorante extraído de las poblaciones diferenciadas. Tras los resultados obtenidos (Tabla 25; Figura 48) se observó un potencial condrogénico significativo de la población hHFSC. Asimismo, se observó una leve coloración generalizada de las hHFSCs sin diferenciar tras la tinción con Alcian Blue (Figura 48 - A; inferior izquierda).

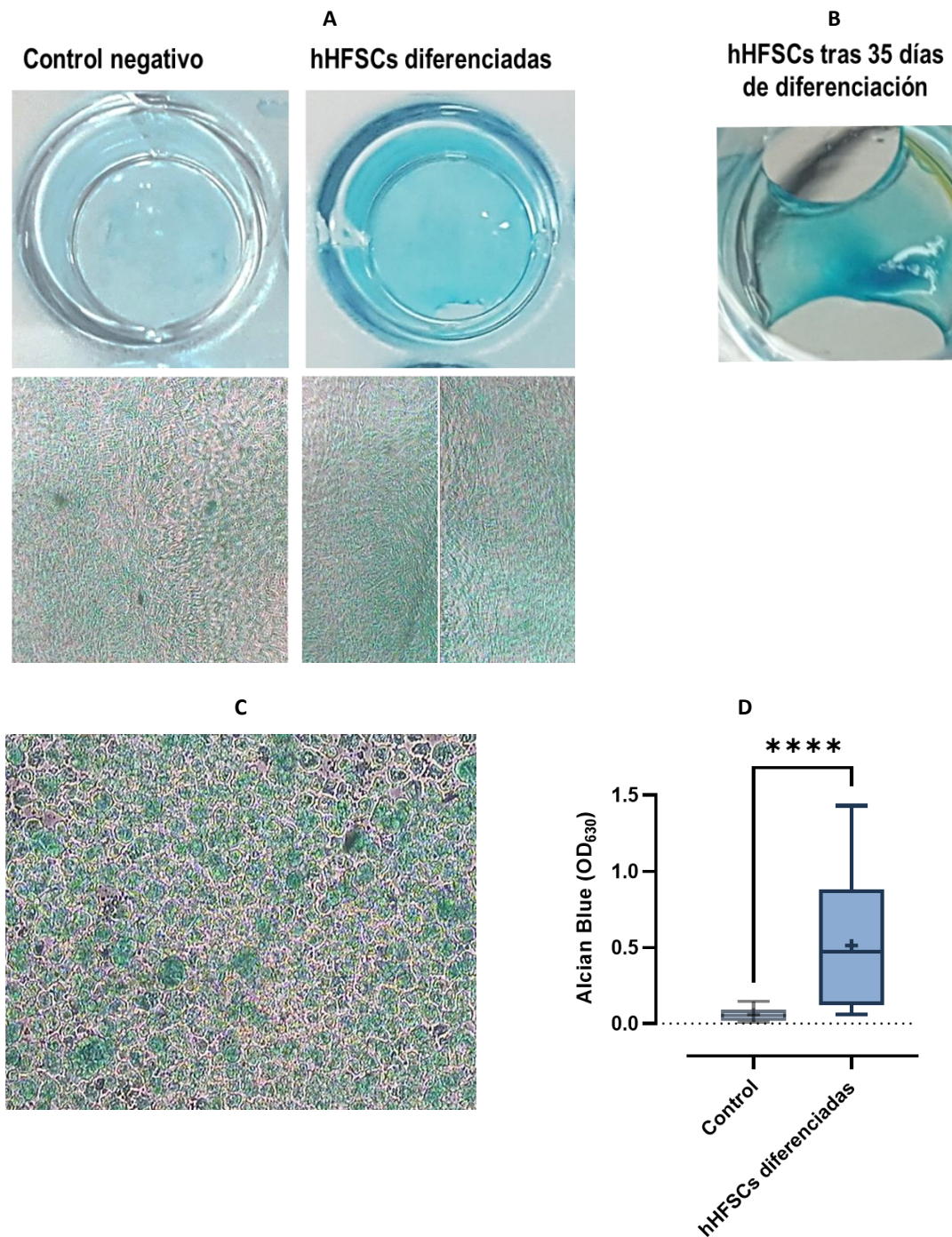


Figura 48. Potencial condrogénico de las hHFSCs tras 21 días de diferenciación. A-C: Imágenes obtenidas tras tinción con Alcian Blue: Coloración presentada por los pocillos tras la tinción (A superior izquierda: control negativo de diferenciación; A superior derecha: hHFSCs diferenciadas); imágenes obtenidas a microscopía (A inferior izquierda: control negativo de diferenciación a 4X aumentos; A inferior derecha: hHFSCs diferenciadas a 4X aumentos); B: Formación cartilaginosa obtenida tras el mantenimiento de la diferenciación condrogénica durante dos semanas más; C: hHFSCs diferenciadas a 10X aumentos (imagen cedida por el Grupo Consolidado BIOMICs UPV/EHU). La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de 720 x 576 μm^2 . D: Cuantificación de Alcian Blue. El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (X), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Las diferencias significativas se muestran frente a la población control no diferenciada; **** $p < 0.0001$; test Mann-Whitney.

Tabla 25. Potencial de diferenciación de las hHFSCs a los tres linajes mesodérmicos.

		Control negativo de diferenciación	hHFSCs diferenciadas	p- valor
Diferenciación adipogénica	Promedio ± SD	0,06 ± 0,02	0,16 ± 0,03	< 0,0001
	Mediana (Q1; Q3)	0,06 (0,04; 0,07)	0,17 (0,14; 0,19)	
	I.C. (95%)	(0,05; 0,07)	(0,14; 0,18)	
Diferenciación osteogénica	Promedio ± SD	0,02 ± 0,01	0,09 ± 0,03	< 0,0001
	Mediana (Q1; Q3)	0,02 (0,01; 0,02)	0,09 (0,07; 0,11)	
	I.C. (95%)	(0,01; 0,02)	(0,07; 0,11)	
Diferenciación condrogénica	Promedio ± SD	0,06 ± 0,04	0,51 ± 0,39	< 0,0001
	Mediana (Q1; Q3)	0,05 (0,02; 0,09)	0,47 (0,12; 0,88)	
	I.C. (95%)	(0,02; 0,09)	(0,36; 0,54)	

Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% (I.C.); test Mann-Whitney.

2.5 ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE hHF-MSCs Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL.

2.5.1 Marcadores de selección.

2.5.1.1 Identidad de las hHF-MSCs.

La comparación de la expresión de marcadores analizados en hHF-MSCs en estudios previos con otras poblaciones que pueden aislarse y proliferar en cultivo junto a las hHF-MSCs, y que también coexpresan los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, se muestra en la Tabla 3.

Para identificar la población hHF-MSC se seleccionaron los genes *CD56/NCAM1*, *ALP* y *SOX2* para analizar su expresión génica, mientras que los marcadores *CD44*, *CD140/PDGRF* y *CD166/ALCAM* no fueron seleccionados para su análisis porque también son expresados por el resto de las poblaciones distintas a MSCs que pueden proliferar en cultivo.

El marcador *CD146/MCAM*, al igual que el gen *ALP*, se expresa en pericitos pero no en fibroblastos. Entre estos dos genes se seleccionó el gen *ALP* debido a que la expresión positiva de este marcador, junto con la demostración de la tinción positiva a Alcian Blue (apartado 2.4 de Resultados) y la observación de agregaciones multicapa cuando se alcanzó la confluencia en el cultivo (apartado 2.2), confirmaría la presencia de hHF-MSCs. Si con propósitos terapéuticos, se deseara eliminar la población de fibroblastos un *sorting* con *ALP+* descartaría esta población de la población hHF-MSC aislada. Asimismo, se seleccionó el marcador *CD56/NCAM1*, ya que al ser expresado por hHF-MSCs, y no por pericitos, un *sorting* con *CD56+* eliminaría esta otra población celular, a efectos de disminuir el riesgo de generación de procesos fibróticos.

El gen *SOX2* se seleccionó para su análisis porque una expresión positiva también confirmaría la presencia de las células hHF-MSCs de la papila dérmica y células madre dérmicas de la región peribulbar. Sin

embargo, el marcador *CD133/PROM1* no se seleccionó para este trabajo al presentar cambios dinámicos en la expresión a medida que avanza el ciclo de crecimiento del pelo.

Los resultados de la expresión génica de *CD56*, *ALP* y *SOX2* se muestran en la Tabla 26 y Figura 49. *SOX2* es el gen cuyo valor Ct es menor (22,04), sin embargo, no pudo calcularse el valor p, por lo que no se muestra su nivel de expresión relativa. No obstante, el valor Ct indica que la expresión fue alta, y este dato se incluye por la información que aporta, aunque no se pueda valorar su expresión diferencial respecto al control.

Tabla 26. Resultados de expresión de marcadores en la población HFSC aislada obtenidos mediante qPCR.

Gen	Marcador de población	Ct	Nivel de expresión relativa normalizada	p-valor
<i>CD56</i>	hHF-MSCs Fibroblastos	++	3,07	0.004
<i>ALP</i>	hHF-MSCs Células Muse Pericitos	+	1,18	0,772
<i>SOX2</i>	hHF-MSCs Células Muse Pericitos Células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural	++	N/D	N/D

Datos cedidos por el Grupo BIOMICs (UPV/EHU). (N=3; Pase 7); ++ (expresión alta; Ct < 29); + (expresión moderada; 29 < Ct < 34).

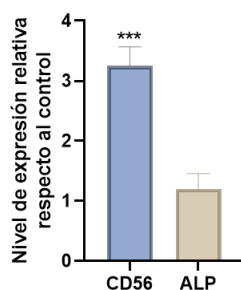


Figura 49. Expresión relativa de los genes *CD56* y *ALP* en la población hHF-MSC. Datos cedidos por el Grupo BIOMICs (UPV/EHU).

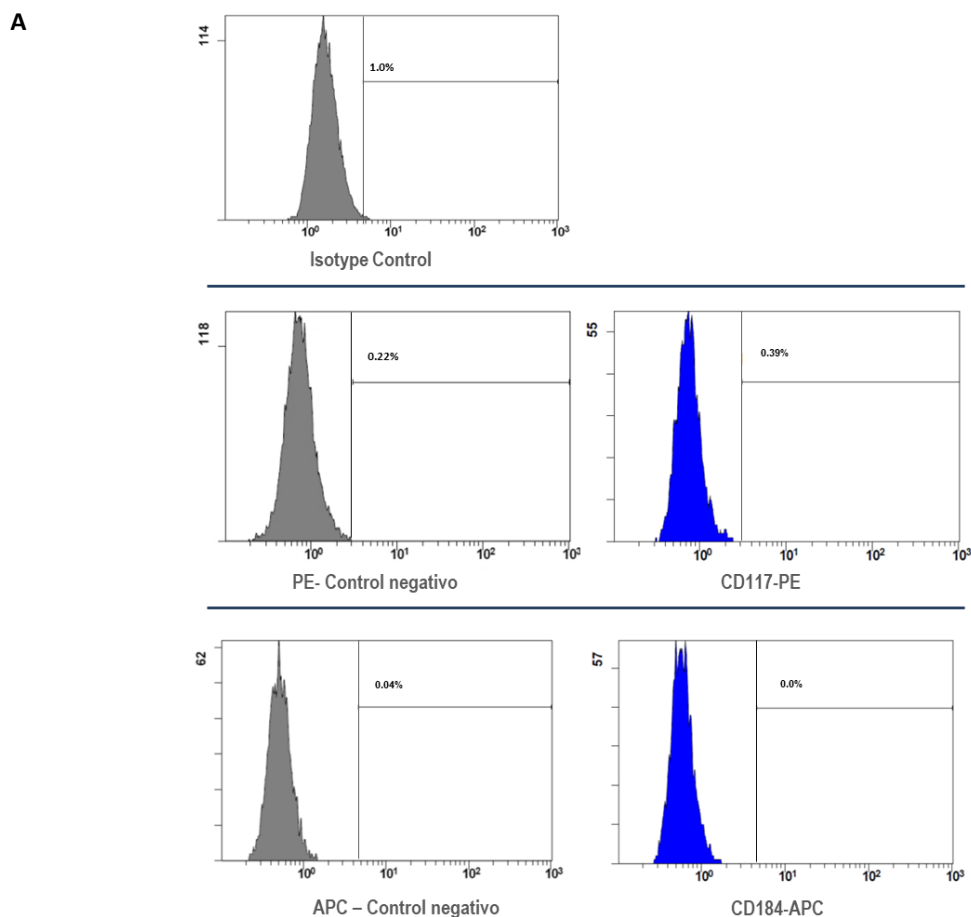
2.5.1.2 Marcadores selectivos de otras poblaciones que pueden proliferar en cultivo.

Asimismo, con el objetivo de esclarecer si alguna población celular con mayor pluripotencialidad, como son las células Muse, había proliferado en cultivo junto con las hHF-MSCs se llevó a cabo un ensayo de diferenciación a endodermo mediante la inducción con activina A y Wnt-3A. Posteriormente, para comprobar si tuvo lugar la diferenciación, se analizó la expresión de los marcadores de superficie CD117 (cKIT) y CD184 (CXCR4) mediante citometría de flujo (Figura 50), y se realizó el análisis de expresión de los genes *SOX17* y *FOXA2* mediante PCR a tiempo real. Asimismo, se analizó la coexpresión de CD117 y CD184 en la población hHF-MSC para detectar la presencia de progenitores del linaje endodérmico, tras la

diferenciación de las hHF-MSCs, junto con el análisis de expresión de los genes *SOX17* y *FOXA2* mediante PCR a tiempo real.

Los resultados de citometría mostraron una coexpresión inapreciable de los marcadores CD117 y CD184 (Figura 50-B). Asimismo, los resultados de expresión génica no mostraron niveles relativos de expresión (Tabla 27).

Asimismo, la ausencia de expresión de los marcadores CD117 y CD184 en la población no diferenciada, que son característicos de las poblaciones celulares CD34+ del folículo piloso y tejidos circundantes, diferentes a MSCs, y que pueden proliferar junto con las MSCs del folículo piloso, evidenció que, el marcador CD117, que podría ser expresado por progenitores de tránsito melanocíticos, mostró una expresión inapreciable (Figura 50-A).



B

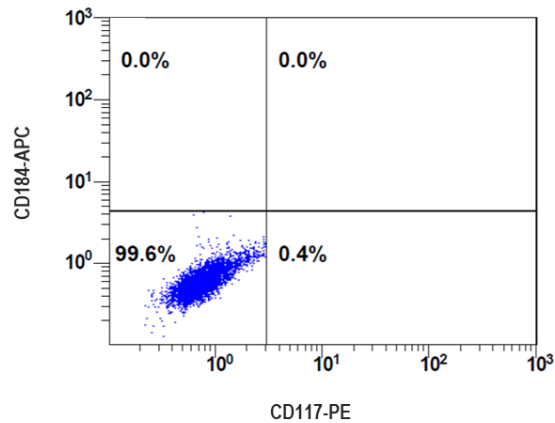


Figura 50. Expresión de marcadores CD117 (cKIT) y CD184 (CXCR4). En hHF-MSCs; pase 6 por duplicado; experimentos independientes utilizando diferentes cultivos. (A) Análisis por citometría de flujo. (B) Gráficos de distribución de las poblaciones celulares hHF-MSCs según la coexpresión de los dos marcadores (recuadro superior derecho). 1×10^6 células fueron incubadas con anticuerpos primarios conjugados anti-Human CD117 (c-Kit)-PE anti-Human CD184 (CXCR4)-APC. Los controles de isotipo fueron incubados con Mouse IgG2aK Isotype Control-APC, mientras que los controles negativos no fueron incubados con ningún anticuerpo. Los porcentajes indican la fracción de células positivas para cada marcador específico.

Tabla 27. Resultados de expresión de genes mediante qPCR en la población hHF-MSC tras su diferenciación a linaje endodérmico.

Gen	Marcador de población	Ct	Nivel de expresión relativa normalizada	p-valor
FOXA2	Endodermo (junto con citometría CD117+/CD184+)	Negativo o baja expresión	No se observa expresión diferencial	
SOX17		Negativo o baja expresión	0,15	-

2.5.2 Caracterización funcional *in silico* de las hHF-MSCs.

2.5.2.1 Genes con expresión diferencial (DEG).

La ISCT MSC recomienda demostrar la funcionalidad de las MSCs mediante la demostración de la secreción de factores tróficos, la modulación de las células inmunitarias y la promoción de la angiogénesis. Por tanto, se procedió a analizar los resultados de expresión génica de hHF-MSCs de 3 donantes (pase 7) con edades entre los 30 y 55 años, aisladas y expandidas con suero heterólogo, que contenía al menos los factores de crecimiento IGF, EFG y PDGF, al igual que el lisado de plaquetas humano. Los resultados de expresión fueron cedidos por el Grupo BIOMICs (UPV/EHU). Para resolver la existencia de diferencias significativas en la expresión génica emplearon como control hHF-MSCs expandidas con medio de cultivo basal sin suero.

A partir de los resultados de expresión de los 37 genes aportados se realizó una selección de 25 genes con expresión diferencial (DEG) en las hHF-MSCs expandidas con HS en comparación con el control, en base al nivel relativo de expresión (Fold Change (FC) >2) y a un valor significativo de $p < 0,01$. En la Tabla 28 se muestran los DEG y su nivel de expresión relativa normalizada en unidades log (FC), para realizar posteriormente un tratamiento bioinformático de los datos.

Como puede observarse en la Tabla 28, 20 genes mostraron sobreexpresión y 5 genes resultaron subexpresados. Además de los DEG, se muestran los genes cuya expresión no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. En la Figura 51 se representan los niveles relativos de expresión normalizados respecto al control para cada uno de los genes de la Tabla 28.

Tabla 28. Expresión génica de la población hHF-MSC.

Gen	Descripción	Log (FC)	p-valor
ADAR	<i>Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase</i>	0,49	0,0167
ALDH2	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	-0,29	0,0008
AXIN1	<i>Axin-1</i>	0,65	0,0372
BMP1	<i>Bone morphogenetic protein 1</i>	0,42	0,0380
BMP2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>	1,61	0,0095
CCNA2	<i>Cyclin-A2</i>	-0,48	0,0003
CCND2	<i>G1/S-specific cyclin-D2</i>	0,80	0,0057
CCNE1	<i>G1/S-specific cyclin-E1</i>	0,38	0,0137
CD44	<i>CD44 antigen</i>	0,76	0,0018
CDK1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>	-1,29	0,0009
COL1A1	<i>Collagen alpha-1(I) chain</i>	-0,86	0,0003
DHH	<i>Desert hedgehog protein</i>	0,39	0,0104
DLL1	<i>Delta-like protein 1</i>	0,53	0,0035
DTX1	<i>E3 ubiquitin-protein ligase DTX1</i>	0,90	0,0288
DTX2	<i>Probable E3 ubiquitin-protein ligase DTX2</i>	0,58	0,0031
DVL1	<i>Dishevelled segment polarity protein 1</i>	0,62	0,0018
EP300	<i>Histone acetyltransferase p300</i>	0,53	0,0085
FGF1	<i>Fibroblast growth factor 1</i>	-0,53	0,0012
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>	0,32	0,0045
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>	0,34	0,0137
GJB2	<i>Gap junction beta-2 protein</i>	1,35	0,0150
HDAC2	<i>Histone deacetylase 2</i>	0,32	0,0088
HSPA9	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	0,66	0,0080
JAG1	<i>Protein jagged-1</i>	0,38	0,0003
KAT2A	<i>Histone acetyltransferase KAT2A</i>	0,42	0,0003
KAT7	<i>Histone acetyltransferase KAT7</i>	0,42	0,0018
KAT8	<i>Histone acetyltransferase KAT8</i>	0,44	0,0000
KRT15	<i>Keratin, type I cytoskeletal 15</i>	0,56	0,0002
MME	<i>Neprilysin</i>	0,35	0,0157
MSX1	<i>Homeobox protein MSX-1</i>	0,46	0,0011
MYC	<i>Myc proto-oncogene protein</i>	0,53	0,0024
NCAM1	<i>Neural cell adhesion molecule 1</i>	1,22	0,0000
NOTCH1	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 1</i>	0,86	0,0031
NUMB	<i>Protein numb homolog</i>	0,35	0,0392
PPARD	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor delta</i>	0,72	0,0049

Gen	Descripción	Log (FC)	p-valor
ADAR	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	0,49	0,0167
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	0,21	0,0095
T	T, brachyury homolog	0,61	0,0179

Los genes con expresión diferencial (DEG) se han seleccionado en base al nivel relativo de expresión (Fold Change (FC) >2) y valor p ($p < 0,01$). Los resultados FC se muestran como Log (FC). DEG sobreexpresados (rojo), DEG subexpresados (verde, genes sin expresión diferencial significativa (sin color). Datos cedidos por el Grupo BIOMICs (UPV/EHU); n=3; pase 7; edad de 30 a 55 años.

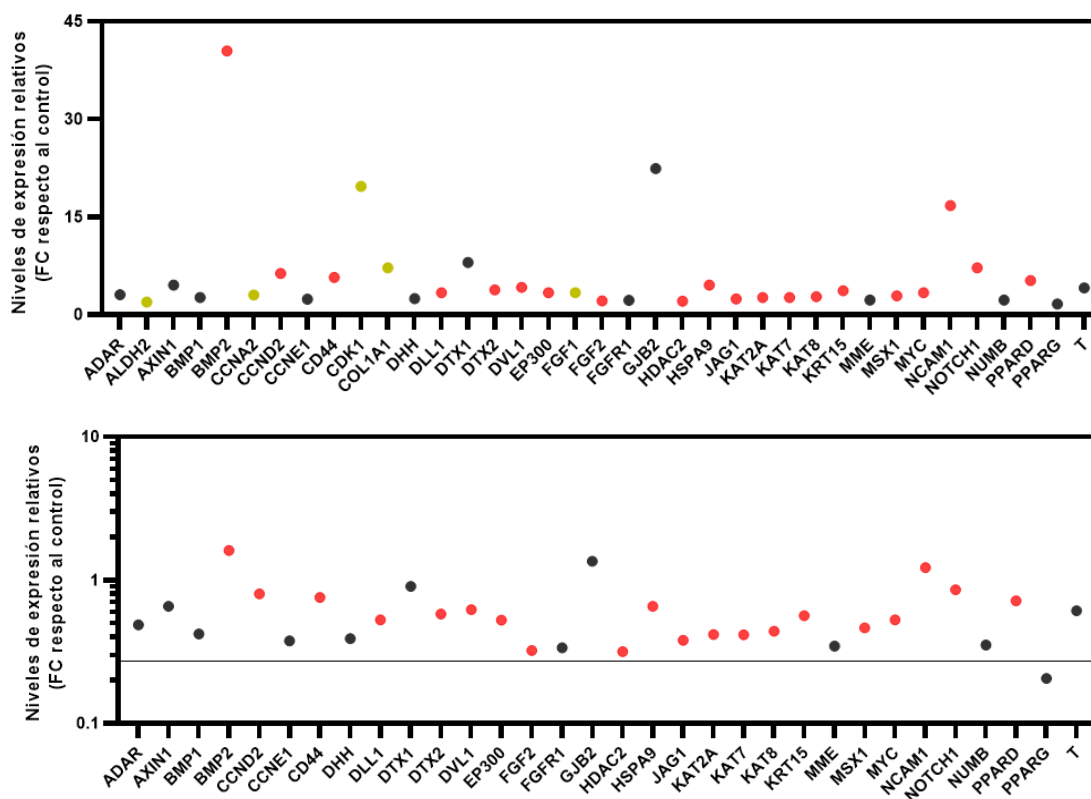


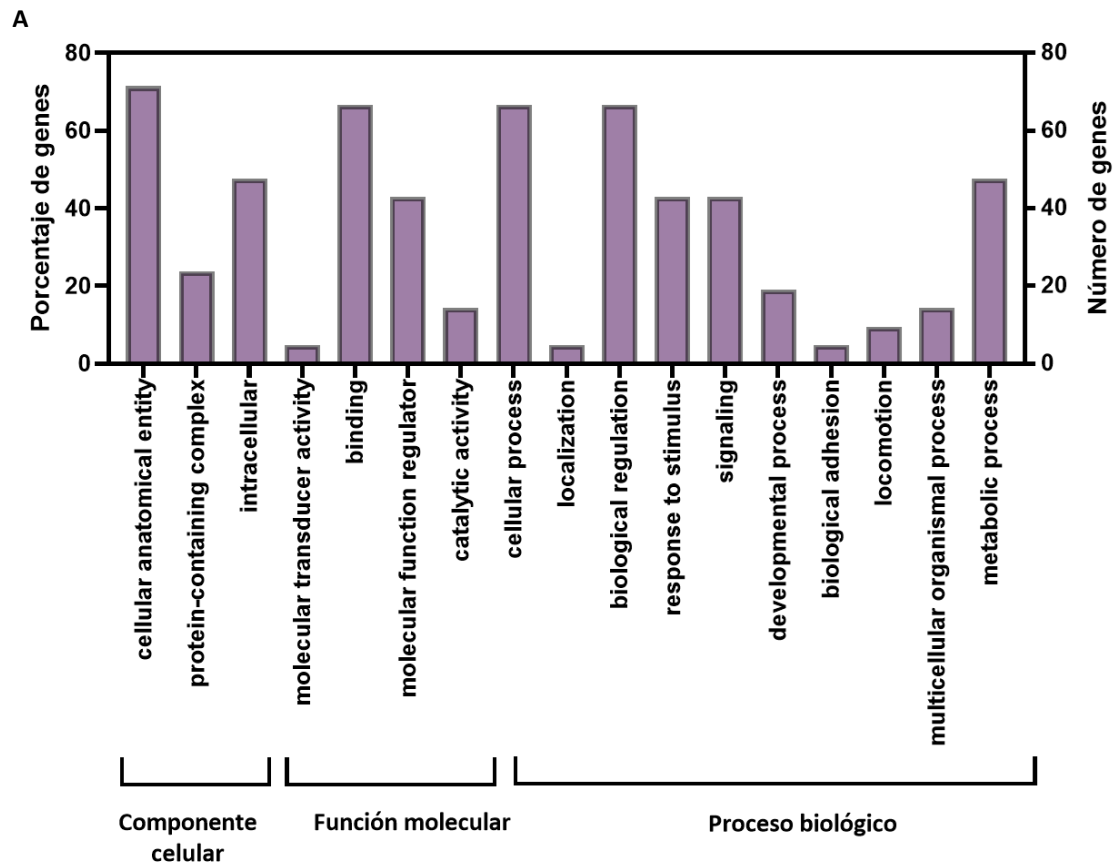
Figura 51. Cuantificación relativa de los genes de la Tabla 28. Los niveles de expresión se compararon con sus controles respectivos. A) El gráfico de dispersión muestra todos los genes analizados; B) En este gráfico se detalla a escala logarítmica la expresión de los genes sobreexpresados (rojo) y los que no muestran expresión diferencial ($p > 0,01$) en gris. El color verde indica una subexpresión del gen (A).

Para determinar la categoría y grupos funcionales de las proteínas expresadas y caracterizar funcionalmente a las hHF-MSCs se procedió a realizar un tratamiento bioinformático de los resultados de la Tabla 28 mediante el programa PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships), que realiza una combinación de genomas, clasificaciones de función de genes y rutas de señalización.

2.5.2.2 Clasificación Gene Ontology (GO) de los genes sobreexpresados en la población hHF-MSC.

Los resultados de la clasificación PANTHER se representaron mediante gráficos de barras (Figura 52). PANTHER clasifica e identifica las categorías y grupos funcionales mediante el término GO (Gene Ontology) que describe el conjunto de genes. El término GO agrupa los genes en familias (relacionadas

evolutivamente) y subfamilias (evolutiva y funcionalmente relacionadas). En la Figura 52-A se representan los resultados obtenidos tras la clasificación. Mediante este programa se identificaron 17 grupos funcionales de DEG sobrexpresados que se agruparon en tres categorías: componente celular, función molecular y proceso biológico. En la Figura 52-B se muestra una representación de las agrupaciones GO ordenadas de mayor a menor según las diferencias significativas entre el número de genes.



B

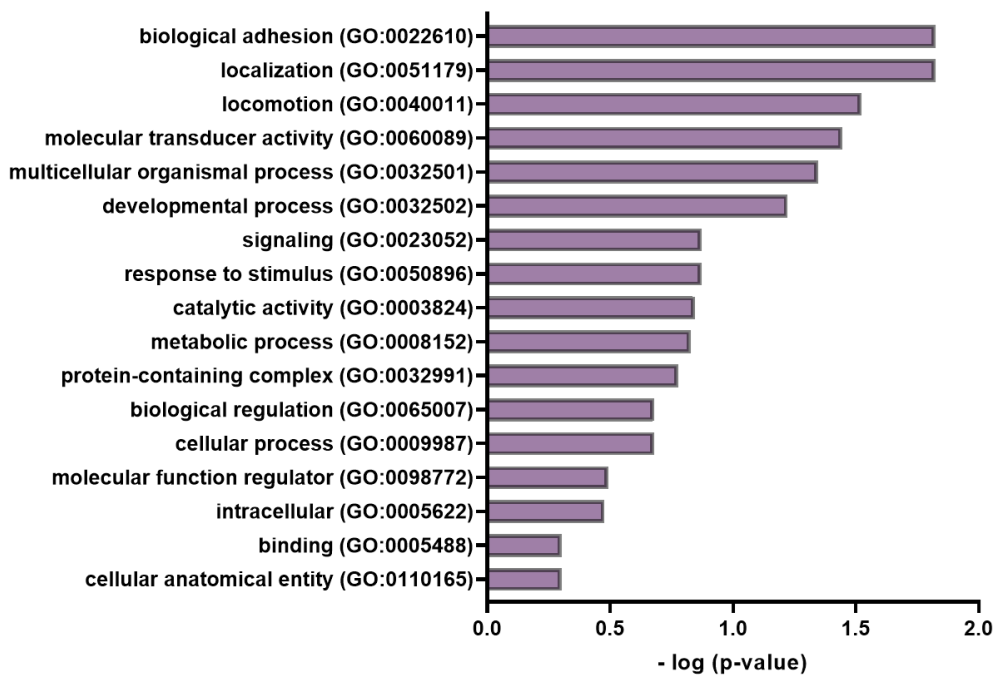


Figura 52. Categoría y grupos funcionales de los genes sobreexpresados por las hHF-MSCs con expresión diferencial (genes en rojo de la Tabla 28) obtenidos mediante el programa PANTHER. A) Identificación y clasificación en categorías de los grupos funcionales obtenidos. Los grupos funcionales se representan como porcentaje y número de genes. B) Gráfico de barras que muestra los términos GO de identificación de familias/ subfamilias de genes (GO: Gene Ontology) con diferencias significativas en el número de genes (log p-value).

2.5.2.3 Funcionalidad de las proteínas hHF-MSCs y rutas en las que intervienen.

La categorización funcional realizada mediante el programa Panther mostró 7 grupos funcionales de proteínas (Figura 53). Asimismo, el análisis de rutas o *pathway* identificó las proteínas que desempeñan un papel fundamental en los procesos biológicos. En total se obtuvieron 19 rutas (Tabla 29; Figura 54). El número de proteínas de las hHF-MSCs que intervienen en cada ruta se muestra en la Tabla 29; mientras que la descripción de las proteínas que intervienen en cada ruta se detalla en la Tabla 30.

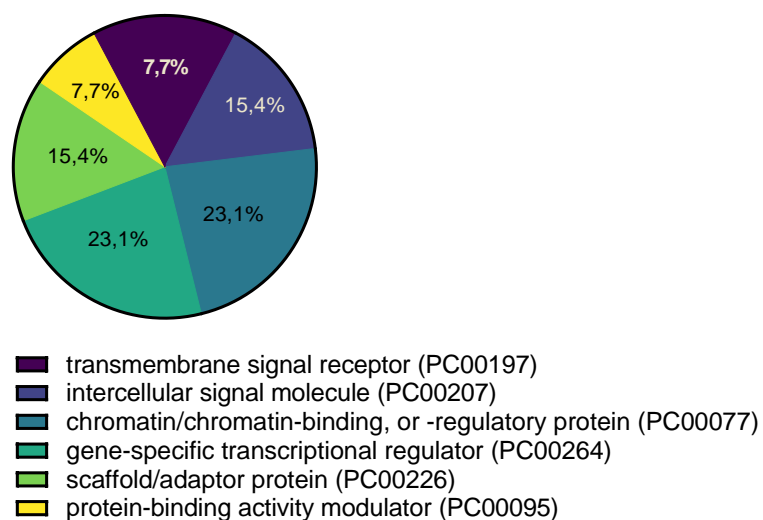
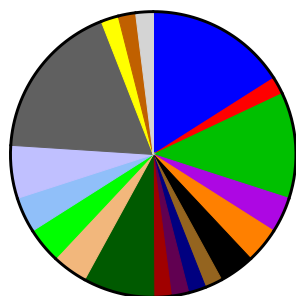


Figura 53. Categorización funcional de las proteínas detectadas tras los resultados de expresión génica en la población hHF-MSC mediante el programa PANTHER. El gráfico circular muestra el porcentaje del número de proteínas que pertenecen a cada categoría funcional.

El conocimiento de los genes expresados diferencialmente en las hHF-MSCs, y las rutas en las que intervienen las proteínas codificadas por estos genes, por ejemplo, para la enfermedad de Alzheimer, aporta información sobre qué proteínas se podrían inhibir para interrumpir las rutas clave en una enfermedad, con propósitos de aplicación futura de las hHF-MSCs en terapia celular.

Tabla 29. Pathways en las que intervienen las proteínas producidas significativamente por las hHF-MSCs.

Pathways	Nº proteínas	Porcentaje
Angiogenesis (P00005)	6	28.6%
Interleukin signaling pathway (P00036)	1	4.8%
Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)	5	23.8%
p53 pathway feedback loops 2 (P04398)	1	4.8%
Parkinson disease (P00049)	1	4.8%
Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)	2	9.5%
PI3 kinase pathway (P00048)	1	4.8%
PDGF signaling pathway (P00047)	1	4.8%
Oxidative stress response (P00046)	1	4.8%
Notch signaling pathway (P00045)	3	14.3%
Cell cycle (P00013)	1	4.8%
CCKR signaling map (P06959)	1	4.8%
Huntington disease (P00029)	1	4.8%
p53 pathway (P00059)	2	9.5%
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway (P00026)	1	4.8%
Wnt signaling pathway (P00057)	6	28.6%
Transcription regulation by bZIP transcription factor (P00055)	1	4.8%
FGF signaling pathway (P00021)	1	4.8%
TGF-beta signaling pathway (P00052)	2	9.5%



- Angiogenesis (P00005)
- Interleukin signaling pathway (P00036)
- Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)
- p53 pathway feedback loops 2 (P04398)
- Parkinson disease (P00049)
- Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)
- PI3 kinase pathway (P00048)
- PDGF signaling pathway (P00047)
- Oxidative stress response (P00046)
- Notch signaling pathway (P00045)
- Cell cycle (P00013)
- CCKR signaling map (P06959)
- Huntington disease (P00029)
- p53 pathway (P00059)
- Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pa
- Wnt signaling pathway (P00057)
- Transcription regulation by bZIP transcription factor (P00055)
- FGF signaling pathway (P00021)
- TGF-beta signaling pathway (P00052)

Figura 54. Rutas en las que intervienen las proteínas producidas por las hHF-MSCs.

Tabla 30. Rutas con mayor número de proteínas implicadas y enumeración de dichas proteínas. A (angiogénesis); W (vía de señalización Wnt); Z (Alzheimer); N (vía de señalización NOTCH); P (Parkinson).

Pathway	Proteína	Subfamilia	Clase
A	DLL1	DELTA-LIKE PROTEIN 1 (PTHR24044:SF380)	-
A	JAG1	PROTEIN JAGGED-1 (PTHR24044:SF448)	-
A	NOTCH1	NEUROGENIC LOCUS NOTCH HOMOLOG PROTEIN 1 (PTHR45836:SF12)	-
A	DVL1	SEGMENT POLARITY PROTEIN DISHEVELLED HOMOLOG DVL-1-RELATED (PTHR10878:SF5)	scaffold/adaptor protein (PC00226)
A	FGF2	FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2 (PTHR11486:SF83)	growth factor (PC00112)
W	DVL1	SEGMENT POLARITY PROTEIN DISHEVELLED HOMOLOG DVL-1-RELATED (PTHR10878:SF5)	scaffold/adaptor protein(PC00226)
W	PPARD	PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR DELTA (PTHR24082:SF15)	C4 zinc finger nuclear receptor(PC00169)
W	DVL1	SEGMENT POLARITY PROTEIN DISHEVELLED HOMOLOG DVL-1-RELATED (PTHR10878:SF5)	scaffold/adaptor protein(PC00226)
W	MYC	MYC PROTO-ONCOGENE PROTEIN (PTHR45851:SF1)	basic helix-loop-helix transcription factor(PC00055)
W	HDAC2	HISTONE DEACETYLASE 2 (PTHR48252:SF17)	-
W	EP300	HISTONE ACETYLTRANSFERASE P300 (PTHR13808:SF29)	histone modifying enzyme(PC00261)
Z	CD44	CD44 ANTIGEN (PTHR10225:SF6)	transmembrane signal receptor(PC00197)
Z	KAT7	HISTONE ACETYLTRANSFERASE KAT7 (PTHR10615:SF102)	histone modifying enzyme(PC00261)
Z	NOTCH1	NEUROGENIC LOCUS NOTCH HOMOLOG PROTEIN 1 (PTHR45836:SF12)	-

Pathway	Proteína	Subfamilia	Clase
Z	DVL1	SEGMENT POLARITY PROTEIN DISHEVELLED HOMOLOG DVL-1-RELATED (PTHR10878:SF5)	scaffold/adaptor protein(PC00226)
Z	DVL1	SEGMENT POLARITY PROTEIN DISHEVELLED HOMOLOG DVL-1-RELATED (PTHR10878:SF5)	scaffold/adaptor protein(PC00226)
N	DLL1	DELTA-LIKE PROTEIN 1 (PTHR24044:SF380)	-
N	JAG1	PROTEIN JAGGED-1 (PTHR24044:SF448)	-
N	NOTCH1	NEUROGENIC LOCUS NOTCH HOMOLOG PROTEIN 1 (PTHR45836:SF12)	-
P	HPSA9	STRESS-70 PROTEIN, MITOCHONDRIAL (PTHR19375:SF184)	-

3 IDENTIDAD DE LAS hHF-MSCs SEGÚN SU CAPACIDAD PROLIFERATIVA.

3.1 SELECCIÓN DE ENSAYOS PARA EL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS hHF-MSCs.

La proliferación celular es una de las propiedades biológicas que es necesario definir para tratar de caracterizar las hHF-MSCs, teniendo en cuenta que, tal y como se ha descrito previamente en esta tesis, la identidad de las MSCs aún está bajo debate. Asimismo, la aplicación futura de las hHF-MSCs *in vivo* requiere conocer el rendimiento celular de la población y su cinética de crecimiento. Por tanto, se procedió a analizar las cinéticas de crecimiento de hHF-MSCs aisladas de un total de 12 donantes. Tras la fase de cultivo primario, se expandieron con el objetivo de analizar la tasa de duplicación celular a lo largo del tiempo y compararla con los datos obtenidos para otras MSCs derivadas de folículo piloso y de otras fuentes de procedencia. Para ello se utilizó un lisado de plaquetas humano comercial (HPL) hasta alcanzar un 90% de confluencia por cada subcultivo.

La cinética de crecimiento fue analizada mediante: la determinación del número de células adherentes viables obtenidas tras el cultivo primario, el cálculo del rendimiento teórico de las células para alcanzar un número mínimo de hHF-MSCs clínicamente relevante, junto con el tiempo de expansión y pases necesarios para alcanzarlo, y, por último, la determinación de los valores PD (duplicaciones de la población) y PDT (tiempo de duplicación de la población).

La capacidad proliferativa de las hHF-MSCs fue asimismo estudiada mediante: el análisis de las fases del ciclo celular S+G2/M, el índice de proliferación, los estados no proliferativos quiescentes (G0/G1) y los no reversibles, así como el estudio de la apoptosis y la necrosis celular.

Teniendo en cuenta que el uso de estas células con propósitos terapéuticos requiere evitar estados de senescencia celular, es preciso optimizar las condiciones de cultivo y las metodologías encaminadas a este fin, por lo que, además, se analizó: el efecto de las condiciones de cultivo, la densidad celular de siembra, el nivel de confluencia, la inhibición por contacto y los estados de privación de nutrientes y factores de

crecimiento; así como el posible efecto de la edad de los donantes sobre el aislamiento y expansión de las hHF-MSCs.

3.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS hHF-MSCs.

Para analizar la cinética de crecimiento de los pases realizados tras el cultivo primario se procedió al análisis de los recuentos de viables obtenidos de los cultivos proliferativos tras la expansión de hHFSCs de los 12 donantes, tal y como se representa en la Figura 28, hasta alcanzar el pase 5, empleando suero HPL como suplemento del medio de cultivo completo, al igual que se realizó durante el cultivo primario. La obtención del número de células viables por donante y réplica para cada pase se muestra en la Tabla 31-A.

Durante los pases se observó que, cada vez que las hHF-MSCs se subcultivaban, dentro de los límites de su vida útil finita, volvían a crecer hasta alcanzar la densidad celular que existía antes del subcultivo (Tabla 31-A y C).

El análisis de las cinéticas de crecimiento se realizó mediante el cálculo de los valores de las duplicaciones de la población obtenidas en cada pase (PD) y el tiempo de duplicación de la población (PDT); así como las duplicaciones de la población hHF-MSC acumuladas (cPD) a lo largo de los pases (Tabla 31-B). Los resultados de los p-valores ajustados por el método de Bonferroni de la comparación entre pares se muestran en la Tabla 27-D.

Tabla 31. A) Recuento de células viables por donante y réplica. B) Estadísticos descriptivos. C) Resultados de los p-valores de la comparación entre pares para los recuentos celulares. D) Resultados de los p-valores.

31 – A		P1	P2	P3	P4	P5
hHF-MSCs viables	Promedio ± SD	1,07 ± 0,34	0,96 ± 0,56	1,07 ± 0,40	1,31 ± 0,63	1,17 ± 0,45
	Mediana (Q1; Q3)	1,08 (0,82; 1,29)	0,88 (0,64; 1,52)	0,91 (0,86; 1,37)	1,09 (0,84; 2,14)	1,11 (0,86; 1,49)
	I.C. del 95%	0,82 - 1,29	0,64 - 1,52	0,78 - 1,69	0,71 - 2,14	0,88 - 1,41

31 – B		P1	P2	P3	P4	P5
PD	Promedio ± SD	4,63 ± 0,74	3,13 ± 0,84	2,84 ± 0,79	2,88 ± 1,02	3,38 ± 0,73
	Mediana (Q1; Q3)	4,73 (3,96; 5,10)	3,18 (2,44; 3,68)	2,52 (2,23; 3,13)	2,29 (2,18; 3,47)	3,50 (2,74; 3,77)
	I.C. (95%)	(4,22 - 5,04)	(2,73 - 3,54)	(2,31 - 3,37)	(2,29 - 3,47)	(3,11 - 3,66)
cPD	Mediana	4,73	7,90	10,43	12,72	16,22
	I.C. (95%)	(3,90; 5,20)	(6,10; 9,00)	(8,30; 13,20)	(10,50; 17,20)	(13,40; 20,90)
PDT (h)	Promedio ± SD	26,29 ± 8,52	37,19 ± 12,07	39,66 ± 7,96	41,10 ± 6,60	40,16 ± 8,17
	Mediana (Q1; Q3)	23,80 (20,11; 29,39)	40,09 (25,10; 45,73)	36,61 (33,25; 45,61)	42,44 (34,46; 44,63)	38,63 (34,21; 42,58)
	I.C. (95%)	19,63 - 29,99	24,97 - 46,12	32,36 - 50,46	34,00 - 46,70	35,08 - 41,28

31 – C. p-Valores (hHF- MSCs viables)	P1	P2	P3	P4
P2	> 0,999			
P3	> 0,999	> 0,999		
P4	> 0,999	> 0,999	> 0,999	
P5	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999

31 – D. p-Valores (PD\PDT)	P1	P2	P3	P4	P5
P1	-	0,0219	0,0373	0,0018	0,0011
P2	0,0005	-	>0,9999	>0,9999	>0,9999
P3	0,0002	>0,9999	-	>0,9999	>0,9999
P4	< 0,0001	>0,9999	>0,9999	-	>0,9999
P5	0,0051	>0,9999	>0,9999	0,6075	-

Valores PD (duplicaciones de la población), cPD (valor acumulado de duplicaciones de la población) y PDT (tiempo de duplicación de la población) calculados para la población de hHF-MSC. Los resultados se presentan como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza (I.C. del 95%), y como promedio \pm desviación estándar (SD) para facilitar su comparación con resultados de estudios previos para MSCs de la misma fuente y procedentes de otros tejidos. Se muestran los p-valores de la comparación entre pares para PD (valores por debajo de la diagonal) y PDT (valores por encima de la diagonal). Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni.

La duplicación media de la población hHF-MSC entre los pases 2 a 5 estuvo comprendida entre 2,29 y 3,50 (Tabla 31-B). Como era de esperar, el valor PD en pase 1 se mostró significativamente superior al resto de pases (Tabla 27-D; Figura 55-A), como consecuencia de la menor densidad celular de siembra (~ 2.000 células/cm²), debida al menor número de células obtenidas tras el cultivo primario. La densidad de siembra en los sucesivos pases fue de ~ 8.000 células/cm².

En la Figura 55 se muestra la tendencia de los parámetros cPD (Figura 55-C) y la representación gráfica de los valores PDT (Figura 55-B), a través de los pases 1 a 5. Tras analizar las cinéticas de crecimiento de las poblaciones de hHF-MSCs obtenidas después del cultivo primario y tras los pases a corto y medio plazo, se observó que, a medida que aumentaba el número de pases, aumentaba también el tiempo de duplicación de la población, de forma más significativa a partir del pase 3 (Figura 55-B).

En el pase 3, el valor acumulado de duplicaciones de la población (cPD) obtenido para las hHF-MSCs en nuestro estudio fue de 10,43 (con un intervalo de confianza del 95% de 8,30 a 13,20) (Tabla 31-B). La comparación del tiempo de duplicación de nuestra población con otras poblaciones MSCs se muestra en la Figura 56.

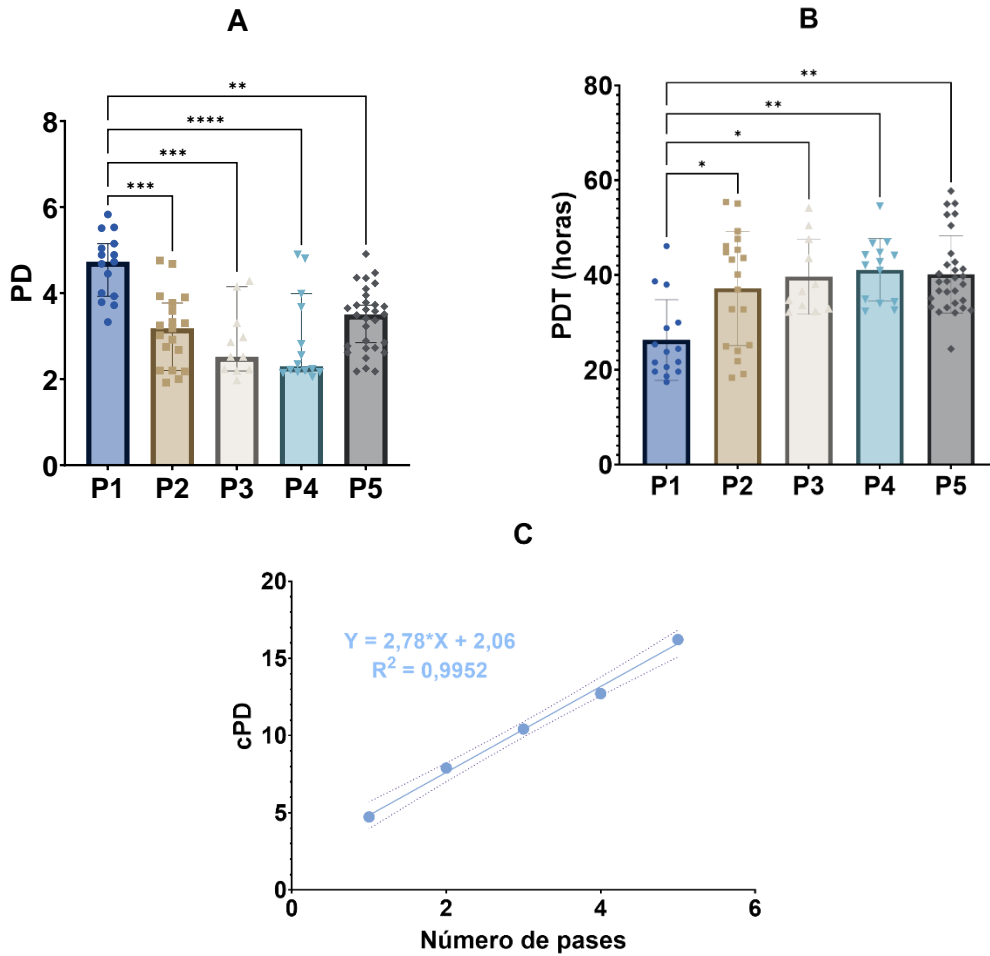


Figura 55. Cinética de crecimiento de hHF-MSCs estimada por valores PD (A), PDT (B) y cPD (C). Los gráficos de diagrama de dispersión con barras representan los datos PD (A) y PDT (B) como mediana e intervalo de confianza (95%) (columnas y barras de error, respectivamente). El modelo de regresión lineal (C) muestra la relación entre los valores acumulados (cPD) y el número de pases; siendo X el número de pases e Y, el valor de duplicaciones de la población alcanzado, con muy alto valor de correlación entre los valores PD obtenidos. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0,0001; Prueba de Kruskal-Wallis; comparaciones *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni. PD (duplicación de la población); cPD (duplicación de la población acumulada); PDT (tiempo de duplicación de la población).

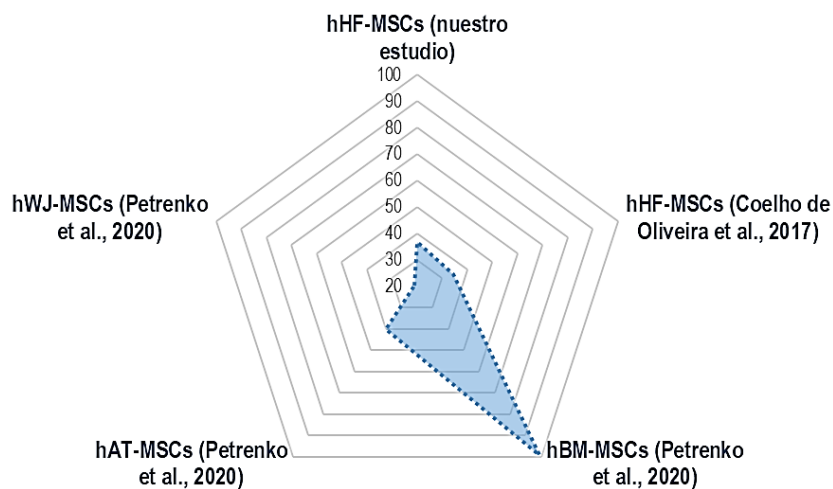


Figura 56. Tiempo de duplicación de la población hHF-MSC en pase 3 frente al tiempo de duplicación de MSCs de igual y distinto origen al del presente estudio. Los datos se muestran como valor medio.

3.3 EFECTO EN LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL GRADO DE CONFLUENCIA ALCANZADO.

Con el objetivo de analizar el efecto del aumento de la densidad celular durante la expansión de hHF-MSCs en el cultivo y, por tanto, determinar el grado de confluencia que mejor favorece la proliferación celular, hemos analizado la viabilidad celular y el tiempo de duplicación de la población en hHF-MSCs con la misma densidad de siembra (5.000-8.000 células/cm²) y diferente grado de confluencia del cultivo (50-60% y superior al 80%) (Figura 57).

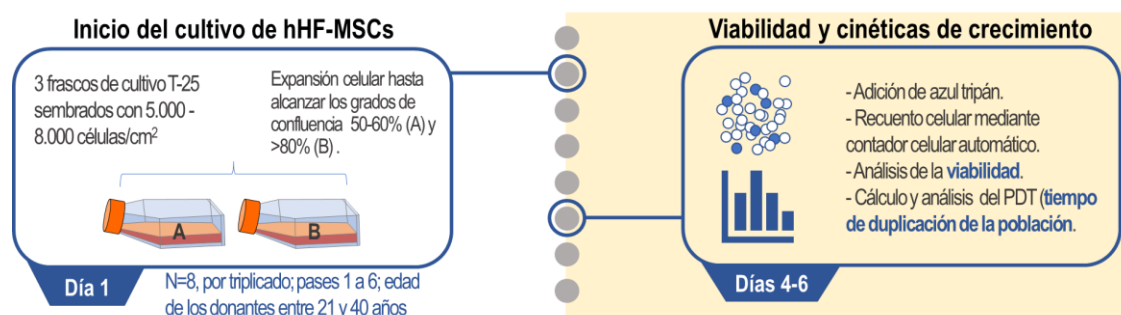


Figura 57. Esquema del diseño experimental realizado para el análisis del efecto del grado de confluencia de las hHF-MSCs sobre la proliferación celular. Población A (células que alcanzan un 50-60% de confluencia); Población B (células que superan el 80% de confluencia). La densidad de siembra para todas las poblaciones celulares es de 5.000 a 8.000 células/cm² (N = 8; por triplicado; pases 1-6; edad de los donantes entre 21 y 40 años). PDT (tiempo de duplicación de la población).

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas ni en la viabilidad celular ni en el tiempo de duplicación de la población hHF-MSCs con diferentes grados de confluencia (Tabla 32; Figura 58).

Tabla 32. Viabilidad y tiempo de duplicación (PDT) mostrado por las hHF-MSCs con una misma densidad de siembra (5.000-8.000 células/cm²) y diferentes grados de confluencia.

		Confluencia 50-60%	Confluencia >80%
Viabilidad (%)	Promedio ± SD	79,52 ± 11,53	77,38 ± 12,46
	Mediana (Q1; Q3)	78,76 (69,12; 90,33)	77,53 (69,31; 86,95)
	I.C. (95%)	69,12 - 90,33	69,76 - 83,23
	p-valor	0,72	
PDT (h)	Promedio ± SD	37,62 ± 9,07	35,93 ± 7,12
	Mediana (Q1; Q3)	34,65 (32,36; 46,70)	36,38 (32,23; 41, 10)
	I.C. (95%)	32,36 - 46,70	32,61 - 40,93
	p-valor	0,98	

(N=8, por triplicado; pases 1 a 6; edad de los donantes entre 21 y 40 años). Los resultados se presentan como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza (C.I. 95%), y como promedio ± desviación estándar (SD) para facilitar su comparación con resultados estudios previos para MSCs de la misma fuente y procedentes de otros tejidos. Los p-valor de la comparación con la población control se han obtenido mediante el test Mann-Whitney.

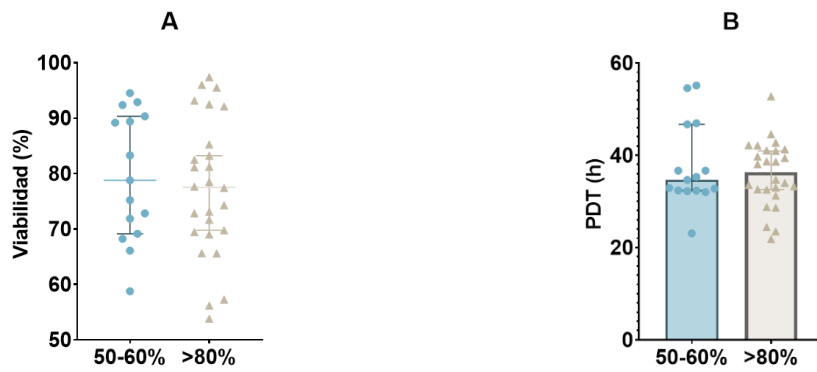


Figura 58. Viabilidad en porcentaje y tiempo de duplicación (PDT) en horas mostrado por las hHF-MSCs con una misma densidad de siembra (5.000-8.000 células/cm²) y diferentes grados de confluencia. (N=8, por triplicado; pases 1 a 6; edad de los donantes entre 21 y 40 años). Los gráficos muestran la dispersión de los datos obtenidos. EL gráfico de diagrama de dispersión con barras (B) representa los datos como mediana e intervalo de confianza del 95% (columnas y barras de error, respectivamente); no se observan diferencias significativas; test Mann-Whitney.

Con el objetivo de analizar si una densidad de siembra alta de 12.500 hHF-MSCs /cm² con un grado de confluencia mayor del 80% puede afectar su capacidad proliferativa, se comparó el tiempo de duplicación de esta población con el que mostraron las hHF-MSCs con una densidad de siembra de entre 5.000 y 8.000 células/cm² y un grado de confluencia superior al 80%. Los resultados mostraron que las densidades de siembra altas (12.500 células/cm²), y con una confluencia superior al 80%, tampoco afectan a la proliferación de hHF-MSCs (Tabla 33; Figura 59). Esto puede ser debido a que no se alcanzó el estado de inhibición por contacto y privación que se produce al prolongar el cultivo durante la fase estacionaria, donde existe una alta agregación multicapa debida a alta confluencia y no se observa duplicación de la población (Figura 59).

Tabla 33. Tiempos de duplicación (PDT) de las hHF-MSCs con diferentes densidades de siembra y grado de confluencia superior al 80%.

	Confluencia 30-40%	Confluencia >80%
PDT (h) Promedio ± SD	35,93 ± 7,12	39,94 ± 7,64
p-valor		0,07

n=3, por triplicado; pases 2 a 6; edad de los donantes entre 21 y 36 años. Los datos son expresados como promedio ± desviación estándar (SD); no se observan diferencias significativas; prueba t de *student*.

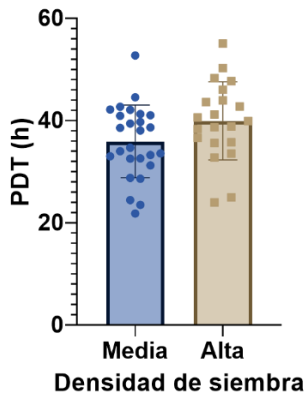


Figura 59. Tiempo de duplicación (PDT) de hHF-MSCs expandidas a partir de diferentes densidades de siembra hasta alcanzar una confluencia superior al 80%. (N=3, por triplicado; pases 2 a 6; edad de los donantes entre 25 y 36 años). Los datos se representan como promedio \pm SD; densidad media (5.000-8.000 células/cm²); densidad alta (12.500 células/cm²); no se observan diferencias significativas; prueba t de *student*.

Durante la expansión de las hHF-MSCs se observaron cultivos menos proliferativos, ya que durante la duración de los cultivos no sobrepasaron confluencias del 40%. No obstante, la comparación de su viabilidad no mostró diferencias significativas con las poblaciones que alcanzaron el 50-60% de confluencia (Tabla 34; Figura 60).

Tabla 34. Comparación de la viabilidad y tiempo de duplicación de la población (PDT) mostrado por hHF-MSCs que solo alcanzaron un 30-40% de confluencia respecto a hHF-MSCs que alcanzaron un 50-60% de confluencia, con una misma densidad de siembra (5.000-8.000 células/cm²) y duración del cultivo.

		Confluencia 30-40%	Confluencia 50-60%
Viabilidad (%)	Promedio \pm SD	76,18 \pm 11,92	79,52 \pm 11,53
	Mediana (Q1; Q3) I.C. (95%)	76,58 (63,94; 86,53) 63,69 – 86,57	78,76 (69,12; 90,33) 69,12 – 90,33
	p-valor	0,37	
PDT (h)	Promedio \pm SD	42,32 \pm 5,23	37,62 \pm 9,07
	Mediana (Q1; Q3) I.C. (95%)	41,81 (38,16; 44,83) 38,07- 44,85	34,65 (32,36; 46,70) 32,36 – 46,70
	p-valor	0,03	

n=8, por triplicado; pases 1 a 6; edad de los donantes entre 21 y 40 años. Los resultados se presentan como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza (C.I. 95%), y como promedio \pm desviación estándar (SD). Los p-valores de la comparación con la población control se han obtenido mediante el test Mann-Whitney.

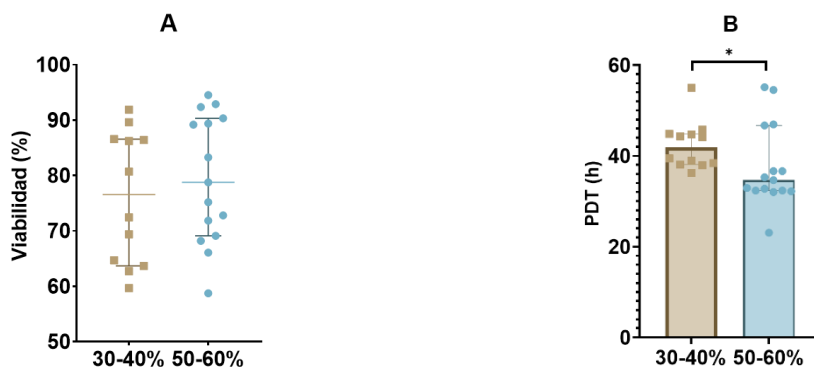


Figura 60. Viabilidad en porcentaje y tiempo de duplicación (PDT) en horas mostrado por las hHF-MSCs con una misma densidad de siembra (5.000-8.000 células/cm²) y diferentes grados de confluencia alcanzados tras 4-6 días

de cultivo. (N=8, por triplicado; pases 1 a 6; edad de los donantes entre 21 y 40 años). Los gráficos muestran la dispersión de los datos obtenidos. EL gráfico de diagrama de dispersión con barras (B) representa los datos como mediana e intervalo de confianza del 95% (columnas y barras de error, respectivamente); *p<0.05; test Mann-Whitney.

3.4 FASES DEL CRECIMIENTO EN EL SUBCULTIVO.

El proceso de crecimiento celular de las hHF-MSCs con medio suplementado con lisado de plaquetas humano comercial (HPL), desde su siembra hasta alcanzar su fase estacionaria, se describe mediante una curva de crecimiento (N=2, por triplicado, edad de los donantes: 25 y 36 años, pases de 2 a 5). A partir de los recuentos de células viables obtenidos cada 24 horas (Tabla 35) se llevó a cabo un análisis de regresión no lineal para la obtención de la ecuación de crecimiento logístico (Tabla 35) y la elaboración de la curva de crecimiento (Figura 61 - B). Tal y como puede observarse en esta Figura, el crecimiento logístico comienza casi exponencial y luego se desacelera a medida que alcanza el tamaño de población máxima posible. A medida que Y se acerca al máximo YM el crecimiento se ralentiza. El modelo logístico se ajusta a la ecuación $Y = Y_M * Y_0 / ((Y_M - Y_0) * \exp(-k * x) + Y_0)$. Mediante los datos obtenidos (Tabla 36) se calculó dicha ecuación de la curva $Y = 3,18 \times 10^8 / (3,64 \times 10^4 * X + 3,92 \times 10^3)$; $R^2 = 0,95$ para determinar el momento más adecuado para el subcultivo (Figura 61 – B). De esta manera es posible disponer de una población de hHF-MSCs con alta capacidad proliferativa para evitar entrar en estados conducentes a la senescencia celular.

Tabla 35. Densidad celular de hHF-MSCs en cultivo (N=2, por triplicado, edad de los donantes: 25 y 36 años, pases de 2 a 5). Los datos de densidad celular se muestran como promedio de células/cm² ± desviación estándar (SD).

Días de cultivo	Densidad celular (células/cm ²) ± SD	Confluencia (%)
Siembra	5.000-8.000	~10
1	N/D	N/D
2	N/D	N/D
3	28.893 ± 7.024	40-50
4	40.369 ± 7.291	60-70
5	57.729 ± 2.725	80-90
6	65.324 ± 2.870	90-100
7	72.269 ± 3.002	Agregación multicapa
8	N/D	N/D
9	N/D	N/D
10	81.448 ± 5.684	Agregación multicapa
11	82.467 ± 7.267	Agregación multicapa

Tabla 36. Crecimiento logístico de las hHF-MSCs. El modelo logístico se ajusta a la ecuación $Y = Y_M * Y_0 / [(Y_M - Y_0) * \exp(-k * x) + Y_0]$; Y_M (máxima densidad de la población celular); Y_0 (densidad inicial de siembra); k (constante cuya inversa “1/k” muestra el punto de inicio de la fase logarítmica).

	Best-fit values	Intervalo de confianza 95% (profile likelihood)
Y_M (células/cm ²)	81.164	75.828 - 87110
Y_0 (células/cm ²)	3.920	2.218 - 6.119
k	0,75	0,62 - 0,91
$X_{int} = 1/k$ (días)	1,33	1,09 - 1,60
Ecuación de la curva de crecimiento logístico:		
$Y = Y_M * Y_0 / [(Y_M - Y_0) * \exp(-k * x) + Y_0]$		
$Y = 3,18 \times 10^8 / (3,64 \times 10^4 X + 3,92 \times 10^3)$; $R^2 = 0,95$		

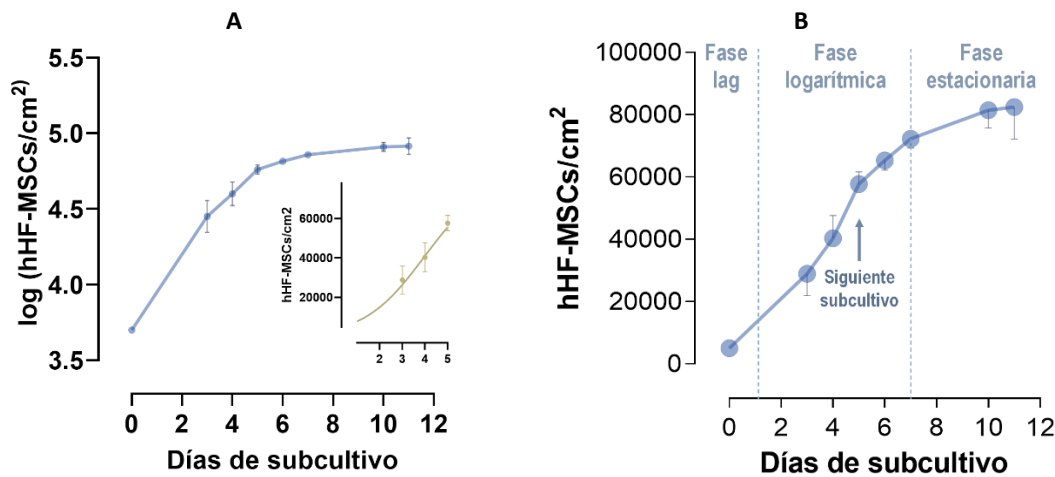


Figura 61. Curva de crecimiento de hHF-MSCs. Los datos se representan como el promedio de células/cm² ± desviación estándar frente a los días de subcultivo (N=2, por triplicado, edad de los donantes: 25 y 36 años, pases de 2 a 5). A) Incremento en la densidad celular (células/cm²) en una escala logarítmica representada frente a los días de subcultivo. El gráfico de inserción muestra la línea de regresión para ajustar un modelo de crecimiento exponencial de las medias de las densidades celulares obtenidas durante la duración del subcultivo hasta el día 5. B) Crecimiento logístico obtenido mediante regresión no lineal. La curva de crecimiento obtenida a partir de los datos de la tabla 35 se ajusta a la ecuación $Y = 3,18 \times 10^8 / (3,64 \times 10^4 X + 3,92 \times 10^3)$; $R^2 = 0,95$. La fase de latencia tiene una duración de ~1,33 días y la fase estacionaria comienza a partir del día 7. El 60-70% de confluencia se alcanza el día 4 y durante el quinto día se alcanza una confluencia entre el 80-90%.

El periodo de latencia fue de 1,33 días de duración (I.C. del 95% de 1,09 a 1,60) (Tabla 36). Tras los resultados obtenidos sobre las fases de crecimiento, viabilidad y cinética de crecimiento, se estimó que las hHF-MSCs al 80% de confluencia mostraban una alta tasa de duplicación de la población (Figura 58) sin entrar en fase estacionaria (Figura 61) y, por consiguiente, sin sufrir inhibición por contacto celular. A la vista de ello, puede concluirse que el cuarto día, o entre el cuarto y quinto días de cultivo, es el periodo óptimo para resembrar la población de hHF-MSCs sin sobrepasar el 80% de confluencia (Tabla 35; Figura 61).

3.5 OBTENCIÓN DE UN NÚMERO MÍNIMO DE hHF-MSCs CLÍNICAMENTE RELEVANTE.

El estudio del rendimiento de las hHF-MSCs para alcanzar el número mínimo de células clínicamente relevante (140×10^6 células, según Petrenko et al., 2020) se llevó a cabo en base a los resultados obtenidos de la duración del cultivo primario (Tabla 6) y de los recuentos de células viables por donante y réplica y valores de duplicación de la población celular en los pases 1 a 5 (Tabla 27). Todos los cultivos se realizaron con un lisado de plaquetas humano (HPL), para asegurar una eficiente proliferación de hMSCs de grado clínico (Matthyssen et al., 2017; Romaldini et al., 2018; Petrenko et al., 2020), sin necesidad de emplear sueros derivados de animales (*xeno-free*).

La duración del cultivo primario para hHF-MSCs, antes de que las células adherentes alcanzasen la confluencia, fue de 20,50 días (I.C. del 95% de 18,50 a 23,00) (Tabla 37). Asimismo, para alcanzar un número mínimo de hHF-MSCs clínicamente relevante (140×10^6), se requieren 12,00 (9,00 – 13,00) días de expansión celular tras el cultivo primario.

Las hHF-MSCs mostraron un alto potencial de proliferación durante los primeros pases tras el aislamiento, con una viabilidad de 80 - 90%. El número mínimo de células clínicamente relevante se alcanzó en el pase 2 (Tablas 37 y 38). No obstante, el límite inferior del intervalo de confianza no alcanzó el valor mínimo de 140×10^6 células. Este valor se alcanza con el límite inferior del I.C. (95%) del pase 3. Al coincidir este valor con el primer cuartil en dicho pase, se estableció que el 25% de los cultivos requirió llegar hasta el pase 3 para conseguir el número mínimo clínicamente relevante.

Tabla 37. Cinética de crecimiento de las hHF-MSCs en comparación con resultados previos para MSCs de procedencia de otros tejidos; datos obtenidos de Petrenko et al. (2020) *. En la tabla se muestra la duración necesaria para alcanzar el número de células clínicamente relevante (140×10^6). I.C. (intervalo de confianza).

Tejido del que proceden las hMSCs	Método de aislamiento (promedio de células aisladas)	Duración media (días) para alcanzar un total de 140×10^6 células			Pase hasta alcanzar 140×10^6 células
		Cultivo primario	Expansión	Total	
Médula ósea (hBM-MSCs) *	Sedimentación de gelofusina	8,40	34,60	43,10	4
Tejido adiposo (hAT-MSCs) *	Digestión con colagenasa	6,90	13,00	19,90	2
Wharton Jelly (hWJ-MSCs) *	Digestión con liberasa	13	7,60	20,60	2
Folículo piloso (hHF-MSCs) Mediana (I.C. del 95%)	Cultivo sin tratamiento desde el explante primario	20,50 (18,50; 23,00)	12,00 (9,00; 13,00)	32,50 (27,50; 36,00)	2

Tabla 38. Cálculo teórico del rendimiento celular de las hHF-MSCs.

Pase	Células viables / donante y réplica	cPD	Rendimiento teórico de hHF-MSCs (número de células x 2 ^{cPD})
P1	1,08 x 10 ⁶ (0,82; 1,29)	4,73 (3,90; 5,20)	28,63 x 10 ⁶ (12,20; 47,40)
P2	0,88 x 10 ⁶ (0,64; 1,52)	7,90 (6,10; 9,00)	211,85 x 10⁶ (43,69; 778,24)
P3	0,91 x 10 ⁶ (0,78; 1,69)	10,43 (8,30; 13,20)	1.256,47 x 10 ⁶ (245,83; 1.590,31)

Cálculo basado en los resultados de crecimiento celular obtenidos en los diferentes ensayos (pases 1 a 3). Los resultados se presentan como mediana e intervalo de confianza del 95% (I.C.). El recuento de células viables se muestra como número de hHF-MSCs viables obtenidas por donante y réplica. cPD (valor acumulado de duplicaciones de la población).

3.6 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN.

El análisis de las fases del ciclo celular en el que se encuentran las hHF-MSCs de nuestro estudio se llevó a cabo por citometría de flujo empleando yoduro de propidio, dado que el contenido de ADN refleja la fase del ciclo celular en el que se encuentran las células (Figura 62-A). El estudio se realizó para hHF-MSCs en pases 5-6, pases en los que las MSCs derivadas del folículo piloso aún no muestran signos de senescencia (Bajpai et al., 2012).

El valor de la mediana obtenido mostró que las hHF-MSCs en pases 5-6 presentaba el 75,98% (intervalo de confianza del 95% de 74,27 a 77,61) de células en fase G0/G1, 12,81% (I.C. 95% de 11,90 a 14,44) en fase S y 11,06% (I.C. 95% de 10,08; 11,55) en fase G2/M del ciclo celular (Tabla 39; Figura 62-A). En la Figura 62-B se compara el porcentaje de células en las fases proliferativas S + G2/M (24,03% [I.C. 95% de 22,39 a 25,73]) con los obtenidos por Zhang et al. (2013), en MSCs procedentes de la papila dérmica y vaina dérmica del folículo piloso (20,43%), y se observa que ambas poblaciones de hHF-MSCs muestran un ciclo celular lento. Asimismo, la comparación de los datos de citometría de flujo obtenidos para las hHF-MSCs de nuestro estudio en los pases 5-6 con los mostrados por Zhang et al. (2013) en pases 9 a 11 (79,57% en fase G0/G1, 14,40% en fase S y 6,03% en fase G2/M) sugieren que el ciclo celular lento característico de las MSCs se mantiene en las hHF-MSCs de nuestro estudio. Por otra parte, las hHF-MSCs en fase 5-6 muestran una fracción de S+G2/M superior a la hallada por Zhang et al. (2013) en pases más altos (pases 9 a 11) de MSCs procedentes de la papila dérmica y de la vaina dérmica del folículo piloso (Figura 62-B). Este dato confirma que, en pases tempranos, el índice de proliferación es más alto y, por tanto, el tiempo de duplicación de la población hHF-MSCs estudiada por nosotros es significativamente menor, tal y como se ha demostrado en el análisis de las cinéticas de crecimiento.

El índice de proliferación (PI) para las hHF-MSCs en fase 6 fue de 0,24 (con un intervalo de confianza del 95% de 0,22 a 0,26) (Tabla 39), siendo este valor de 0,20 para este tipo celular en pases más tardíos 9-11 (Zhang et al, 2013), lo que confirma la disminución de la proliferación conforme aumentan los subcultivos.

Tabla 39. Porcentaje de células de las distintas fases del ciclo celular e índices de proliferación en hHF-MSCs.

		G0/G1	S	G2/M	S + G2/M	Índice de proliferación
Población hHF-MSC (%)	Promedio ± SD	75,98 ± 1,46	13,07 ± 1,17	10,96 ± 0,52	24,02 ± 1,46	0,24 ± 0,01
	Mediana (Q1; Q3)	75,98 (74,77; 77,24)	12,81 (12,09; 14,14)	11,06 (10,77; 11,26)	24,03 (22,76; 25,23)	0,24 (0,23; 0,25)
	I.C. (95%)	(74,27; 77,61)	(11,90; 14,44)	(10,08; 11,55)	(22,39; 25,73)	(0,22; 0,26)
Datos obtenidos por Zhang et al. (2013)	Promedio *	79,57	14,40	6,03	20,43	0,20

n=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes 21 y 42 años. Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza para la mediana (I.C. 95%), y se comparan con los promedios obtenidos por Zhang et al. (2013) para MSCs de la papila dérmica y de la vaina dérmica del folículo piloso (pases 9-11). (*) El valor SD no se muestra porque este dato no fue publicado.

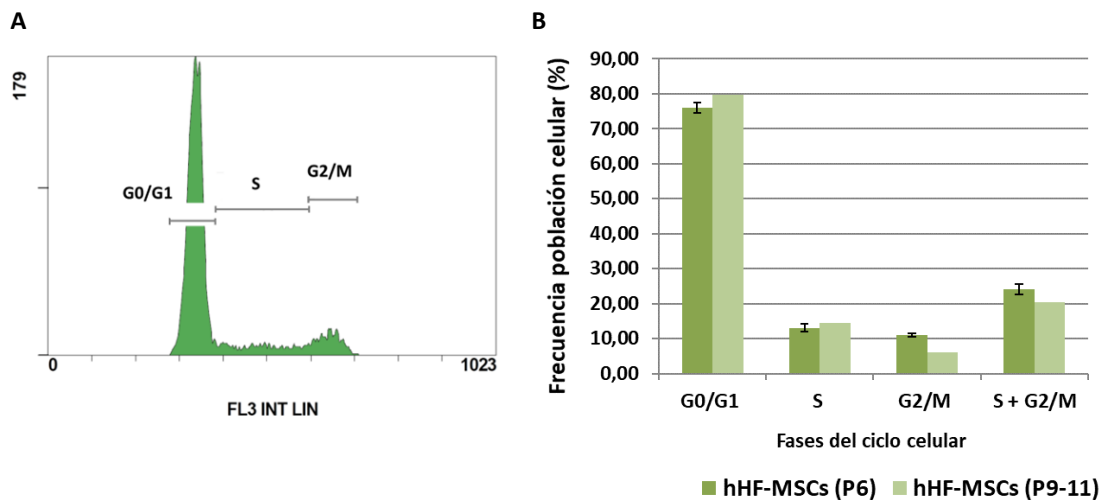


Figura 62. A) Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. B) Análisis comparativo de los datos obtenidos por citometría de flujo (N=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes 21 y 42 años) con los pases 9-11 obtenidos por Zhang et al. (2013) (las barras de error no se muestran porque este dato no fue publicado).

3.7 SINCRONIZACIÓN CELULAR TRAS LA INHIBICIÓN POR CONTACTO Y ESTADO DE DEPRIVACIÓN.

3.7.1 Efecto de la sincronización celular en fase G0/G1 del ciclo celular en la capacidad proliferativa.

3.7.1.1 Inducción a la sincronización celular en fase G0/G1.

El contacto celular de MSCs humanas altera las cinéticas de crecimiento y acelera su senescencia (Ho et al., 2011). Con la finalidad de estudiar estos efectos, procedimos a provocar la detención del ciclo celular en la población de hHF-MSCs (población experimental B de la Figura 63) y al análisis de la capacidad proliferativa de estos cultivos. Para inducir la sincronización en fase G0/G1 se llevó a cabo una estrategia consistente en una elevada densidad de siembra (20.000 células/cm²) para asegurar una confluencia total en 4-5 días, tras lo cual, se procedió al mantenimiento del cultivo en estado de privación de nutrientes y factores de crecimiento (Figura 63). La privación de factores de crecimiento es un método que ya fue descrito por Darzynkiewicz et al. (1996) para detener las células en fase G0/G1. Comprobamos mediante citometría de flujo que efectivamente se había conseguido la sincronización del ciclo celular en las

poblaciones de hHF-MSCs resultantes del cultivo a alta densidad celular durante 7 días desde su siembra, denominada en adelante “células sincronizadas en fase G0/G1”. Como control se emplearon “células no sincronizadas” que consistieron en hHF-MSCs cuya densidad de siembra fue de 12.500 células/cm² y cuya expansión se favoreció hasta alcanzar la confluencia total sin mantenerlas en un estado de inhibición por contacto y de agotamiento de nutrientes (población control A de la Figura 63).

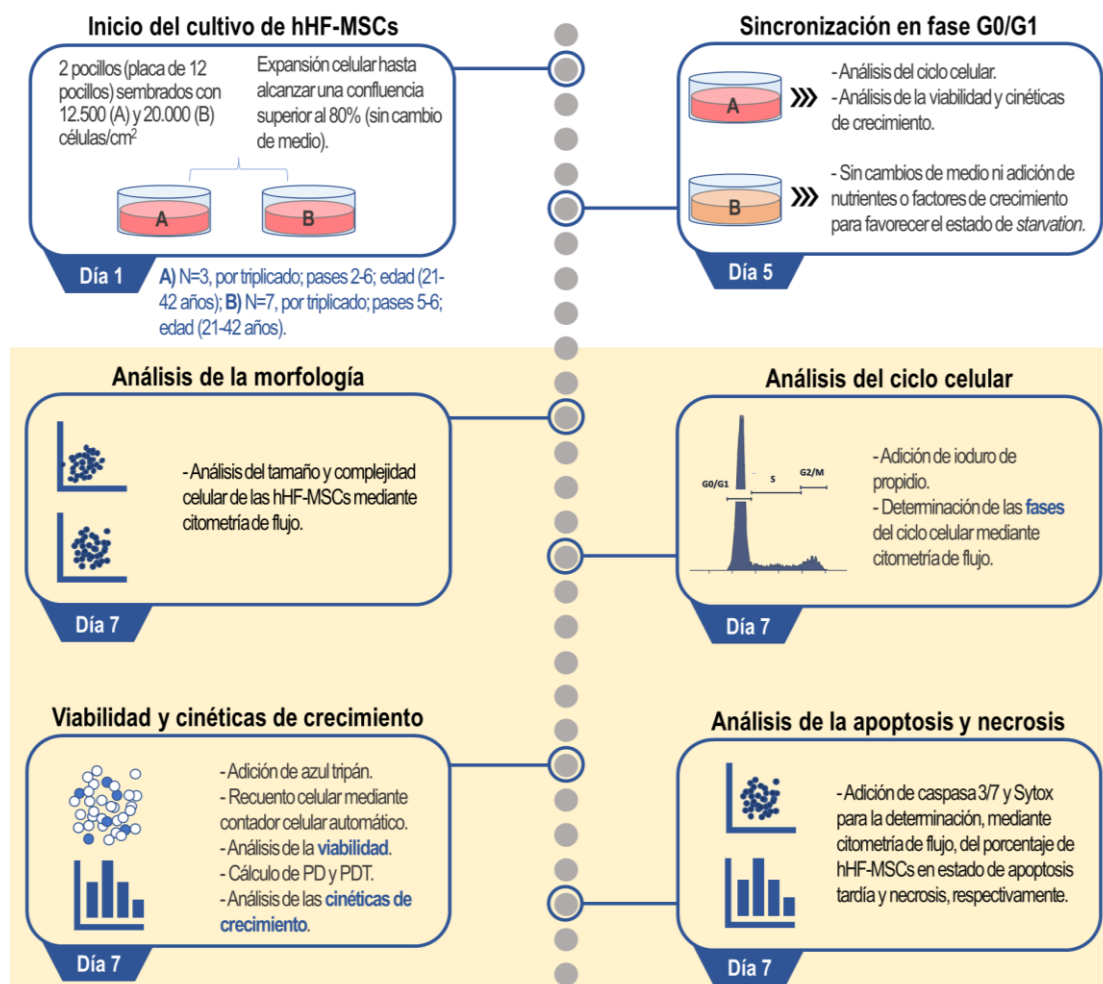


Figura 63. Esquema del diseño experimental realizado para el análisis de los efectos de la sincronización de las hHF-MSCs en fase G0/G1 sobre la proliferación celular. Población A (células control no sincronizadas); N=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes entre 21 y 42 años. Población B (células sincronizadas en fase G0/G1); N = 7 (pool); por triplicado; pases 5-6; edad de los donantes entre 21 y 42 años. PD (duplicación de la población); PDT (tiempo de duplicación de la población).

3.7.1.2 Morfología celular.

La alta confluencia celular induce cambios morfológicos en las hHF-MSCs y se observa que las células se alargan y aplanan, como se describió en el apartado 2.2. Para comprobar el efecto de la sincronización de la población de hHF-MSCs en fase G0/G1 sobre la morfología celular, se procedió al análisis de su tamaño y complejidad celular mediante citometría de flujo (Figura 64-B), frente a hHF-MSCs no sincronizadas (Figura 64-A). El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo en 10.000 células de cada cultivo. Los gráficos de citometría de flujo indicaron el tamaño y la complejidad celular determinados por

la dispersión frontal (FS) y dispersión lateral (SS), respectivamente. Los gráficos muestran cada punto como un evento (partícula que ha sido excitada por el láser) y representan mediante colores la frecuencia relativa (densidad) de las poblaciones. Los resultados obtenidos por citometría para la población experimental (población B de la Figura 63) que se había sometido a un proceso para la sincronización en estado quiescente, en condiciones de alta confluencia y estado de privación de nutrientes y factores de crecimiento, mostraron una disminución del tamaño celular, tal y como puede observarse en la Figura 64 (representados por colores cercanos al naranja y rojo), y un aumento de la complejidad celular en una fracción menor de la población (eventos representados en su mayor parte por colores verdes y azules). El efecto de la sincronización celular en fase G0/G1 sobre la apoptosis se analiza en el subapartado 3.7.1.5.

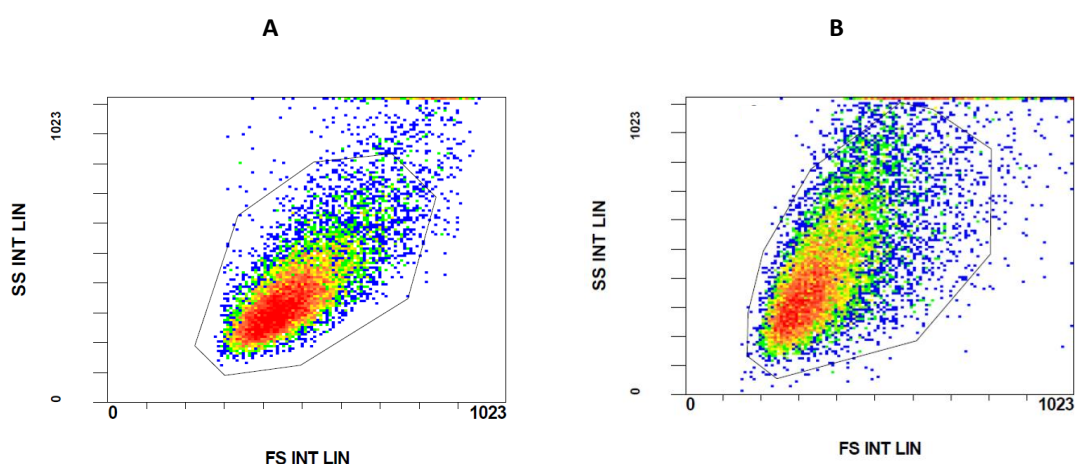


Figura 64. Gráficos de dispersión lateral (SS) y dispersión frontal (FS). (A) Células no sincronizadas (N=2; por duplicado; pase 6; edad 25 años); (B) Células sincronizadas en fase G0/G1 (N=7 (pool); por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años). Los gráficos muestran a cada punto como un evento (se define como evento a cualquier partícula que haya sido excitada por el láser). Por tal motivo, el desplazamiento de los puntos hacia la derecha indica un aumento de tamaño celular (FS); mientras que el desplazamiento de los puntos hacia arriba muestra un aumento de la complejidad celular (SS). Las poblaciones con mayor número de eventos (mayor frecuencia relativa) se representan mediante colores cercanos al rojo.

3.7.1.3 Ciclo Celular e Índice de Proliferación.

Para comprobar que tiene lugar la sincronización en fase G0/G1 de las hHF-MSCs provocada por el contacto celular y el mantenimiento en estado de privación se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo empleando yoduro de propidio. Los resultados de la citometría de la población experimental B (Figura 63), sincronizada en estado quiescente, mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células en fase G0/G1 (Tabla 40; Figura 65), como era de esperar. El porcentaje de células en fase G0/G1 en la población hHF-MSCs sincronizada fue del 91,00% (intervalo de confianza del 95% de 89,63 a 92,29) frente al mostrado por la población control no sincronizada (75,98% [I.C. del 95% de 74,27 a 77,61]) en la misma fase.

Tabla 40. Porcentaje de células de las distintas fases del ciclo celular e índices de proliferación en hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1.

		G0/G1	S	G2/M	S + G2/M	Índice de proliferación
Células control no sincronizadas (%)	Promedio ± SD	75,98 ± 1,46	13,07 ± 1,17	10,96 ± 0,52	24,02 ± 1,46	0,24 ± 0,01
	Mediana (Q1; Q3)	75,98 (74,77; 77,24)	12,81 (12,09; 14,14)	11,06 (10,77; 11,26)	24,03 (22,76; 25,23)	0,24 (0,23; 0,25)
	I.C. (95%)	74,27 - 77,61	(11,90; 14,44)	(10,08; 11,55)	(22,39; 25,73)	(0,22; 0,26)
Células sincronizadas en fase G0/G1 (%)	Promedio ± SD	90,92 ± 1,37	1,56 ± 0,49	7,51 ± 1,08	9,08 ± 1,37	0,09 ± 0,01
	Mediana (Q1; Q3)	91,00 (90,61; 91,76)	1,46 (1,34; 1,75)	7,43 (6,88; 8,22)	9,00 (8,25; 9,39)	0,09 (0,08; 0,09)
	I.C. (95%)	(89,63; 92,29)	(1,22; 1,92)	(6,26; 8,45)	(7,71; 10,37)	(0,08; 0,10)
p - valor		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Población sincronizada (n=7 (pool), por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años), frente a la población control no sincronizada (n=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes 21 y 42 años). Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza para la mediana (I.C. 95%). Los p-valores de la comparación con la población control se han obtenido mediante la prueba Mann-Whitney.

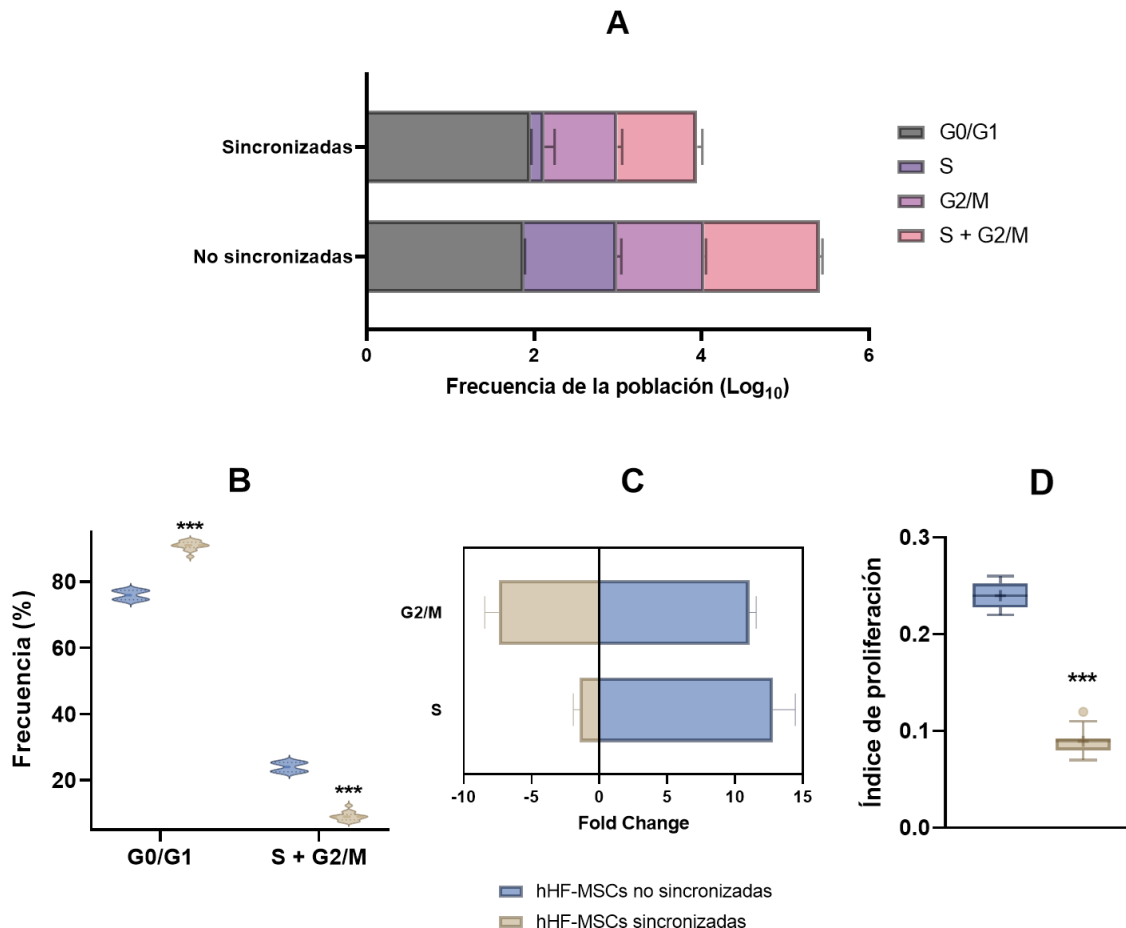


Figura 65. Análisis del ciclo celular en hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 y población control no sincronizada. A) Distribución de las fases del ciclo celular (mediana e intervalo de confianza (95%) representadas en un gráfico de barras apiladas; B) Gráfico tipo violín de la distribución de las células en fase G0/G1 y la suma de las fases S y G2/M; mediana (línea discontinua más gruesa); cuartiles 1 y 3 (líneas punteadas); C) Fases S y G2/M en una representación de barras que se extienden a izquierda y derecha para facilitar la visualización de los resultados de la Figura A; D) Índices de proliferación representados en un gráfico de cajas y bigotes que muestra la media (·), la

mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Los valores atípicos se representan con un círculo. Las diferencias significativas se muestran frente a la población control no sincronizada; ***p<0.001; test Mann-Whitney.

En cuanto a las fases S+G2/M, se observó una disminución estadísticamente significativa en la población de células una vez alcanzada la inhibición por contacto (9,00% [intervalo de confianza del 95% de 7,71 a 10,37] frente al 24,03% [I.C. 95% de 22,39 a 25,73] que mostraron las células control no sincronizadas (Tabla 40; Figura 65-B). En la Figura 65-C se muestra la comparación de los resultados obtenidos para las fases S y G2/M del ciclo celular donde se observa de forma más clara la disminución del porcentaje de hHF-MSCs en estas fases cuando sufren una inhibición por contacto y estado de privación.

3.7.1.4 *En síntesis, el índice de proliferación (Tabla 40; Figura 65-D) fue 2,6 veces menor en la población celular sincronizada en fase G0/G1 (0,09 [I.C. 95% de 0,08 a 0,10] frente a 0,24 [I.C. de 0,22 a 0,26] correspondiente a la población control, lo que se corresponde con el aumento significativo de células en fase G0/G1 en la población hHF-MSCs inhibida por contacto y en estado de privación de nutrientes y de factores de crecimiento. Cinética de crecimiento tras la sincronización del cultivo.*

Para el estudio del efecto que ejerce la sincronización de las hHF-MSCs en fase G0/G1 por confluencia y estado de privación de nutrientes en la proliferación celular, se compararon las duplicaciones y los tiempos de duplicación de la población sincronizada (población B de la Figura 68) frente a la población control no sincronizada (población A de la Figura 68). Ambas poblaciones superaron el 80% de confluencia. Los resultados de las cinéticas de crecimiento (Tabla 41; Figura 66) de los cultivos de hHF-MSCs sincronizados en G0/G1 mostraron una reducción significativa de la duplicación de la población (1,65 [intervalo de confianza del 95% de 1,42 a 2,15]), frente a las poblaciones no sincronizadas (2,24 [I.C. 95% de 2,08 a 2,48]); asimismo, el tiempo de duplicación de cultivos fueron significativamente prolongados (87,49 horas [I.C. 95% de 74,43 a 94,99]) respecto a la población no sincronizada (39,89 horas [I.C. 95% de 35,77 a 43,95]).

Tabla 41. Valores estadísticos descriptivos de la duplicación de la población (PD) y tiempo de duplicación de la población (PDT) en hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1.

	Control Células no sincronizadas	Células sincronizadas en fase G0/G1
PD Promedio ± SD	2,31 ± 0,30	1,82 ± 0,66
PD Mediana (Q1; Q3) I.C. (95%)	2,24 (2,08; 2,48) (2,08; 2,48)	1,65 (1,43; 2,06) (1,42; 2,15)
p-valor (PD)		0.002
PDT (h) Promedio ± SD	39,94 ± 7,64	93,36 ± 22,66
PDT (h) Mediana (Q1; Q3) I.C. (95%)	39,89 (35,77; 43,95) (35,77; 43,95)	87,49 (81,00; 100,52) (74,43; 94,99)

p-valor (PDT)	0.000
---------------	-------

Población sincronizada (n=7 (pool), por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años) y población control no sincronizada (n=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes 21 y 42 años). Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza para la mediana (I.C. 95%). Los p-valores de la comparación con la población control no sincronizada se han obtenido mediante la prueba Mann-Whitney.

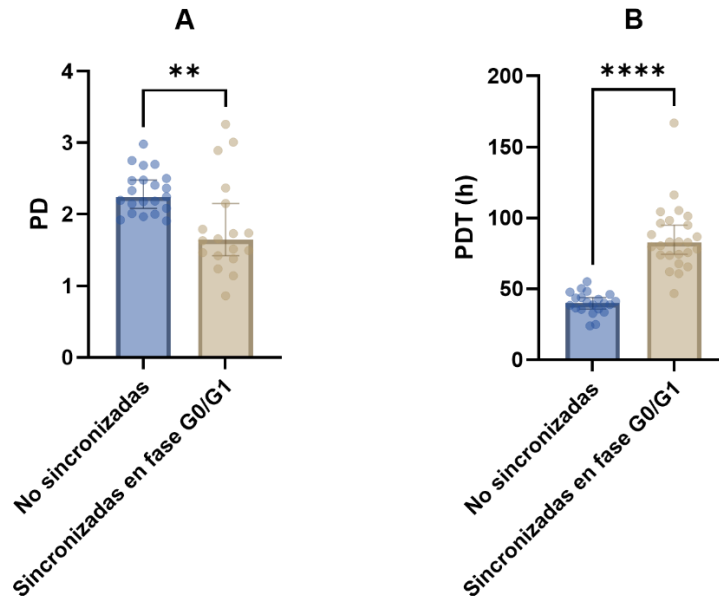


Figura 66. Efecto de la sincronización en fase G0/G1 de las hHF-MSCs por contacto celular y estado de privación en la cinética de crecimiento. Poblaciones analizadas hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 (N=7 (pool), por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años) y población control no sincronizada (N=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes 21 y 42 años). Los gráficos de diagrama de dispersión con barras representan los datos PD (A) y PDT (B) como mediana e intervalo de confianza del 95% (columnas y barras de error, respectivamente). PD (Duplicación de la población); PDT (Tiempo de duplicación de la población (PDT)); **p<0.01, ***p<0.001; ****p<0.0001; test Mann-Whitney.

3.7.1.5 Viabilidad. Apoptosis y necrosis celular.

Para valorar los efectos de la sincronización de las hHF-MSCs en fase G0/G1 del ciclo celular sobre la viabilidad, se compararon las poblaciones hHF-MSCs sincronizadas (69,00% [intervalo de confianza del 95% de 65,06 a 72,84]) frente a las poblaciones control no sincronizadas (87,10% [I.C. 95% de 74,43 a 89,83]), observándose una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad (Tabla 42; Figura 67). Sin embargo, debido a que este método de recuento es menos constante a medida que aumenta el tiempo en que las células están en contacto con el azul tripán (Mascotti et al., 2000), se analizó la necrosis mediante citometría de flujo de células teñidas con Sytox, por ser un método más estable que el recuento celular con azul tripán, y demostrar, de esta manera que la disminución de la viabilidad observada se correspondía con el efecto de la inhibición por contacto y/o estado de privación, y no a complicaciones durante el desarrollo de la metodología.

Tabla 42. Valores estadísticos descriptivos de los porcentajes de viabilidad obtenidos en hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1.

	Control Células no sincronizadas	Células sincronizadas en fase G0/G1
Promedio ± SD	81,35 ± 13,01	68,14 ± 11,47
Mediana (Q1; Q3)	87,10 (74,29; 90,25)	69,00 (65,32; 72,26)
I.C. (95%)	(74,43; 89,83)	(65,06; 72,84)
p-valor		0.003

Población sincronizada (n=7 (pool), por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años); población control no sincronizada (N=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes 21 y 42 años). Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza para la mediana (I.C. 95%). Los p-valores de la comparación con la población control no sincronizada se han obtenido mediante la prueba Mann-Whitney.

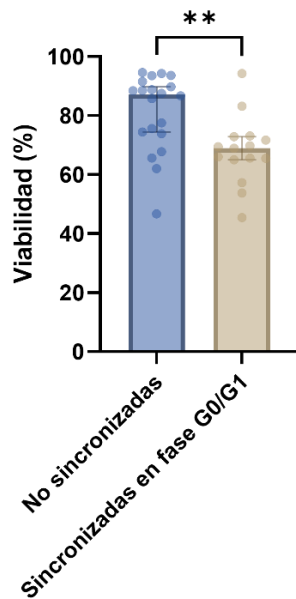


Figura 67. Efecto de la inhibición por contacto en la viabilidad de las hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 por contacto celular y estado de privación. Poblaciones analizadas: hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 (N=7 (pool), por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años) y población control no sincronizada (N=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes 21 y 42 años). El gráfico de diagrama de dispersión con barras representa el porcentaje de viabilidad como mediana e intervalo de confianza del 95% (columnas y barras de error, respectivamente); **p<0.01; test Mann-Whitney.

Los estados no proliferativos irreversibles de las hHF-MSCs se analizaron mediante citometría de flujo con el fin de estimar el porcentaje de células en apoptosis tardía y de células necróticas, tanto en la población sincronizada en fase G0/G1 (población B de la Figura 68) como en la población control no sincronizada (población A de la Figura 68). Para ello se analizó, mediante el reactivo de detección de caspasa-3/7 Green CellEvent™ 530/30, el porcentaje de la población que expresaba caspasa 3 y caspasa 7 para determinar así la proporción de células apoptóticas. Y, por otro lado, se analizaron las células muertas mediante tinción con Sytox™ AADvanced™ 690/50, ya que las células vivas y apoptóticas son impermeables a este colorante fluorescente, mientras que las células necróticas si son permeables al Sytox (Figura 68).

A

B

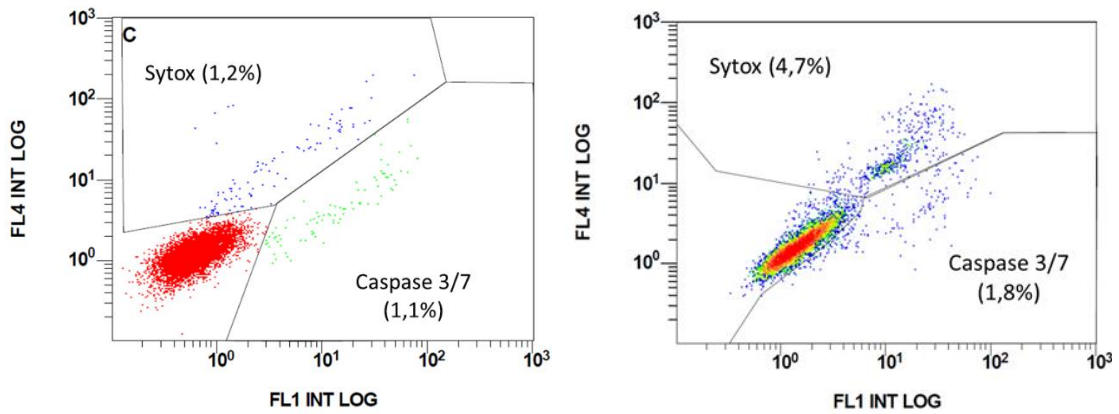


Figura 68. Análisis de los estados apoptóticos y necróticos por citometría de flujo en hHF-MSCs por efecto de la sincronización celular en hHF-MSCs por contacto celular y privación (B), frente a la población no sincronizada control (A).

Tabla 43. Porcentaje de hHF-MSCs apoptóticas y necróticas en la población sincronizada en fase G0/G1, frente a la población no sincronizadas (control).

		Apoptóticas (%)	Necróticas (%)	Apoptóticas + Necróticas (%)
Células control no sincronizadas (%)	Promedio \pm SD	1,16 \pm 0,22	1,39 \pm 0,23	2,55 \pm 0,41
	Mediana (Q1; Q3)	1,07 (1,04; 1,19)	1,40 (1,20; 1,59)	2,45 (2,23; 2,77)
	I.C. (95)	(1,01; 1,48)	(1,18; 1,60)	(2,22; 3,08)
Células sincronizadas en fase G0/G1 (%)	Promedio \pm SD	2,65 \pm 1,35	5,33 \pm 1,13	7,97 \pm 1,16
	Mediana (Q1; Q3)	2,83 (1,49; 3,74)	5,09 (4,53; 6,15)	8,03 (7,31; 8,61)
	I.C. (95)	(1,34; 4,08)	(4,50; 6,18)	(6,56; 9,06)
p - valor		0,010	0,001	0,001

Población control no sincronizada (N=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes 21 y 42 años). Población sincronizada (N=7 (pool), por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años). Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza para la mediana (I.C. 95%). Los p-valores de la comparación con la población control se han obtenido mediante la prueba Mann-Whitney.

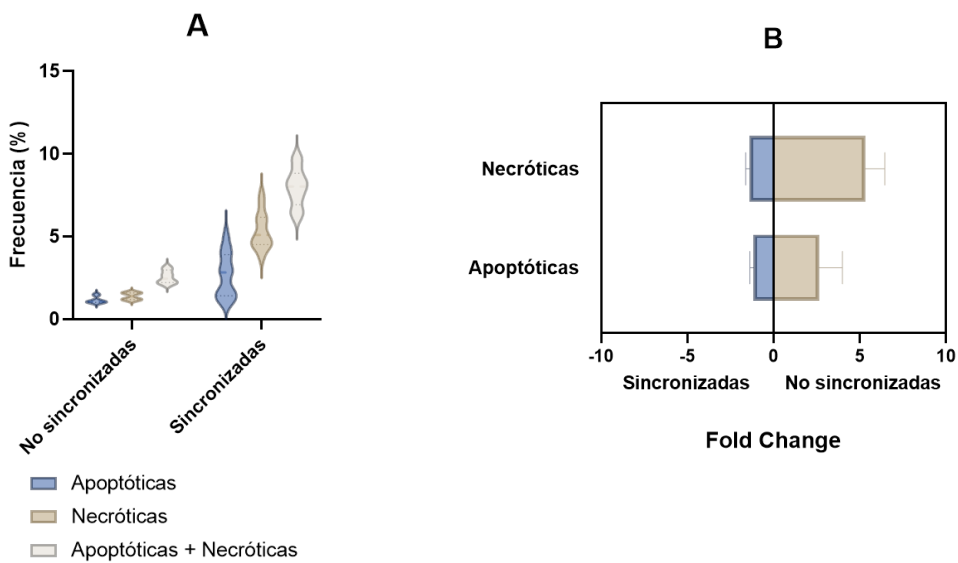


Figura 69. Efecto de la sincronización celular en hHF-MSCs por contacto celular y estado de privación en la apoptosis y necrosis. Poblaciones analizadas: hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 (N=7 (pool), por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años) y población control no sincronizada (N=3, por triplicado; pases 2-6; edad de los donantes 21 y 42 años). A) Gráfico tipo violín que representa la distribución del porcentaje de células apoptóticas y necróticas obtenido para cada población; mediana (línea discontinua más gruesa); cuartiles 1 y 3 (líneas punteadas); B) Gráfico de barras que se extienden a izquierda y derecha para facilitar la visualización de los resultados. Las diferencias significativas se muestran frente a la población control no sincronizada; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; test Mann-Whitney.

Las hHF-MSCs control no sincronizadas en fase G0/G1 mostraron valores de apoptosis tardía y necrosis del 1,07% (intervalo de confianza del 95% de 1,01 a 1,48) y 1,40% (I.C. 95% de 1,18 a 1,60), respectivamente.

En el caso de células hHF-MSCs que habían sufrido el efecto de la inhibición por contacto y privación, el número de células apoptóticas y necróticas aumentó significativamente, presentando unos valores de 2,83% (I.C. 95% de 1,34 a 4,08) y 5,09% (I.C. 95% de 4,50 a 6,18), respectivamente (Tabla 43, Figura 69).

El aumento significativo en la necrosis celular tras la inhibición por contacto y agotamiento de nutrientes y factores de crecimiento también fue observado en los ensayos de viabilidad con el método de tinción por exclusión con azul tripán (Figura 67), por lo que los resultados de ambas pruebas confirman que la sincronización de hHF-MSCs en G0/G1 contribuye al aumento de la muerte celular.

3.7.2 Recuperación de cultivos sincronizados en fase G0/G1.

La quiescencia, al contrario que la senescencia, se caracteriza por un estado de detención reversible del ciclo celular. Se ha descrito que determinadas moléculas como el resveratrol (Peltz et al., 2012) o Dlk1 (*DLK1 delta like non-canonical Notch ligand 1*) (Walker et al., 2019) inducen la reentrada en el ciclo celular.

En algunos cultivos de hHF-MSCs las células dejan de proliferar, incluso tras las tripsinizaciones y resiembras con medio fresco para impulsar de nuevo su crecimiento, tal y como se describe en el apartado 1.4. Con el objetivo de comprobar si el resveratrol ayuda a recuperar estos cultivos, se trató una población de hHF-MSCs (población B de la Figura 70) durante 5 días con resveratrol (10 μ M) y posteriormente se indujo la sincronización en fase G0/G1 manteniendo 48 horas más los cultivos hasta asegurar el efecto de la inhibición por contacto, y sin adicionar medio fresco para favorecer el estado de agotamiento de nutrientes y factores de crecimiento. Como población control se emplearon hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 sin tratamiento con resveratrol (población A de la Figura 70).

Para analizar si el tratamiento con resveratrol 10 μ M había inducido la reentrada en el ciclo celular en hHF-MSCs se adicionó yoduro de propidio a ambas poblaciones celulares y se estimó la proporción de hHF-MSCs en fase S del ciclo celular. Asimismo, se trataron las células con EdU Alexa Fluor® 488 y se comparó el porcentaje de células en fase S obtenido con el porcentaje de células que habían incorporado EdU durante la síntesis de ADN (Tabla 44; Figura 73-A).

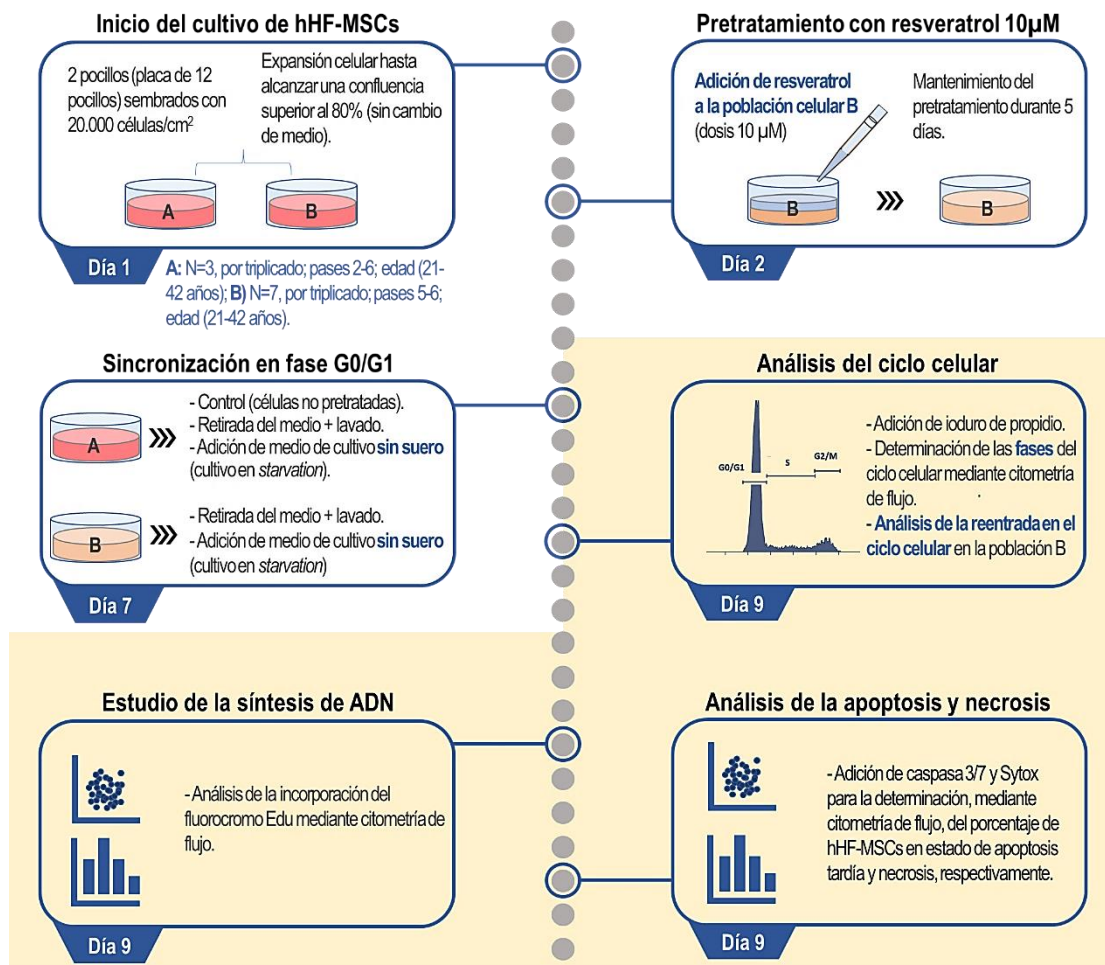


Figura 70. Esquema del diseño experimental realizado para el análisis de la reentrada en el ciclo celular de hHF-MSCs pretratadas con resveratrol 10 µM que son inducidas a la sincronización en fase G0/G1. Población A (células control no pretratadas); N = 7 (pool); por triplicado; pases 5-6; edad de los donantes entre 21 y 42 años. Población B (células pretratadas con resveratrol); N = 7 (pool); por triplicado; pases 5-6; edad de los donantes entre 21 y 42 años. Edu (Edu Alexa Fluor® 488).

Los resultados obtenidos tras el análisis del ciclo celular mostraron que el porcentaje de células en fase S del cultivo de hHF-MSCs tratadas con resveratrol 10 µM (población A de la Figura 70) aumentó de forma significativa frente a la población no tratada (población B de la Figura 70) de 1,45% (intervalo de confianza del 95% de 1,22; 1,92) a 3,72% (I.C. 95% de 2,85 a 5,42) (Tabla 44, Figura 71). Asimismo, la incorporación del fluorocromo Edu Alexa Fluor® 488 durante la síntesis de ADN en hHF-MSCs en las mismas condiciones de cultivo para las células control y las tratadas con resveratrol 10 µM, mostró que la población tratada experimentó un incremento en la síntesis de ADN (Tabla 44, Figura 67-68), al igual que ocurría al analizar la fase S del ciclo celular, aunque no alcanzó el porcentaje de células en fase S mostrado por las hHF-MSCs no sincronizadas (Figura 73-B). No obstante, el tratamiento con resveratrol 10 µM muestra su efecto para inducir la reentrada de hHF-MSCs quiescentes en el ciclo celular y esto también ha sido observado en estudios previos de MSCs de otras fuentes de procedencia (Peltz et al., 2012).

Tabla 44. Porcentaje de hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 tratadas con resveratrol 10 μ M, frente a la población sincronizada no tratada (control). N=7 (pool), por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años.

		Fase S del ciclo celular	Incorporación de EdU Alexa Fluor® 488	p - valor
Células control sincronizadas en fase G0/G1 no tratadas (%)	Promedio \pm SD	1,56 \pm 0,49	1,30 \pm 0,66	0,161
	Mediana (Q1; Q3)	1,45 (1,33; 1,64)	1,07 (0,90; 1,44)	
	I.C. (95%)	(1,22; 1,92)	(0,71; 2,51)	
Células tratadas con resveratrol 10 μM sincronizadas en fase G0/G1 (%)	Promedio \pm SD	4,57 \pm 1,20	7,74 \pm 5,42	0,114
	Mediana (Q1; Q3)	3,72 (3,29; 4,57)	5,80 (5,18; 7,38)	
	I.C. (95%)	(2,85; 5,42)	(3,90; 11,57)	
p - valor		0,004	0,004	

Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% para la mediana (I.C. 95%). Los p-valores de la comparación con la población control se han obtenido mediante la prueba Mann-Whitney.

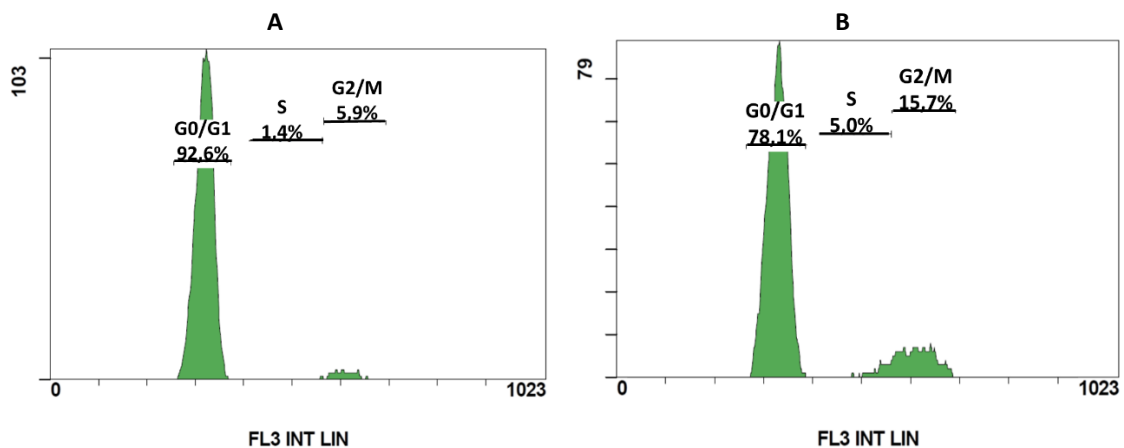


Figura 71. Citometría de flujo para el análisis del ciclo celular en hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 mediante contacto celular y estado de privación. A) Población control: hHF-MSCs no tratadas con resveratrol. B) hHF-MSCs tratadas con resveratrol 10 μ M. N=7 (pool); por triplicado; pases 5-6; edad de los donantes entre 21 y 42 años.

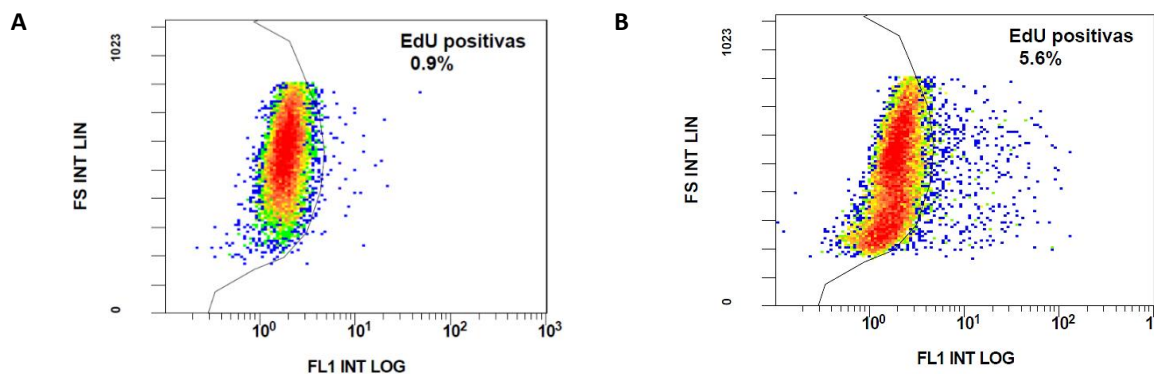


Figura 72. Citometría de flujo de la incorporación de EdU (EdU Alexa Fluor® 488) en hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 mediante contacto celular y estado de privación. A) Población control: hHF-MSCs no tratada con resveratrol. B) hHF-MSCs tratadas con resveratrol 10 μ M. N=7 (pool); por triplicado; pases 5-6; edad de los donantes entre 21 y 42 años.

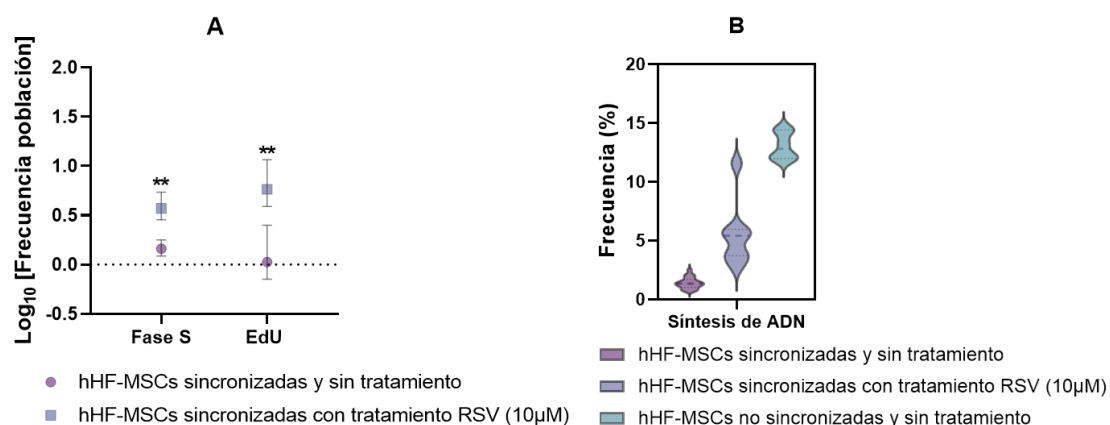


Figura 73. Reentrada en el ciclo celular de la población hHF-MSCs tratada con resveratrol (RSV) 10 µM. A) Comparación entre la fase S y la incorporación de EdU (EdU Alexa Fluor® 488) en hHF-MSCs sincronizadas en fase G₀/G₁ tratadas con resveratrol 10 µM frente al control (hHF-MSCs sincronizadas y sin tratamiento). Los resultados se muestran como log₁₀ de la mediana e intervalo de confianza del 95%. No existen diferencias significativas entre los dos métodos. Las diferencias significativas se muestran frente a la población control no tratada; **p<0.01; test Mann-Whitney. B) Gráfico tipo violín de la distribución de las frecuencias obtenidas para la síntesis de ADN (en porcentaje) en la población hHF-MSC tratada con resveratrol, frente a las poblaciones no tratadas sincronizada y no sincronizada; mediana (línea discontinua más gruesa); cuartiles 1 y 3 (líneas punteadas). N=7 (pool); por triplicado; pases 5-6; edad de los donantes entre 21 y 42 años.

El resveratrol 10 µM no mostró efectos apreciables sobre la apoptosis y necrosis en hHF-MSCs sincronizadas en fase G₀/G₁ que reentraron en ciclo (población B de la Figura 70), ya que los valores obtenidos para apoptosis y necrosis (3,83% [I.C. 95% de 2,56 a 5,10] y 6,06% [I.C. 95% de 5,83 a 6,28], respectivamente) (Tabla 45, Figura 74) fueron similares a los valores obtenidos en las réplicas de la población sincronizada en fase G₀/G₁ sin tratar (población A de la Figura 70), por lo que, en principio esta molécula no parece afectar a la viabilidad celular de las hHF-MSCs.

Tabla 45. Porcentaje de hHF-MSCs sincronizadas en fase G₀/G₁ tratadas con resveratrol 10 µM, frente a la población sincronizada no tratada (control). N=7 (pool), por triplicado; pases 5-6; edades entre 21 y 42 años. Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% para la mediana (I.C. 95%). No se observan diferencias significativas; test Mann-Whitney.

		Apoptóticas (%)	Necróticas (%)
Células control sincronizadas en fase G ₀ /G ₁ no tratadas (%)	Promedio ± SD	2,65 ± 1,35	5,33 ± 1,13
	Mediana (Q1; Q3)	2,83 (1,49; 3,74)	5,09 (4,53; 6,15)
	I.C. (95%)	(1,34; 4,08)	(4,50; 6,18)
Células tratadas con resveratrol 10 µM sincronizadas en fase G ₀ /G ₁ (%)	Promedio ± SD	3,83 ± 1,80	6,06 ± 0,32
	Mediana (Q1; Q3)	3,83 (3,20; 4,47)	6,06 (5,94; 6,17)
	I.C. (95%)	(2,56; 5,10)	(5,83; 6,28)

A

B

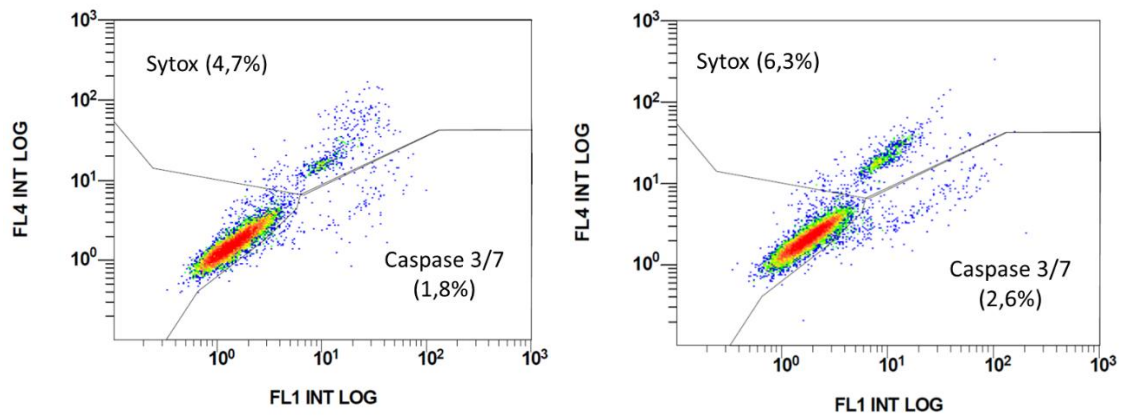


Figura 74. Análisis de los estados apoptóticos y necróticos por citometría de flujo en hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 por efecto del resveratrol 10 μ M (B), frente a la población sincronizada no tratada (A).

Los resultados obtenidos con resveratrol en hHF-MSCs, son de interés para su aplicación en terapia celular, ya que, a la dosis adecuada de baja toxicidad para este tipo celular, podría utilizarse el resveratrol para conseguir una proliferación más alta, lo que reduciría la duración de los cultivos celulares necesarios para obtener el número mínimo de hHF-MSCs clínicamente necesarias y, por tanto, reduciría el periodo previo al tratamiento con estas células e incluso aportaría la ventaja de poder reducir los tiempos de experimentación con hHF-MSCs, al conseguir mayor número de células experimentales. Así mismo, se podría utilizar esta molécula para recuperar hHF-MSCs para la aplicación autóloga de estas células en pacientes de avanzada edad y en los que se observase una disminución de la proliferación celular por variabilidad asociada al donante.

4 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS PRODUCIDOS POR OSTEOBLASTOS DERIVADOS DE hHF-MSCs PARA INDUCIR EL POTENCIAL OSTEOGÉNICO *IN VITRO* DE LAS hHF-MSCs.

4.1 POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS PRODUCIDOS POR LAS hHF-MSCs.

4.1.1 Producción de medios condicionados durante la diferenciación osteogénica de las hHF-MSCs.

El empleo de medios condicionados producidos por osteoblastos derivados de MSCs diferenciadas *in vitro* puede ser de interés futuro en ensayos de terapia celular, y suponen una alternativa al reemplazo celular, tal y como se expone en la Introducción (apartado 2.5).

En la Figura 75 se representa el diseño experimental para la obtención de hHF-MSCs, tanto para la producción de medios condicionados durante la diferenciación osteogénica, como para el estudio de la capacidad de los medios condicionados producidos sobre el potencial osteogénico de las hHF-MSCs. Para poder comparar la capacidad de diversos medios condicionados para inducir la diferenciación osteogénica, todos los cultivos emplearon hHF-MSCs procedentes de un mismo donante (31 años; pases 10 a 14), con una densidad de siembra alta (12.500 – 20.000 células/cm²). Para los diferentes ensayos de diferenciación osteogénica se realizaron experimentos independientes utilizando diferentes cultivos para obtener al menos tres réplicas técnicas.

Todas las poblaciones celulares fueron expandidas con medio suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 30%, siguiendo los criterios expuestos en el apartado 1.5 de Resultados. Se expandieron los cultivos hasta alcanzar una confluencia igual o superior al 80%.

Como control negativo de la diferenciación se emplearon hHF-MSCs no inducidas a diferenciación osteogénica. La población control se mantuvo en un estado de deprivación moderado con medio de cultivo basal (BM) bajo en glucosa y suplementado con un 10% de suero FBS para facilitar su quiescencia, sin provocar la muerte celular durante los mismos días en los que tuvo lugar la diferenciación osteogénica de las poblaciones productoras de medios condicionados para el ensayo de la osteogénesis.

Los medios de inducción osteogénica empleados, así como el proceso llevado a cabo para la diferenciación, fueron específicos según el ensayo al que fueron destinados.

La mineralización de la matriz extracelular se observó tras la tinción de los depósitos de calcio con la tinción con Alizarin Red S. Los depósitos de calcio teñidos de rojo mediante este colorante se observaron a microscopía. El contenido relativo de calcio producido por los osteoblastos se solubilizó y se cuantificó tras la lectura de la densidad óptica a 405 nm (OD_{405}). El análisis del límite de cuantificación se realizó tras la obtención de una recta patrón tras la dilución seriada del colorante Alizarin Red S (Tabla 46; Figura 76).

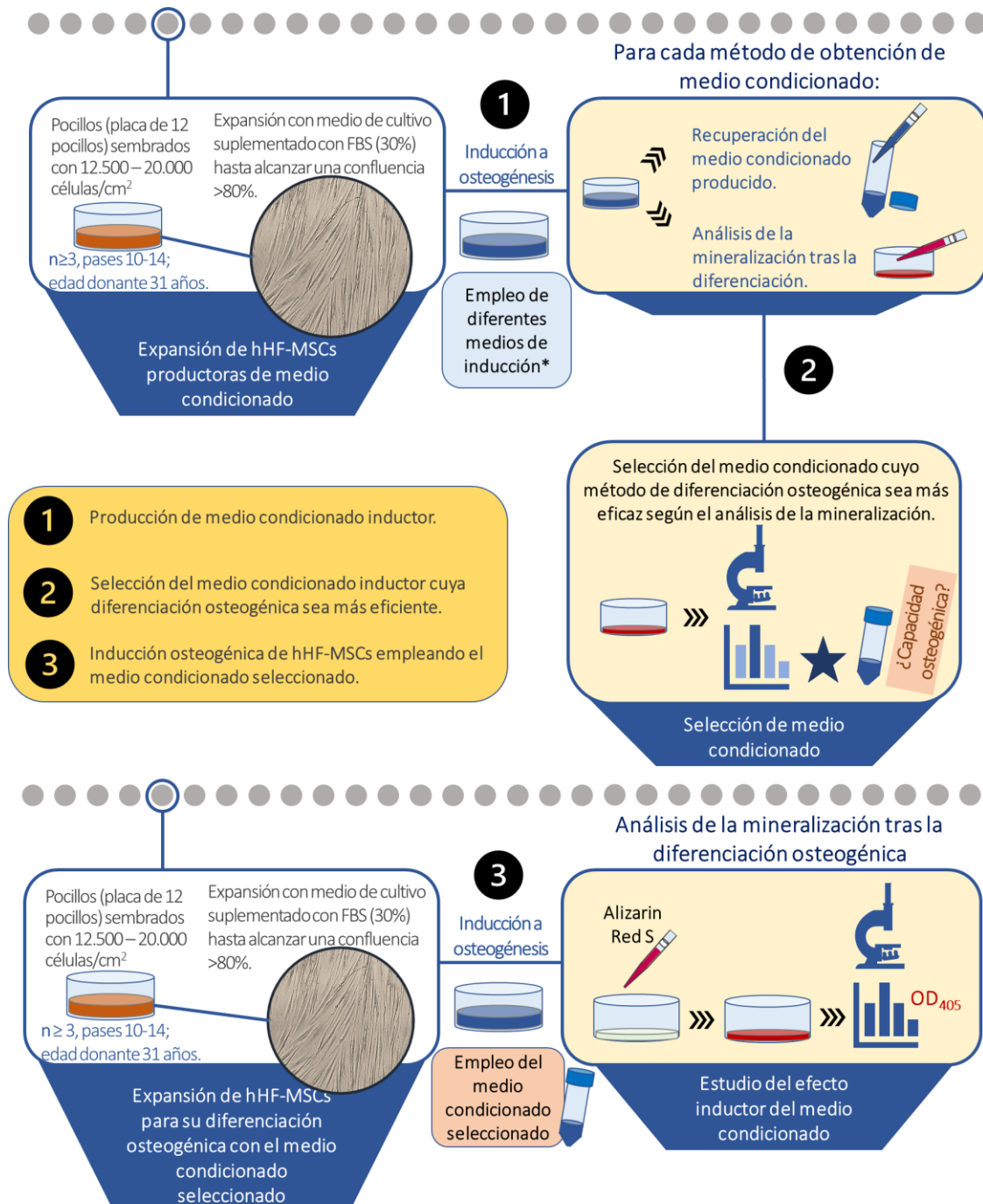


Figura 75. Expansión de hHF-MSCs para la obtención de medio inductor osteogénico (procesos 1 y 2) y para el estudio de su capacidad inductora (proceso 3). *Según el medio de inducción empleado se obtiene una cuantificación de la mineralización de la matriz extracelular tras la tinción con Alizarin Red S. Para la comparación de los resultados del empleo de diversos medios condicionados todos los cultivos emplearon hHF-MSCs procedentes de un mismo donante (31 años; en pases 10 a 14; densidad de siembra de 12.500 – 20.000 células/cm²; al menos tres réplicas técnicas).

Tabla 46. Lectura de OD₄₀₅ para la elaboración de una curva patrón para la cuantificación de la mineralización producida por las hHF-MSCs diferenciadas tras ser inducida su osteogénesis. Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% (I.C.).

	0 μM	0,25 μM	0,5 μM	1 μM	2 μM	4 μM
Promedio ± SD	0,03 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,53 ± 0,00	0,95 ± 0,01	1,6 ± 0,02
Mediana (Q1; Q3)	0,03 (0,03; 0,04)	0,19 (0,18; 0,19)	0,31 (0,31; 0,32)	0,53 (0,53; 0,53)	0,95 (0,94; 0,95)	1,60 (1,60; 1,60)
I.C. (95%)	(0,03; 0,04)	(0,18; 0,19)	(0,31; 0,32)	(0,53; 0,53)	(0,94; 0,95)	(1,60; 1,60)

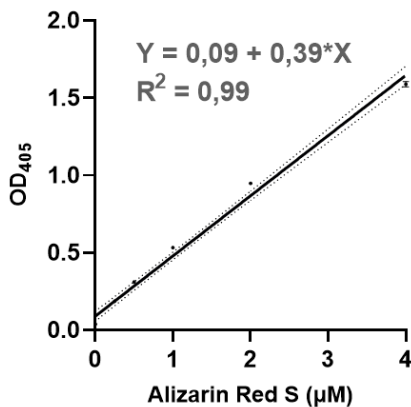


Figura 76. Recta de regresión obtenida a partir de los datos de la Tabla 46 para la cuantificación de los resultados de mineralización producida por las hHF-MSCs tras su inducción osteogénica mediante interpolación.

4.1.2 Selección de métodos de producción de medio condicionado eficaces para la inducción osteogénica de hHF-MSCs.

4.1.2.1 *Osteogénesis con medio condicionado producido por hHF-MSCs cada 3-4 días durante su diferenciación a osteoblastos.*

El objetivo de este ensayo de diferenciación fue analizar la capacidad de inducción osteogénica del medio condicionado CM producido cada 3-4 días por hHF-MSCs durante su proceso de diferenciación a osteoblastos (Figura 77).

La población productora del medio condicionado fue inducida a osteogénesis con medio de diferenciación comercial (OM). Cada 3-4 días, el medio condicionado producido por esta población se adicionó a otra población hHF-MSCs, tal y como se representa en los Procesos 1 y 2 de la Figura 77. La capacidad de inducir a osteogénesis del CM se analizó en hHF-MSCs expandidas para tal fin (Proceso 3 - Figura 77). Como control negativo se empleó medio basal bajo en glucosa y 10% de FBS.

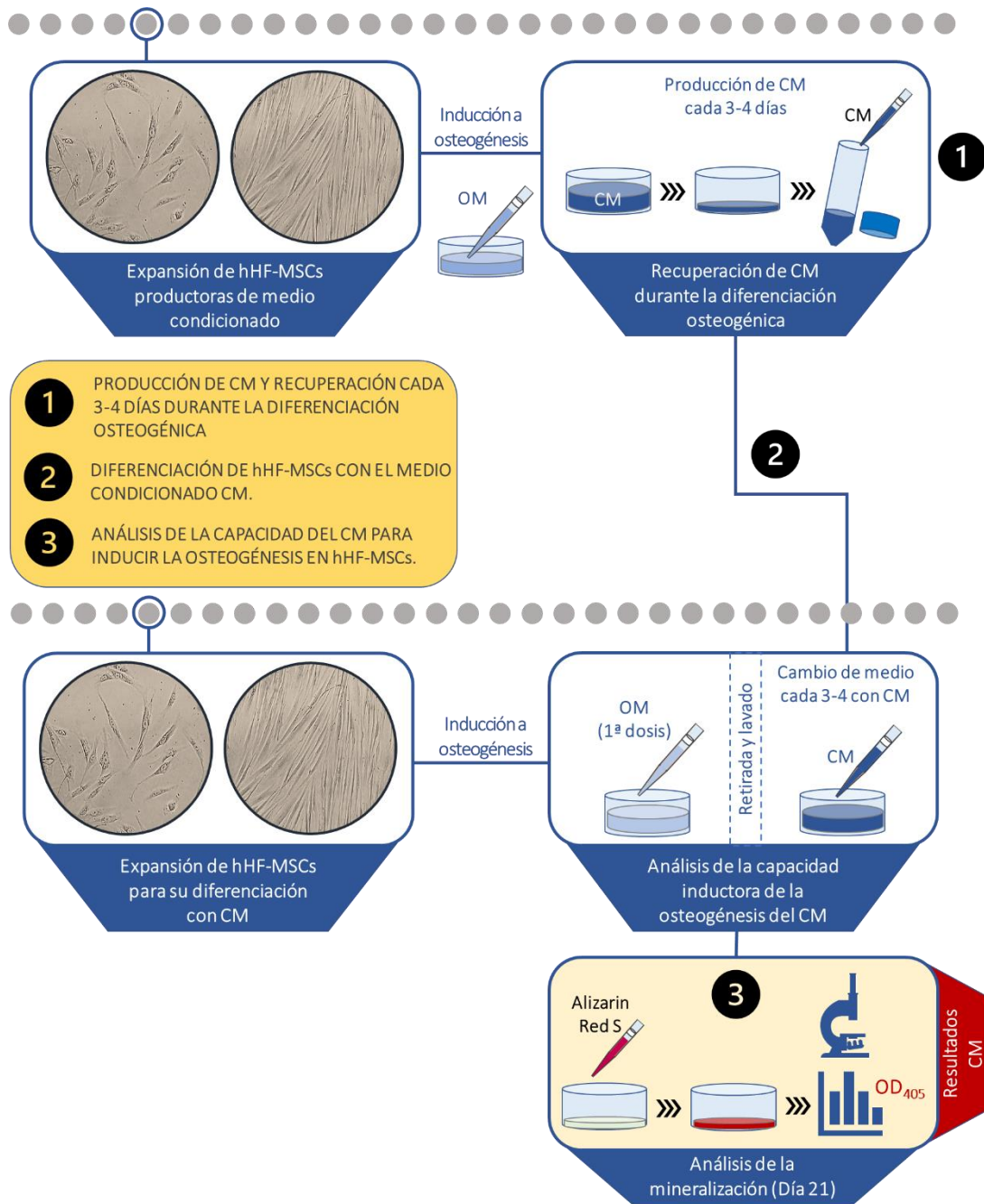


Figura 77. Diseño experimental para el análisis de la capacidad inductora de la osteogénesis del medio condicionado producido de forma progresiva por hHF-MSCs durante el proceso de formación de osteoblastos. CM: medio condicionado obtenido durante 3-4 días durante la osteogénesis en hHF-MSCs productoras; OM: medio inductor de la osteogénesis comercial. El control negativo de la diferenciación no está representado en esta Figura.

El potencial de osteogénesis mostrado por las hHF-MSCs tras la diferenciación durante 21 días con medio condicionado CM, obtenido cada 3-4 días de otra población hHF-MSC en proceso de diferenciación se observó tras la tinción con Alizarin Red S (Figura 83-B).

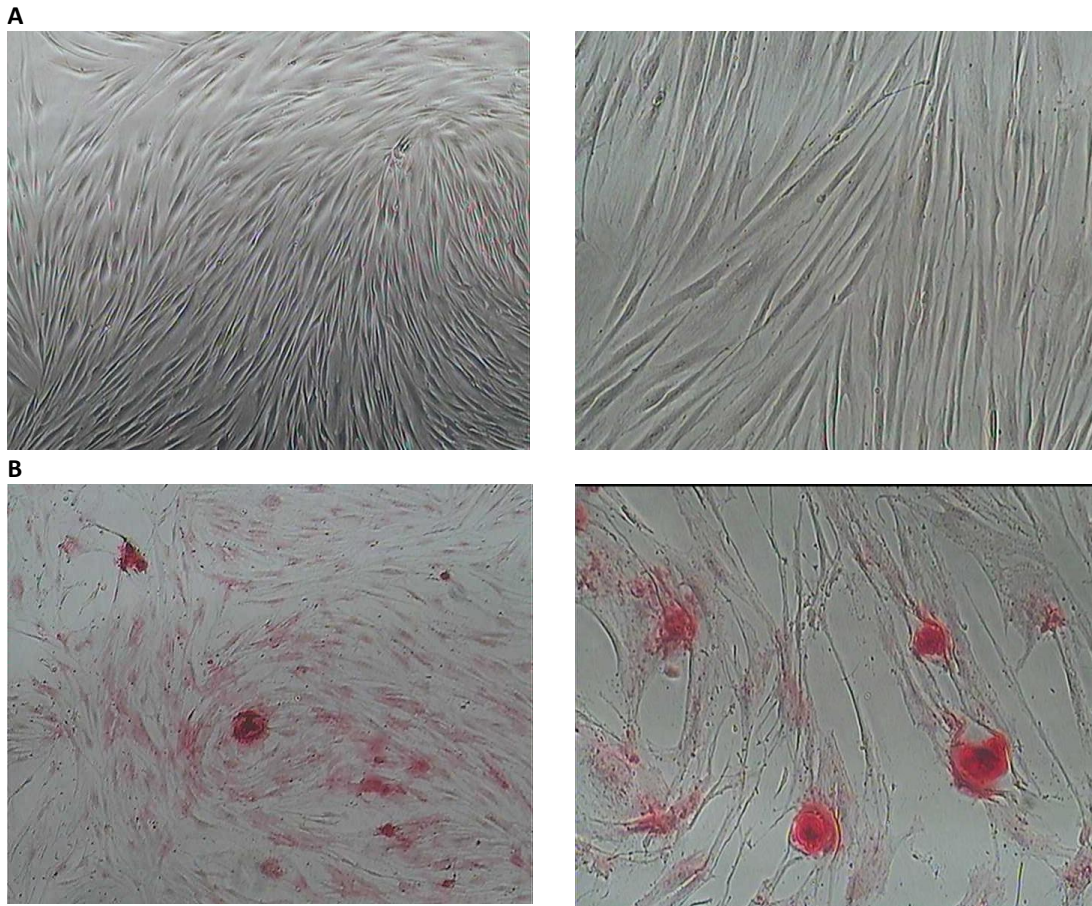


Figura 78. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio condicionado (CM) según el proceso de la Figura 77. Control: población no inducida a diferenciación. A-C) Imágenes obtenidas a microscopía tras la tinción con Alizarin Red (día 21): A) control negativo a 4X y 10X aumentos; B) población inducida con CM (4X y 10X). La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de 720 x 576 μm^2 .

El calcio producido por los osteoblastos se cuantificó tras la lectura de la densidad óptica a 405 nm mediante espectrofotometría. Los resultados mostraron una producción significativa de nódulos de calcio en la población hHF-MSC diferenciada con CM (0,10; con un intervalo de confianza del 95% de 0,07 a 0,14), frente a la población de hHF-MSCs sin diferenciar (0,02; I.C. del 95% de 0,01 a 0,03) (Tabla 47; Figura 79). Sin embargo, algunos de los valores de OD_{405} obtenidos se encuentran por debajo del límite de cuantificación ($OD_{405} = 0,10$), por lo que no pudo calcularse el límite inferior del intervalo de confianza del 95% para la mediana. No obstante, la cuantificación para la mediana fue de 23,91 μM y el límite superior del I.C. (95%) fue de 126,80 μM . La baja producción de mineralización y, por tanto, el bajo potencial osteogénico observado, pudo deberse a los lavados realizados durante los cambios de medio, y como consecuencia a la eliminación de factores de inducción, lo que parece indicar que al no mantenerse dichos factores en el medio esto puede afectar a su diferenciación. Asimismo, la producción de depósitos de calcio fue similar a la obtenida con medio de inducción comercial ($OD_{405} = 0,08$; I.C. de 0,07 a 0,10; datos obtenidos del apartado 2.4 de Resultados). Por tanto, el empleo de medio CM obtenido cada 3-4 días de forma progresiva durante la diferenciación de hHF-MSCs, aunque induce la osteogénesis en hHF-MSCs, no aumenta el potencial osteogénico de las mismas frente al medio de inducción comercial.

Tabla 47. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio condicionado CM obtenido cada 3-4 días (Proceso 2 de la Figura 77).

	Control negativo de diferenciación	hHF-MSCs diferenciadas con medio CM 3-4 días	p-valor
Promedio ± SD	0,02 ± 0,01	0,10 ± 0,03	1,000
Mediana (Q1; Q3)	0,02 (0,01; 0,03)	0,10 (0,07; 0,14)	
I.C. (95%)	(0,01; 0,03)	(0,07; 0,14)	

Cuantificación de la mineralización tras la tinción de los depósitos de calcio con Alizarin Red S: lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD_{405}). Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% (I.C.). **** $p < 0,0001$; test Mann-Whitney.

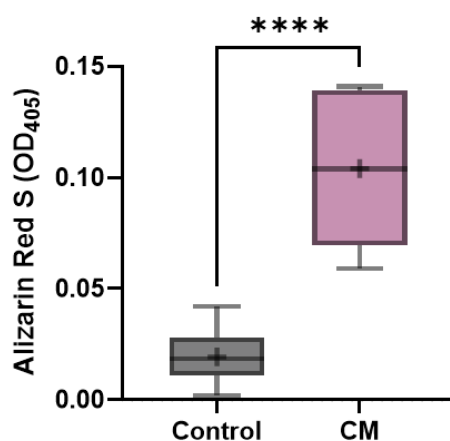


Figura 79. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio condicionado (CM) según el proceso de la Figura 77. Control: población no inducida a diferenciación. Lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD_{405}). El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (+), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Se observan diferencias estadísticamente significativas frente al control (**** $p < 0,0001$; test Mann-Whitney).

4.1.2.2 Osteogénesis con medio condicionado producido por hHF-MSCs tras su inducción osteogénica con una dosis única de medio inductor comercial.

El potencial osteogénico mostrado por las hHF-MSCs tras la diferenciación durante 21 días con medio condicionado, obtenido cada 3-4 días de otra población hHF-MSC en proceso de diferenciación, mostró un bajo potencial osteogénico, tal y como se expone en el subapartado anterior (4.1.2.1). Debido a que se llevó a cabo un proceso de retirada de medio condicionado en todos los cambios de medio realizados, se diseñó un nuevo ensayo (Figura 80) en el que tras la adición de la primera dosis de medio inductor osteogénico comercial (OM) no se llevó a cabo ni la retirada de medio condicionado ni la adición de medio fresco, es decir, este nuevo ensayo incluía una dosis única de medio inductor OM para analizar el efecto que tiene el medio condicionado producido por las hHF-MSCs durante los 21 días de diferenciación.

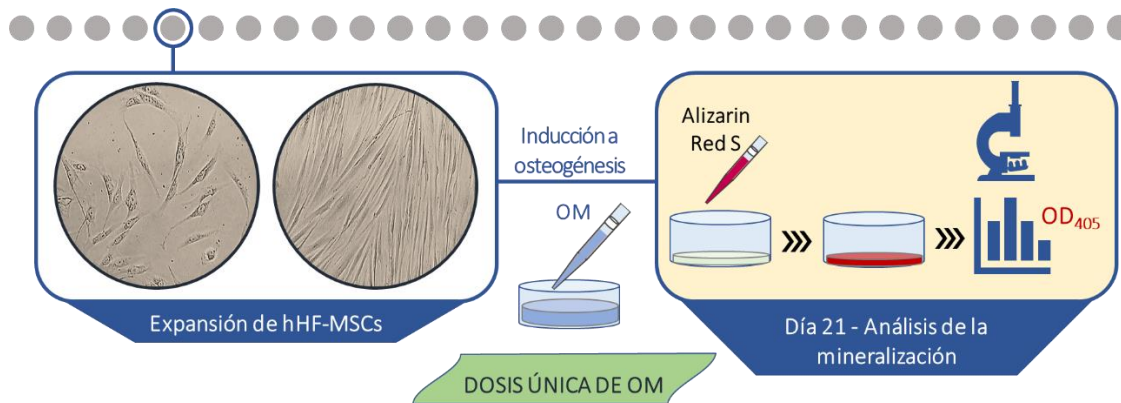


Figura 80. Diseño experimental para el análisis de la capacidad inductora de la osteogénesis del medio inductor osteogénico comercial (OM) tras la adición de una dosis única. El medio condicionado producido durante el proceso de diferenciación se concentra progresivamente ya que no hay cambios de medio ni adición de medio fresco. El control negativo de la diferenciación no está representado en la Figura.

En la Figura 80 se representa el diseño experimental para el análisis del potencial de inducción mostrado por las hHF-MSCs cuando se emplea una única dosis de medio inductor comercial OM. El empleo de una dosis única del medio inductor, y el mantenimiento del cultivo durante 21 días sin adicionar ningún medio, ni inductor ni basal, aumenta significativamente el potencial osteogénico de las hHF-MSCs (Tabla 48; Figura 77) a 0,21 OD₄₀₅ (con un intervalo de confianza del 95% de 0,20 a 0,22), es decir se cuantifica una concentración de depósitos de calcio de 306,84 μM. Este aumento en el potencial osteogénico de las hHF-MSCs puede estar relacionado con el mantenimiento del medio condicionado que producen las hHF-MSCs durante el proceso de diferenciación hasta el día 21.

Tabla 48. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio inductor comercial (OM).

	Control negativo de diferenciación	hHF-MSCs diferenciadas con dosis única de OM	p-valor
Promedio ± SD	0,02 ± 0,01	0,21 ± 0,02	< 0,0001
Mediana (Q1; Q3)	0,02 (0,01; 0,03)	0,21 (0,20; 0,22)	
I.C. (95%)	(0,01; 0,03)	(0,20; 0,22)	

Cuantificación de la mineralización tras la tinción de los depósitos de calcio con Alizarin Red S: lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD₄₀₅). Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% (I.C.); test Mann-Whitney.

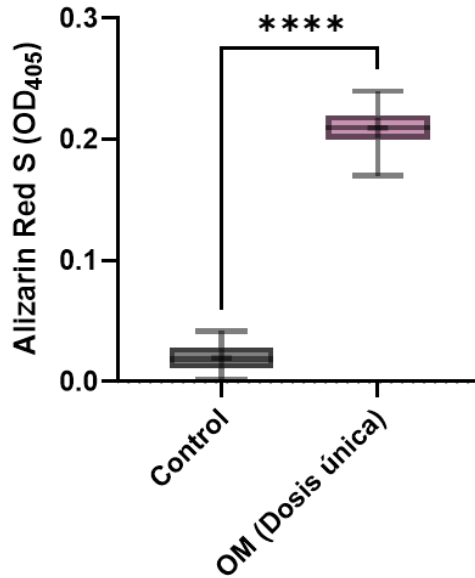


Figura 81. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con una dosis única de medio comercial (OM). Control (población no inducida a diferenciación). Lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD_{405}). El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (+), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Se observan diferencias estadísticamente significativas frente al control (**** $p < 0,0001$; test Mann-Whitney).

4.1.2.3 Osteogénesis con medio condicionado producido por hHF-MSCs durante su diferenciación a osteoblastos combinado con medio inductor comercial en proporción 1:1.

Con el objetivo de analizar si es posible aumentar el potencial osteogénico de las hHF-MSCs y, por tanto, conseguir una producción de factores de inducción osteogénica con capacidad para inducir a su vez la diferenciación osteogénica en poblaciones de hHF-MSCs, se llevó a cabo un ensayo de diferenciación en el que se mantuvo el medio condicionado producido durante los 21 días de diferenciación y se adicionó medio inductor comercial cada 7 días en una proporción del 50% (Figura 82). Por tanto, este ensayo de diferenciación osteogénica empleó una proporción 1:1 de medio condicionado producido durante el proceso de diferenciación combinado con medio inductor comercial (CM:OM=1:1). Todos los cultivos emplearon hHF-MSCs en pase 11-14 por triplicado y 9 réplicas técnicas.

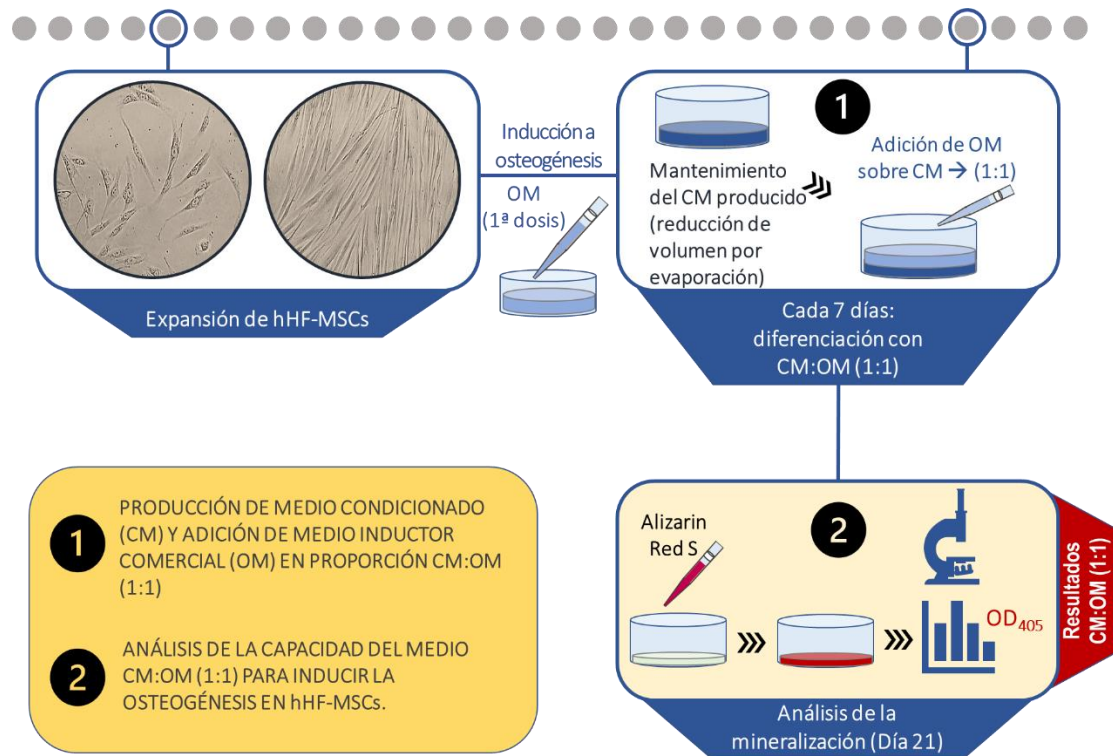
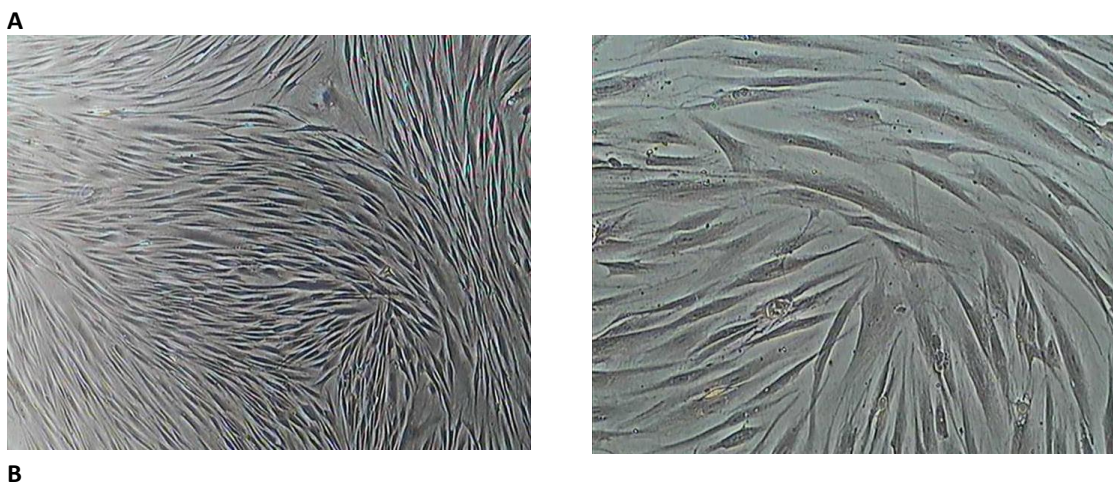


Figura 82. Diseño experimental del análisis de la capacidad del medio CM:OM (1:1) para potenciar la osteogénesis de las hHF-MSCs. Este medio emplea una proporción 1:1 de medio condicionado CM (producido por las hHF-MSCs durante su proceso de diferenciación) combinado con medio OM (medio inductor de la osteogénesis comercial) adicionado cada 7 días. El control negativo de la diferenciación no está representado en la Figura.

La tinción con Alizarin Red S mostró la presencia de depósitos de calcio en la población diferenciada, tras 21 días de diferenciación osteogénica, frente a la población control no diferenciada (Figura 82).



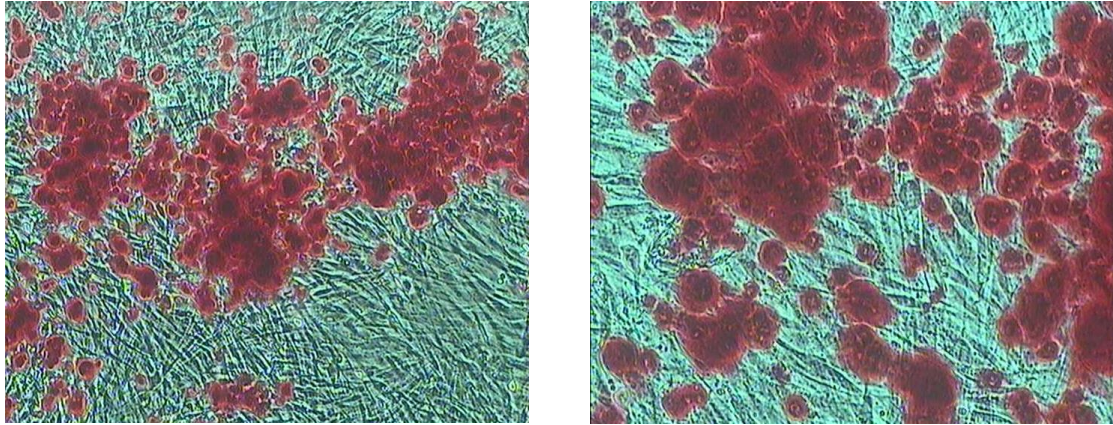


Figura 83. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio CM:OM (1:1) según el procedimiento de la Figura 81. Control (población no inducida a diferenciación). Imágenes obtenidas a microscopía tras la tinción con Alizarin Red S (A-B): A) control negativo a 4X y 10X aumentos; B) población inducida a diferenciación a 4X y 10X aumentos. La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de 720 x 576 μm^2 .

Los resultados del contenido de calcio, por la mineralización de la matriz de los osteoblastos, se ajustaron a una distribución normal tras el análisis de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de significación de Lilliefors y Shapiro-Wilk ($p=0,10$; $p>0,05$). El gráfico Q-Q *plot* se muestra en la Figura 84-A. El análisis de los resultados mostró una producción de depósitos de calcio (promedio de $\text{OD}_{405} \pm$ desviación estándar) de $0,26 \pm 0,03$ por las hHF-MSCs diferenciadas con CM:OM (1:1) significativamente más elevada que en la población control no diferenciada, que mostró valores de $0,02 \pm 0,01$ (Tabla 49; Figura 84-B). La cuantificación de la mineralización obtenida fue de $435,45 \text{ mM} \pm 72,02$. Este valor corrobora que el mantenimiento del medio condicionado producido por las hHF-MSCs durante el proceso de diferenciación, sumado a una adición de factores de inducción durante el proceso, aumenta el potencial osteogénico de las hHF-MSCs.

Tabla 49. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio CM:OM (1:1) según el procedimiento de la Figura 81. Cuantificación de la mineralización tras la tinción de los depósitos de calcio con Alizarin Red S: lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD_{405}). CM:OM (1:1): medio de inducción que combina medio condicionado (CM), obtenido por la propia población en proceso de diferenciación, con medio fresco de inducción osteogénica comercial (OM). Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (SD); *** $p>0,001$; t de *student*.

	Control negativo de diferenciación	hHF-MSCs diferenciadas con medio CM:OM (1:1)	p-valor
Promedio \pm SD	$0,02 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,03$	0,000

A

B

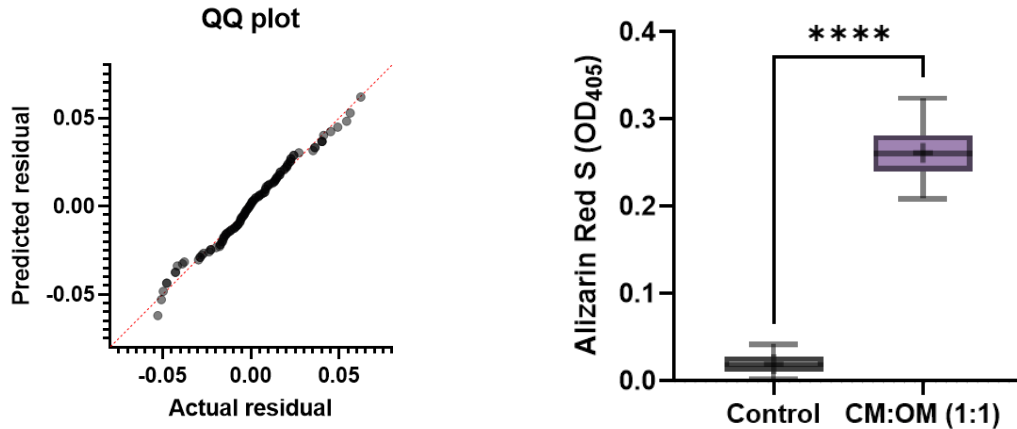


Figura 84. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio CM:OM (1:1). Control (población no inducida a diferenciación). Lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD₄₀₅): A) Gráfico Q-Q *plot*; B) El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (+), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Se observan diferencias estadísticamente significativas frente al control (**** $p < 0,0001$; prueba t de *student*).

El análisis de expresión del marcador *RUNX2* informó de forma orientativa sobre el estado de maduración de los osteoblastos obtenidos tras el proceso de diferenciación durante 21 días con medio condicionado combinado CM:OM (1:1).

El análisis qPCR mostró un incremento en la expresión de *RUNX2*, lo que parece indicar la presencia de osteoblastos inmaduros e intermedios. Asimismo, el aumento de expresión de otros marcadores de osteoprogenitores y osteoblastos, y el aumento de expresión de marcadores adipogénico y condrogénico, cuya expresión se incrementada bajo condiciones de inducción osteogénica (Tabla 50) parece confirmar la obtención de preosteoblastos y osteoblastos intermedios tras la diferenciación. No obstante, esta hipótesis solo la podemos comprobar tras la detección de la mineralización de la matriz celular tras la tinción con Alizarin Red S, ya que, para el ensayo de expresión, las réplicas celulares tuvieron que sumarse para poder realizar un ensayo más robusto. Al no disponer de más réplicas, no se pudo valorar el valor p. Por tanto, los resultados de la Tabla 50 son meramente orientativos y se muestran por la información adicional que aportan.

Seis de los dieciocho genes biomarcadores osteogénicos seleccionados en el estudio (Tabla 50) no mostraron un aumento en la expresión génica tras la diferenciación de las hHF-MSCs respecto a la población hHF-MSC sin diferenciar (*ANXA6*, *BMP2*, *CLTCL1*, *GNL3*, *IBSP* y *MEPE*). En contraste, cinco de los doce genes restantes mostraron un aumento de expresión robusto, en tres casos el aumento en la expresión fue de más de diez veces (*PPARGC1A*, *THY1* y *VCAM*).

Tabla 50. Expresión génica de biomarcadores osteogénicos tras la diferenciación osteogénica de las hHF-MSCs.

Gen	Marcador de estado de diferenciación	$\Delta\Delta Cq$	Expresión	Fold change ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)
<i>ANXA6</i>	Osteoprogenitor	0,79	-	0,58
<i>BMPR1A</i>	Osteoprogenitor	-0,89	Incremento	1,85
<i>BMPR1B</i>	Osteoblasto	-0,42	Incremento	1,33
<i>BMPR2</i>	Osteoblasto	0,96	-	0,52
<i>CLTCL1</i>	Osteoblasto	0,77	-	0,59
<i>DCN</i>	Condrogénico*	-0,99	Incremento	1,98
<i>DLK1</i>	Osteoblasto	-0,86	Incremento	1,82
<i>GNL3</i>	Osteoblasto	0,51	-	0,70
<i>IBSP</i>	Osteoprogenitor	1,45	-	0,37
<i>ICAM1</i>	Osteoblasto	-3,09	Incremento	8,52
<i>MCAM</i>	Osteoblasto	-1,37	Incremento	2,59
<i>MEPE</i>	Osteocito	1,10	-	0,47
<i>PPARGC1A</i>	Adipogénico*	-3,45	Incremento	10,93
<i>RUNX2</i>	Osteoprogenitor	-0,87	Incremento	1,83
<i>SP7</i>	Osteoprogenitor, osteoblasto	-0,95	Incremento	1,93
<i>TFRC</i>	Osteoblasto	-0,09	Incremento	1,06
<i>THY1</i>	*	-3,45	Incremento	10,94
<i>VCAM</i>	Osteoblasto	-3,41	Incremento	10,61

Los resultados del análisis de expresión fueron obtenidos en Bioaraba (*) La expresión se aumenta bajo condiciones de inducción osteogénica. La coloración de los marcadores se corresponde con la representada en la Figura 85 correspondiente a los diferentes estados de diferenciación celular.

La obtención de osteoblastos tras 21 días de diferenciación de la población hHF-MSC con medio condicionado CM:OM (1:1) parece indicar que el tiempo requerido para la obtención de osteoblastos a partir de hHF-MSCs es similar al tiempo requerido por MSCs procedentes de membrana coriónica y decidua (Figura 85); mientras que las MSCs procedentes de membrana amniótica y cordón umbilical requieren menos tiempo para la obtención de osteoblastos.

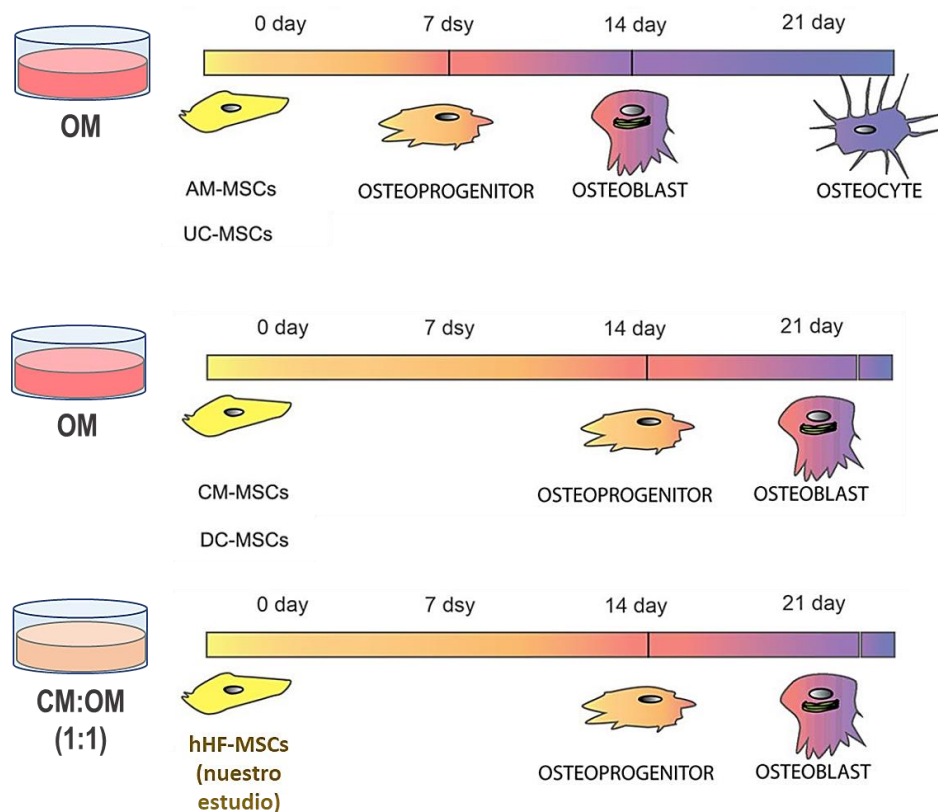


Figura 85. Comparación del potencial de diferenciación osteogénico de las hHF-MSCs (MSCs de folículo piloso humano) de nuestro estudio con otras MSCs humanas procedentes de membrana amniótica (AM-MSCs), cordón umbilical (UC-MSCs), membrana coriónica (CM-MSCs) y decidua (DC-MSCs) basado en qRT-PCR. Los resultados de las MSCs de origen distinto a hHF-MSCs y parte de la ilustración representada se han obtenido de Shen et al. (2019), quienes emplearon el mismo medio comercial (OM) sin adición de medio condicionado (CM). Las hHF-MSCs fueron inducidas empleando el medio combinado CM:OM = 1:1. CM: medio condicionado.

4.1.2.4 Selección del medio condicionado producido por osteoblastos derivados de hHF-MSCs para el estudio de su potencial de inducción osteogénico.

Como estrategia para dirigir e impulsar la diferenciación osteogénica mediante el empleo de medios condicionados obtenidos tras la diferenciación de hHF-MSCs hemos realizado diversos ensayos de diferenciación. Estos ensayos se exponen en los subapartados anteriores. La selección del medio condicionado producido por las hHF-MSCs más adecuado para inducir la diferenciación osteogénica de poblaciones hHF-MSCs procedentes del mismo nicho se realizó tras el análisis comparativo de la mineralización obtenida en los diferentes ensayos previamente descritos en la Tabla 51 se resumen los valores OD₄₀₅ obtenidos tras la tinción con Alizarin Red S tras 21 días de diferenciación.

Tabla 51. Comparación de la cuantificación del contenido de calcio producido por el medio condicionado obtenido tras la diferenciación osteogénica de hHF-MSCs según los ensayos de los apartados 4.1.2.1 a 4.1.2.3 de este apartado de Resultados.

A. OD ₄₀₅	hHF-MSCs diferenciadas con medio CM 3-4 días	hHF-MSCs diferenciadas con dosis única de OM	hHF-MSCs diferenciadas con medio CM:OM (1:1)
Promedio ± SD	0,10 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,26 ± 0,03

A. OD ₄₀₅	hHF-MSCs diferenciadas con medio CM 3-4 días	hHF-MSCs diferenciadas con dosis única de OM	hHF-MSCs diferenciadas con medio CM:OM (1:1)
Mediana	0,10	0,21	0,26
(Q1; Q3)	(0,07; 0,14)	(0,20; 0,22)	(0,24; 0,28)
I.C. (95%)	(0,07; 0,14)	(0,20; 0,22)	(0,26; 0,27)

B. Tabla de p-Valores	hHF-MSCs diferenciadas con medio CM 3-4 días	hHF-MSCs diferenciadas con dosis única de OM
hHF-MSCs diferenciadas con dosis única de OM	0,21	
hHF-MSCs diferenciadas con medio CM:OM (1:1)	0,000	0,000

Tinción con Alizarin Red S: lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD₄₀₅). CM (medio condicionado producido durante la diferenciación osteogénica); OM (medio de inducción osteogénica comercial). A) Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% (I.C.). B) Resultados de los p-valores de la comparación entre pares. Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni.

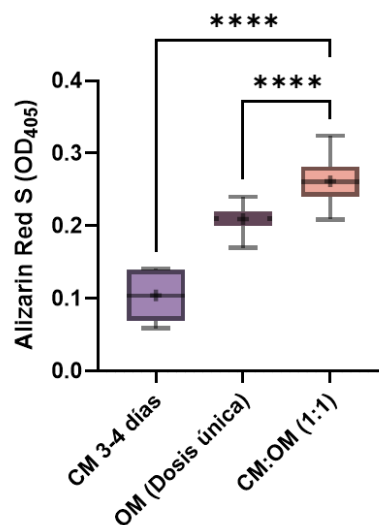


Figura 86. Comparación del potencial osteogénico de las hHF-MSCs según el empleo de medios condicionados producidos por el mismo tipo de población celular con diferentes procedimientos de ensayo (Figuras 72, 74 y 76). CM (medio condicionado obtenido durante la diferenciación osteogénica de hHF-MSCs); OM (medio de inducción comercial). Resultados obtenidos de las Tablas O2, O3, O4. El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (+), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Se observan diferencias estadísticamente significativas (**** $p < 0,0001$; prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni).

El empleo de la combinación CM:OM (1:1) muestra el mayor potencial inductor en la osteogénesis de las hHF-MSCs frente al resto de ensayos realizados (Tabla 51; Figura 86) cuando se emplea medio inductor comercial (OM) cada 3-4 días durante la diferenciación osteogénica de hHF-MSCs, y una dosis única de OM. El análisis de la comparación mostró un aumento significativo del potencial de inducción osteogénica en hHF-MSCs con la combinación de medio condicionado con medio comercial (I.C. del 95% 0,26 a 0,27), frente al resultado obtenido con una dosis única de medio inductor comercial OM (0,21, con un I.C. del 95% de 0,20 a 0,22) o con el empleo de medio condicionado recuperado cada 3-4 días durante la osteogénesis de hHF-MSCs productoras (0,10, con un I.C. del 95% de 0,07 a 0,14), tal y como se muestra en la Tabla 51 y en la Figura 86. La comparación se realizó con los valores de la mediana y cuartiles 1 y 3, debido a que las poblaciones inducidas con medios CM:OM 0:10 y 10:0 no mostraron una distribución

normal. Los resultados muestran que el mantenimiento del medio condicionado producido por las hHF-MSCs durante su diferenciación, junto con la adición de medio de inducción fresco cada 7 días provoca un aumento significativo del potencial osteogénico de las hHF-MSCs, probablemente por la mayor producción de osteoblastos. Asimismo, no se observan diferencias significativas entre el empleo de una dosis única de medio inductor de la osteogénesis comercial y el empleo de este mismo medio cada 3-4 días. No obstante, se observa una tendencia positiva cuando no se eliminan factores de inducción del medio.

Mediante el empleo de medio condicionado combinado CM:OM (1:1), tal y como se expone en el apartado anterior 4.1.2.3, se obtuvo una concentración de depósitos de calcio de 435,45 mM \pm 72,02. Para comprobar si el aumento de los días de diferenciación osteogénica mejora el proceso de diferenciación se realizó el mismo ensayo CM:OM (1:1), siguiendo el procedimiento de la Figura 85, durante 24 y 35 días de diferenciación y se procedió a analizar los resultados obtenidos (Tabla 52; Figura 81).

Tabla 52. Comparación de la cuantificación del contenido de calcio producido por el medio condicionado CM:OM (1:1) obtenido de hHF-MSCs tras su diferenciación osteogénica según el número de días de diferenciación.

A. OD ₄₀₅	21 días	24 días	35 días
Promedio \pm SD	0,26 \pm 0,03	0,40 \pm 0,03	0,44 \pm 0,07
Mediana (Q1; Q3)	0,26 (0,24; 0,28)	0,39 (0,38; 0,43)	0,48 (0,36; 0,49)
I.C. (95%)	(0,26; 0,27)	(0,37; 0,44)	(0,32; 0,49)

B. Tabla de p-Valores	21 días	24 días
24 días	0,000	
35 días	0,000	1,000

Tinción con Alizarin Red S: lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD₄₀₅). CM (medio condicionado producido durante la diferenciación osteogénica); OM (medio de inducción osteogénica comercial). A) Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3) e intervalo de confianza del 95% (I.C.). B) Resultados de los p-valores de la comparación entre pares. Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni.

A

B

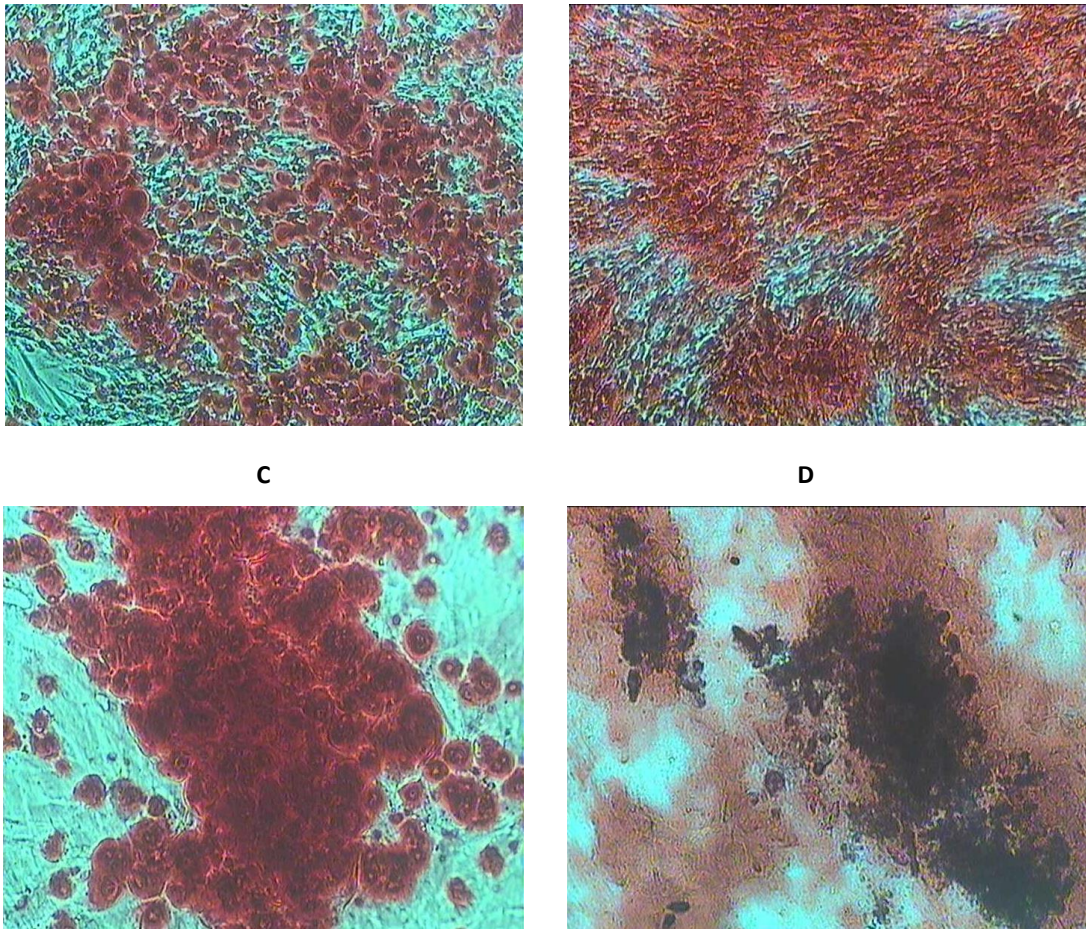


Figura 87. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio CM:OM (1:1) tras 21 días de diferenciación (A; 4X y C; 10X) y tras 35 días (B; 4X y D; 10X). La Figura D muestra una región con una mayor mineralización. Imágenes obtenidas a microscopía tras la tinción con Alizarin Red S. La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de 720 x 576 μm^2 .

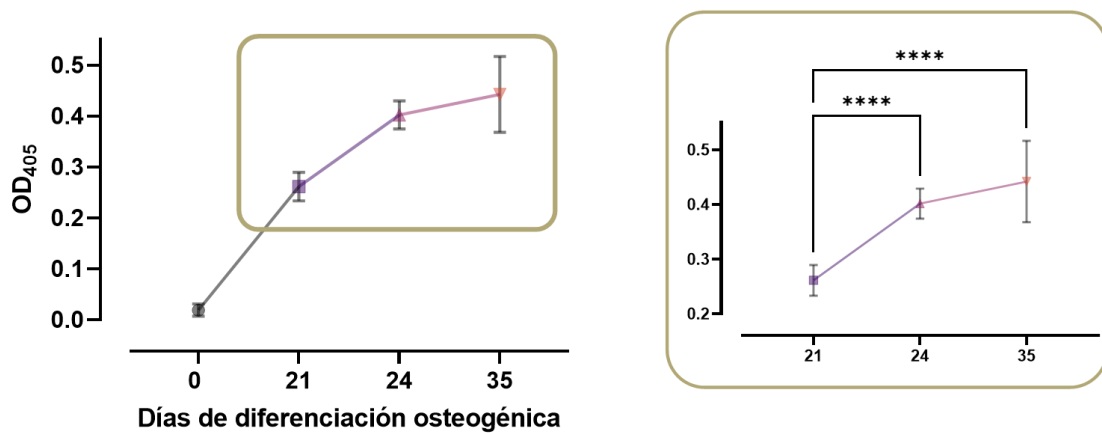


Figura 88. Potencial osteogénico de las hHF-MSCs según el número de días de diferenciación osteogénica con el medio condicionado combinado CM:OM (1:1). CM (medio condicionado obtenido durante la diferenciación osteogénica de hHF-MSCs); OM (medio de inducción comercial). El gráfico muestra la media y desviación estándar. Se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los días 21 y 35; **** $p < 0,0001$; prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni).

El análisis de la mineralización obtenida entre los días 24 y 35 de la diferenciación osteogénica no mostró diferencias significativas (Tabla 52; Figura 88). No obstante, el aumento de la duración de la diferenciación celular más allá de los 21 días produjo un aumento significativo en el potencial osteogénico de las hHF-MSCs. Tras 35 días de diferenciación osteogénica se observó un aumento significativo de 0,48 OD₄₀₅ (con un intervalo de confianza del 95% de 0,32 a 0,49). Asimismo, la cuantificación de contenido de calcio mostró por tanto un aumento en la concentración de 1.027,04 mM tras 35 días de diferenciación. Aunque la mayor mineralización se produce tras 35 días de diferenciación, tras 21 días se demuestra la obtención de osteoblastos a través de la detección de la mineralización de la matriz celular producida por los mismos.

4.1.3 Capacidad de inducción osteogénica del medio condicionado producido por osteoblastos derivados de hHF-MSCs.

Teniendo en cuenta que hay resultados que muestran que un medio condicionado derivado de osteoblastos al 30% y 50% estimula significativamente la diferenciación osteogénica en ratones (apartado 2.5.1.2 de la Introducción) y, teniendo en cuenta la producción altamente significativa de depósitos de calcio obtenida cuando se empleó medio combinado CM:OM (1:1) en la inducción de la osteogénesis de nuestras hHF-MSCs, se procedió a inducir la osteogénesis de hHF-MSCs con medio condicionado OB-CM al 40% (Figura 83).

El procedimiento para la obtención de medio condicionado OB-CM se representa en la Figura 88 y 83 (Proceso 1). Una vez obtenido el medio OB-CM se llevó a una concentración del 40% de este medio condicionado combinándolo con un 60% de medio basal no inductor de la diferenciación (OB-CM:BM=2:3) (Proceso 2 de la Figura 89). La población inducida a diferenciación se mantuvo durante 7 días sin realizar cambios de medio (población A). Para observar si el medio condicionado OB-CM era capaz de inducir por sí solo la osteogénesis se mantuvo otra población celular, que había seguido el mismo proceso de diferenciación que la población A (población B), durante otros 7 días con medio basal (BM) no inductor de la osteogénesis y se analizó la producción de depósitos de calcio en ambas poblaciones como indicador de la presencia de osteoblastos (Proceso 3 de la Figura 89). Todos los controles negativos de la diferenciación fueron cultivados con medio basal BM.

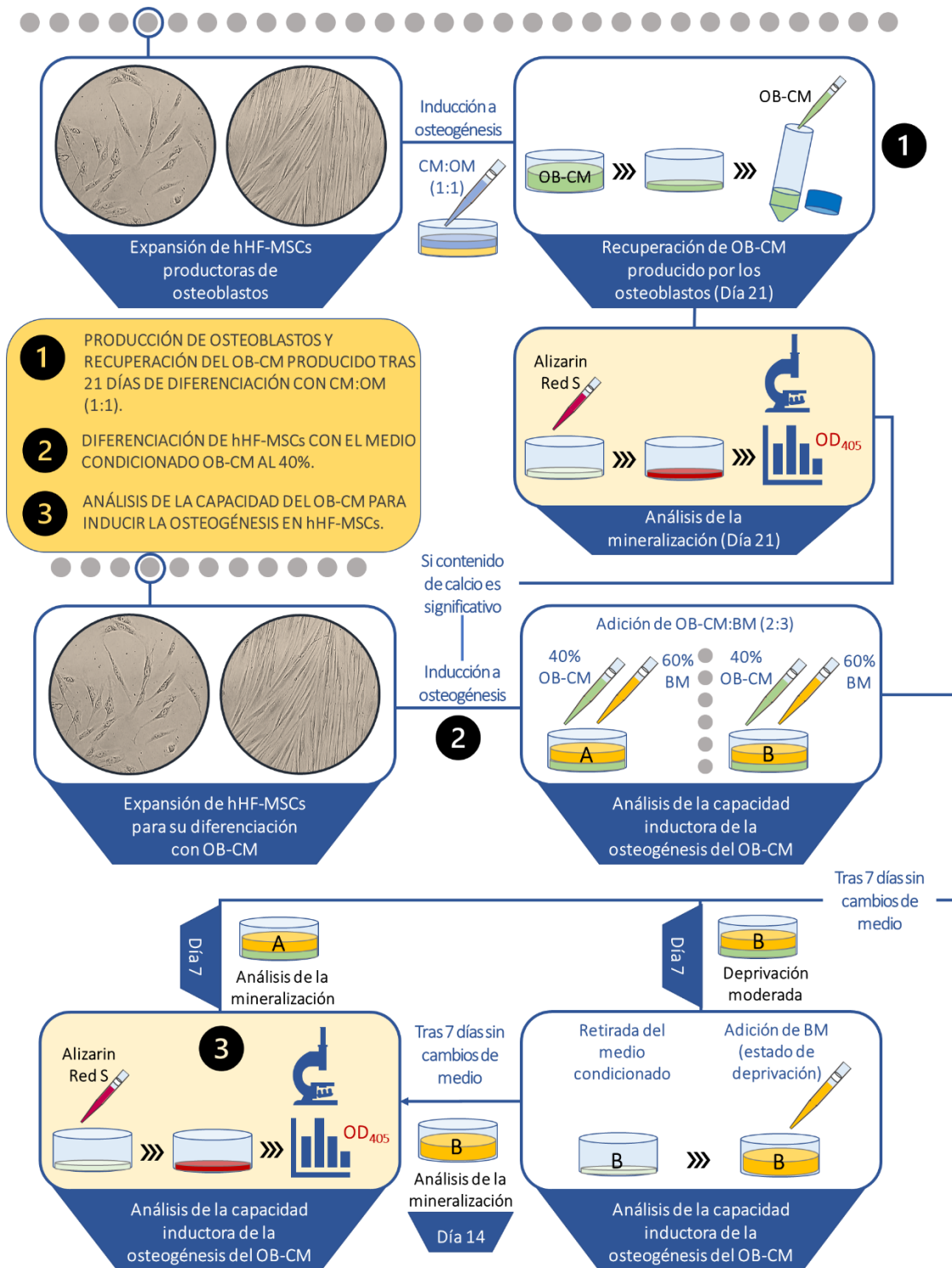


Figura 89. Análisis de la capacidad del medio condicionado OB-CM para inducir la osteogénesis en hHF-MSCs. OB-CM: medio condicionado producido por osteoblastos tras 21 días de diferenciación; BM: medio basal no inductor de osteogénesis. El Procedimiento 1 de inducción osteogénica emplea CM:OM (1:1) durante 21 días siguiendo el procedimiento de la Figura 88. Los controles negativos no están representados en la Figura.

Los resultados de la comprobación de la formación de osteoblastos productores de medio condicionado OB-CM se muestran en la Tabla 53 y en la Figura 90.

Tabla 53. Producción de osteoblastos para el empleo de su medio condicionado OB-CM en el proceso 2 de la Figura 88.

	Control negativo de diferenciación	hHF-MSCs inducidas con CM:OM (1:1)	p-valor
Promedio \pm SD	0,02 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02	0,000

Cuantificación de la mineralización tras la tinción de los depósitos de calcio con Alizarin Red S: lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD_{405}). CM:OM (1:1): hHF-MSCs productoras de osteoblastos que fueron diferenciadas según el procedimiento de la Figura 69. hHF-MSCs de un donante de 31 años (pases 11-14; por triplicado; experimentos independientes utilizando diferentes cultivos). A) Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (SD); los resultados siguen una distribución Normal (test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de significación de Lilliefors); *** $p > 0.001$; t de student.

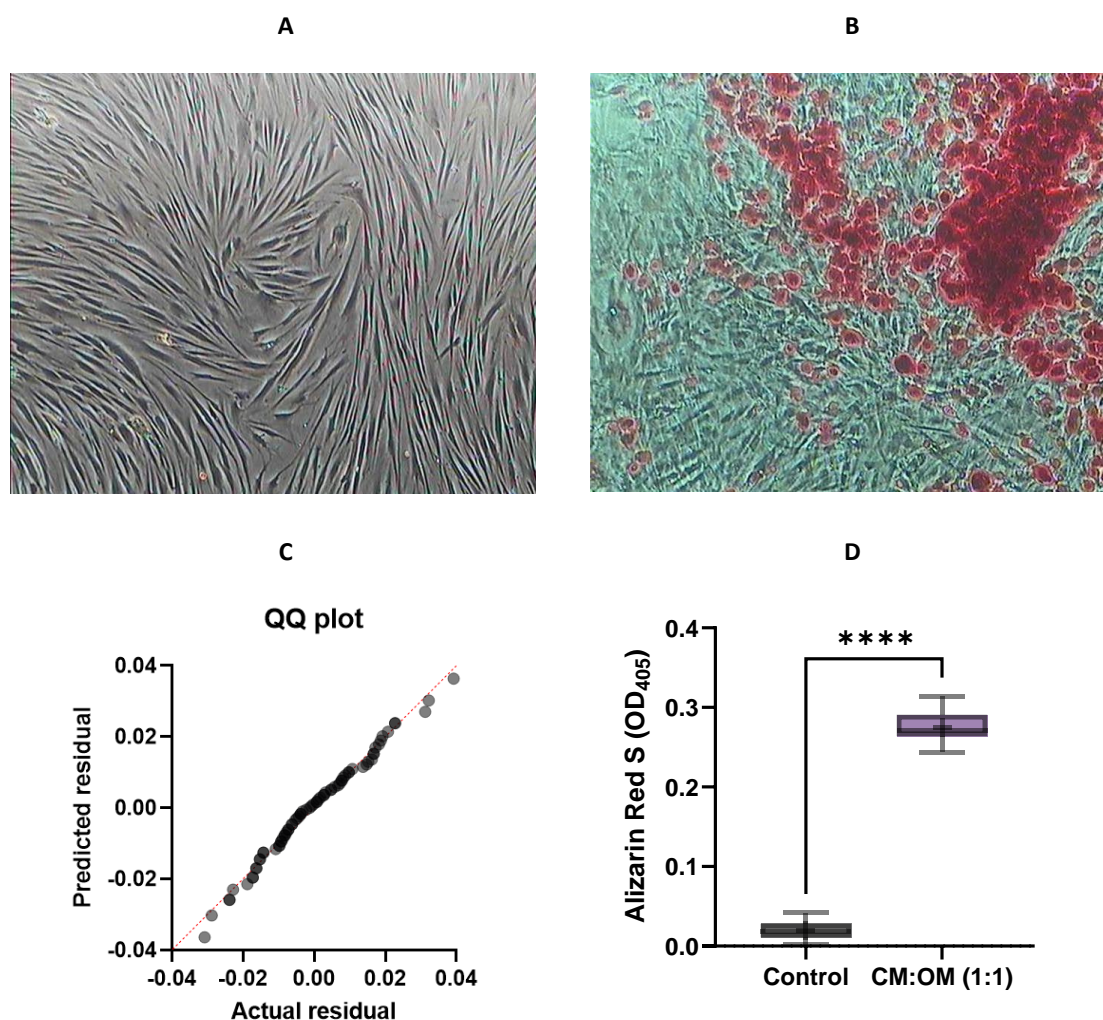


Figura 90. Producción de osteoblastos para el empleo de su medio condicionado OB-CM en el proceso 2 de la Figura 77. Resultados de la tinción con Alizarin Red tras 21 días de diferenciación osteogénica; Control (población no inducida a diferenciación); CM:OM (1:1): hHF-MSCs productoras de osteoblastos inducidas a diferenciación siguiendo el proceso representado en la Figura 88. Imágenes obtenidas a microscopía de contraste de fases a 4X aumentos (A-B): A) control negativo; B) población productora de OB-CM inducida a diferenciación con CM:OM = 1:1. La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de 720 x 576 μm^2 . Cuantificación de la mineralización de los osteoblastos productores del medio condicionado OB-CM (C-D): Los C) Gráfico Q-Q

plot; D) Lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD_{405}). El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (X), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Se observan diferencias estadísticamente significativas frente al control (***) $p < 0,001$; prueba t de *student*).

Tras la comprobación de la obtención de osteoblastos (Figura 90) se procedió a emplear el medio condicionado producido por éstos (OB-CM) para inducir la diferenciación de hHF-MSCs únicamente con este medio. Tras el empleo del medio OB-CM al 40% (OB-CM:BM=2:3) como dosis única se realizó la tinción con Alizarin Red S (Figura 91) tras 7 días de diferenciación (población A). Los resultados tras la lectura de la densidad óptica a 405 nm no mostraron diferencias significativas entre la población A del Proceso 2 (Figura 91) y el control negativo de la diferenciación (Tabla 54; Figura 91). Sin embargo, tras este periodo, y tras realizar un cambio de medio con BM (población B), se obtuvo un aumento significativo de depósitos de calcio (0,08; con un intervalo de confianza del 95% de 0,06 a 0,09) frente a la población control negativo y a la población A (0,02; con un I.C. del 95% de 0,00 a 0,03), poblaciones que no mostraron diferencias significativas entre sí, pese a que a microscopía se observó formación de nódulos de calcio, indicadora de la inducción a osteoblastos. Este potencial osteogénico para la obtención de osteoblastos en tan solo 14 días pudo deberse a una pre-inducción osteogénica con medio OB-CM al 40% durante los primeros 7 días que, probablemente provocó la diferenciación de las hHF-MSCs a osteoprogenitores y, en una pequeña proporción, a osteoblastos (tal y como puede observarse en la Figura 89-A). Al mantenerse este cultivo en privación durante los siguientes 7 días, la población hHF-MSC no pudo proliferar y, teniendo en cuenta que la diferenciación osteogénica había sido iniciada durante la primera semana, la continuación del proceso de diferenciación hacia osteoblastos fue probablemente debida a la autoinducción de los osteoprogenitores. En la Figura 91 puede observarse la presencia de depósitos de calcio en la población inducida (Figura 91-B), así como la cuantificación relativa de esta mineralización de la matriz extracelular (Figura 91-C).

Tabla 54. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio condicionado OB-CM al 40% (OB-CM:BM=2:3).

A. OD_{405}	Control negativo de diferenciación	Población A (Proceso 2 -Figura 88)	Población B (Proceso 2 - Figura 88)
Promedio \pm SD	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02
Mediana (Q1; Q3)	0,02 (0,01; 0,03) (0,01; 0,03)	0,02 (0,01; 0,03) (0,02; 0,03)	0,08 (0,06; 0,09) (0,10; 0,28)

B. Tabla de p-Valores	Control negativo de diferenciación	Población A (Proceso 2 - Figura 88)
Población A (Proceso 2 - Figura 88)	1,000	
Población B (Proceso 2 - Figura 88)	0,000	0,000

Cuantificación de la mineralización tras la tinción de los depósitos de calcio con Alizarin Red S: lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD_{405}). A) Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3). B) Resultados de los p-valores de la comparación entre pares. Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni.

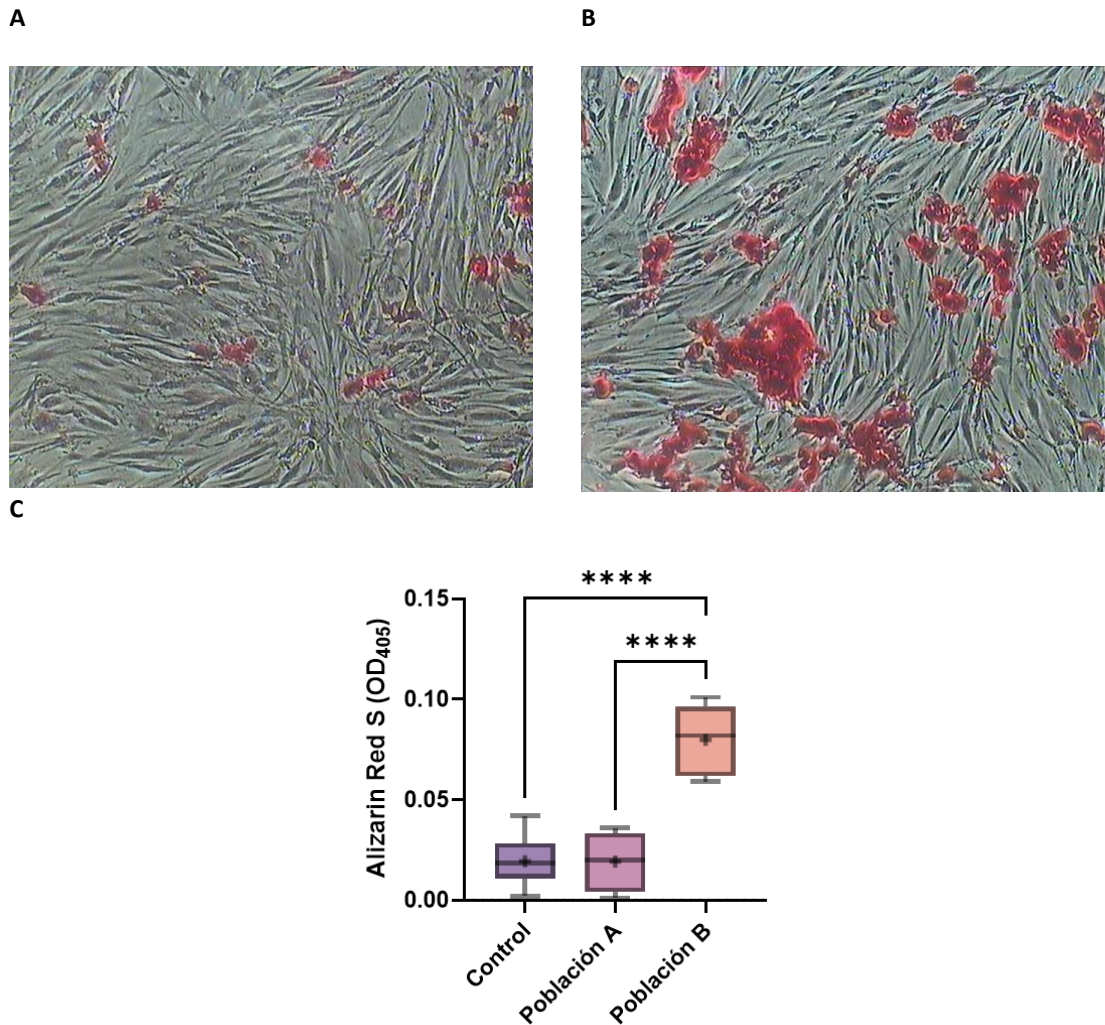


Figura 91. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio condicionado OB-CM al 40% (OB-CM:BM=2:3). Resultados de la tinción con Alizarin Red tras el proceso de diferenciación: Control (población no inducida a diferenciación). A-B) Imágenes obtenidas a microscopía de contraste de fases a 4X aumentos: A) población A inducida a diferenciación durante 7 días siguiendo el proceso 2 de la Figura 89; B) población inducida durante 14 días según el proceso 2 de la Figura 89. La dimensión de las imágenes adquiridas con cada uno de los objetivos es de $720 \times 576 \mu\text{m}^2$. C) Cuantificación de la mineralización de los osteoblastos tras la tinción de los depósitos de calcio con Alizarin Red S y lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD_{405}). El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (+), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Se observan diferencias estadísticamente significativas frente al control (**** $p < 0,0001$; prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni).

Las hHF-MSCs inducidas con OB-CM de 21 días al 40% (OB-CM:BM=2:3) mostraron la capacidad para producir células precursoras de osteoblastos en 7 días, tiempo similar al observado en MSCs de otros orígenes (Figura 92). MSCs derivadas de la membrana amniótica humana (hAM-MSCs) y del cordón umbilical (hUC-MSCs) mostraron a los 7 días la capacidad de formar células precursoras de osteoblastos (Shen et al., 2019), al igual que en el caso de las hHF-MSCs, ya que tras los 7 primeros días de diferenciación se mantuvo a la población celular bajo condiciones no inductoras de privación, mostrando el día 14 la producción significativa de depósitos de calcio y, por tanto, la obtención de osteoblastos. Asimismo, la presencia de nódulos de calcio (Figura 91-A), aunque no muestre diferencias

significativas con el control negativo de diferenciación, muestra el inicio de la producción de algunos osteoblastos, lo que confirma la obtención de osteoprogenitores durante los primeros 7 días.

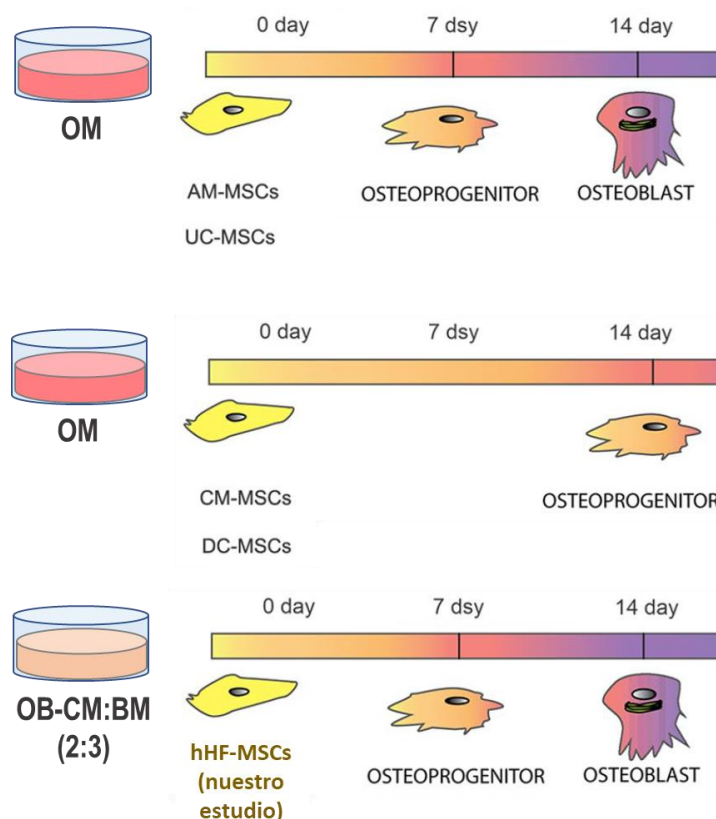


Figura 92. Comparación del potencial de las hHF-MSCs (MSCs de fólculo piloso humano) de nuestro estudio con otras MSCs humanas procedentes de membrana amniótica (AM-MSCs), cordón umbilical (UC-MSCs), membrana coriónica (CM-MSCs) y decidua (DC-MSCs) basado en qRT-PCR. Los resultados de las MSCs de origen distinto a hHF-MSCs y parte de la ilustración representada se han obtenido de Shen et al. (2019), quienes emplearon el mismo medio comercial (OM) sin adición de medio condicionado obtenido de osteoblastos (OB-CM). Las hHF-MSCs fueron inducidas empleando medio condicionado derivado de osteoblastos de 21 días en proporción OB-CM:BM = 2:3. CM: medio condicionado; BM: medio basal.

4.2 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA EN hHF-MSCs DE LOS MEDIOS DE INDUCCIÓN SEGÚN SU CONCENTRACIÓN.

Una menor concentración de los medios condicionados puede aumentar el potencial osteogénico de las hHF-MSCs, tal y como se expone en la Introducción (apartado 2.5.1.2). Por esta razón, se diseñó un ensayo que empleó una dosis única de medio inductor para favorecer el efecto de la secreción de medio condicionado durante la diferenciación osteogénica (Figura 93).

Los resultados mostraron un aumento similar de la mineralización de la matriz de los osteoblastos cuando se empleó una reducción de la concentración de OM (25%) durante 16 días, frente a la obtención de depósitos de calcio tras la diferenciación de las hHF-MSCs con medio OM a 100% tras 21 días de diferenciación (Tabla 55; Figura 88). Por tanto, y tal y como se esperaba, la reducción en el porcentaje de

medio de inducción osteogénica aumenta el potencial osteogénico de las hHF-MSCs y reduce el tiempo de obtención de osteoblastos.

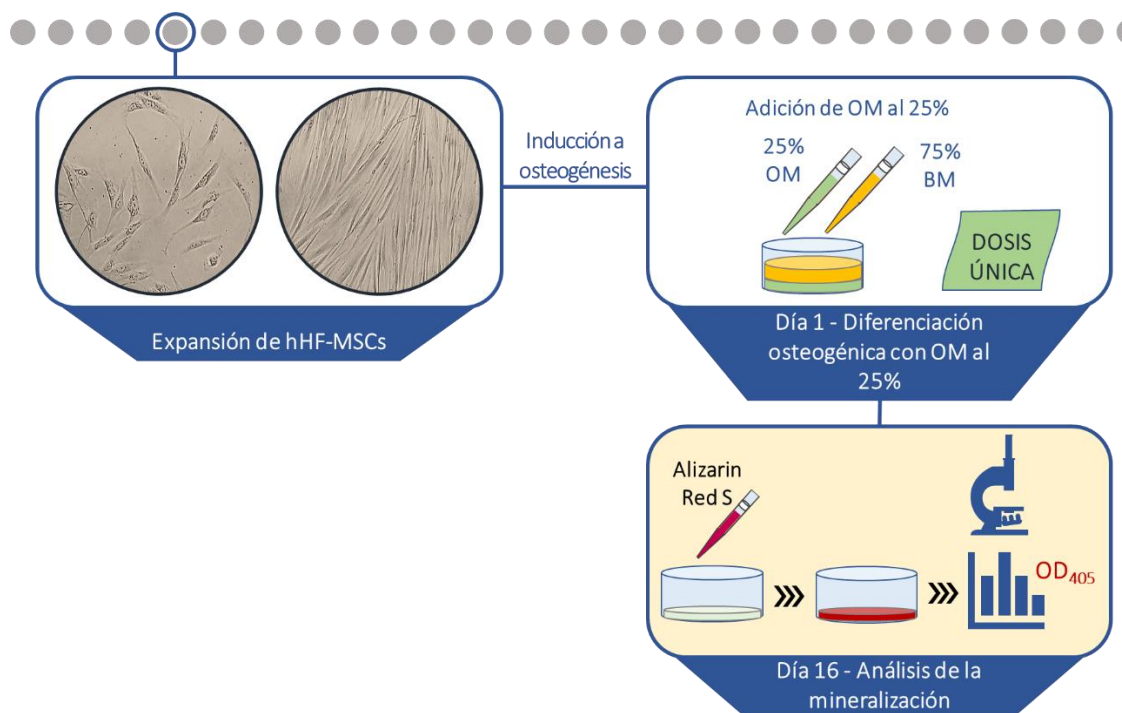


Figura 93. Diseño experimental del análisis de la capacidad de la adición de una dosis única de medio OM al 25% para potenciar la osteogénesis de las hHF-MSCs. Para obtener un 25% de concentración se añade medio basal bajo en glucosa (BM) en una proporción OM:BM = 2:3. Duración del proceso de diferenciación a osteoblastos: 16 días. Como control negativo se emplean hHF-MSCs no inducidas a diferenciación (no representado en la Figura).

Tabla 55. Osteogénesis de hHF-MSCs inducida con medio inductor comercial (OM) al 25%.

A. OD ₄₀₅	Control negativo de diferenciación	OM (100%) 21 días	OM (25%) 16 días
Promedio ± SD	0,02 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,27 ± 0,00
Mediana (Q1; Q3)	0,02 (0,01; 0,03) (0,01; 0,03)	0,21 (0,20; 0,22) (0,20; 0,22)	0,27 (0,27; 0,27) (0,27; 0,27)

B. Tabla de p-Valores	Control negativo de diferenciación	OM (100%) 21 días
OM (25%) 16 días	0,000	
OM (100%) 21 días	0,000	0,183

Cuantificación de la mineralización tras la tinción de los depósitos de calcio con Alizarin Red S: lectura de la densidad óptica de las muestras a 405 nm (OD₄₀₅). A) Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD) y como mediana (cuartil 1; cuartil 3). B) Resultados de los p-valores de la comparación entre pares. Prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni.

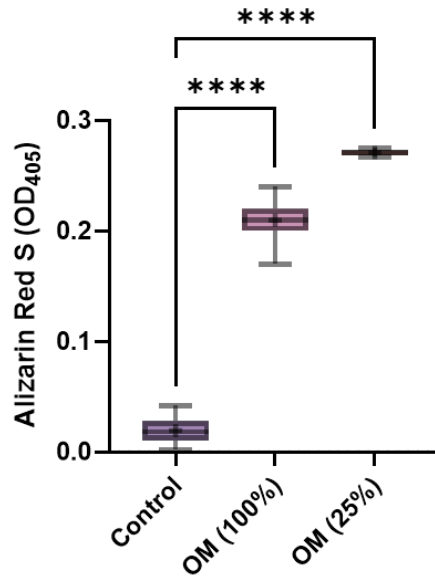


Figura 88. AQUÍ HABLAMOS DE LA CUANTIFICACIÓN TRAS la adición de una dosis única de medio OM al 25% para potenciar la osteogénesis de las hHF-MSCs (16 días) frente al empleo de OM al 100% (21 días). Para obtener un 25% de concentración se añade medio basal bajo en glucosa (BM) en una proporción OM:BM = 2:3. Como control negativo se emplean hHF-MSCs no inducidas a diferenciación. El gráfico de cajas y bigotes muestra la media (+), la mediana (segmento que divide la caja en dos partes), el primer y tercer cuartil (extremos inferior y superior de la caja, respectivamente); así como los valores mínimos y máximos (valores extremos de los bigotes). Se observan diferencias estadísticamente significativas frente al control (***) $p < 0,0001$; prueba de Kruskal-Wallis; comparación *post hoc* por parejas aplicando la corrección del valor p según Bonferroni).

V. DISCUSIÓN

Las células madre mesenquimales del folículo piloso de la región occipital del cuero cabelludo (hHF-MSCs) tienen un gran interés en terapia celular por su potencial regenerativo, no solo para generar folículos pilosos, sino también para la regeneración de células mesodérmicas, neuronales, vasculares y epiteliales, y por sus aplicaciones clínicas en la cicatrización de heridas sin la generación de procesos fibróticos, entre otros.

El presente trabajo muestra el desarrollo de una metodología que simplifica el proceso de migración de MSCs desde el compartimento mesenquimal del folículo piloso hasta la superficie del frasco de cultivo y el enriquecimiento de esta población celular mediante el empleo de lisados de plaquetas humanas comerciales, a una concentración más alta de lo habitual en cultivos celulares, y mediante el empleo de densidades de siembra adecuadas para favorecer su proliferación, lo que facilita la obtención de cultivos proliferativos en un mayor rango de edad en los donantes y su futuro uso en terapia celular.

El folículo piloso es una fuente fácilmente accesible de MSCs. La población hHF-MSC contienen MSCs de la región peribulbar, células de la papila dérmica y de la vaina dérmica del folículo piloso que han sido caracterizadas fenotípica y funcionalmente en este trabajo. La obtención eficaz de hHF-MSC a partir de explantes de folículo piloso y su proliferación óptima en cultivo dependen de la edad del donante, del empleo de sueros ricos en plaquetas, frente a sueros heterólogos no estandarizados, y del empleo de densidades de siembra que favorezcan su proliferación. Los resultados del estudio de la capacidad de duplicación de la población y la obtención de cultivos proliferativos y no proliferativos han permitido el desarrollo de modelos estadísticos predictivos que, teniendo en cuenta estos factores, contribuyen a la optimización de la obtención de hHF-MSCs desde el explante de folículo piloso hasta el quinto pase.

El análisis de la capacidad proliferativa de las hHF-MSCs ha mostrado su adecuación para futuros ensayos de terapia celular que emplean la técnica de reemplazo celular. Asimismo, la demostración de la capacidad de las hHF-MSCs para generar medios condicionados inductores de la osteogénesis ha hecho posible el diseño de una metodología que puede emplearse en ensayos de terapia regenerativa, como alternativa al reemplazo celular.

1 La metodología de migración y enriquecimiento favorece la proliferación de hHF-MSCs de folículo piloso humano.

La población de células madre mesenquimales del folículo piloso humano de la región occipital del cuero cabelludo (hHF-MSCs) se localiza en el compartimento mesenquimal y está formada por células madre dérmicas de la región peribulbar, células de la papila dérmica y células de la vaina dérmica del folículo piloso (Hoogdjuin et al., 2006; Rahmani et al., 2014; Agabalyan et al., 2017).

Hemos empleado una metodología de aislamiento de las hHF-MSCs que ha consistido en el uso directo de los explantes de folículos pilosos, tras una ligera disección a la lupa microscópica, sin utilizar microdisección al microscopio o disgregación enzimática, lo que simplifica el procedimiento y ha mostrado

que permite la migración y expansión celular desde el explante del folículo piloso hasta la superficie sin revestimiento del frasco de cultivo con medio de cultivo basal suplementado con lisado de plaquetas humano comercial.

Durante el cultivo primario, alrededor de un 40% de los explantes se desprendió de la superficie del frasco de cultivo en alguna ocasión. Sin embargo, esta incidencia también fue observada por Vasyliov et al. (2017), quienes destacaron que el 16% de los explantes de folículo piloso se desprendían de la superficie, pese a que emplearon colágeno como sustrato. A pesar de ello, las células que se aislaron de los explantes de folículo piloso de la región occipital de 12 donantes de edades entre los 21 y los 47 años mostraron la capacidad para migrar fuera del explante primario. Esta capacidad de migración es característica de las células madre y de los progenitores (Kessler et al., 2014). Gracias a esta propiedad, las hHF-MSCs se expandieron por la superficie del frasco de cultivo y mostraron la capacidad de adherirse a la superficie sin revestimiento del frasco de cultivo; uno de los criterios mínimos propuestos por la ISCT para la definición de población MSC (Dominici et al., 2006). La adhesión celular a la superficie de cultivo no fue inmediata, debido a que, antes de la adhesión, las células deben secretar proteínas de la matriz extracelular y proteoglicanos (Vargas, 2016).

El lisado de plaquetas humano, que favoreció la expansión de las células adherentes durante el cultivo primario y los sucesivos pases, contiene factores de crecimiento que favorecen el aislamiento y expansión de hHF-MSCs (González et al., 2017). Estos sueros ricos en plaquetas contienen al menos seis de los principales factores de crecimiento, incluyendo FGF2, PDGF, VEGF, EGF, TGF- β e IGF-1 (Gentile et al., 2019); entre ellos el factor de crecimiento FGF2 favorece la migración y expansión en cultivo de las células de la papila dérmica (González et al., 2017; Wang et al., 2020) y posee una amplia actividad mitogénica, además de favorecer su potencial de diferenciación neuronal en cultivo (Toma et al., 2001; Agabalyan et al., 2017). Esta capacidad de diferenciación neurogénica, característica de las células de la papila dérmica con origen en la cresta neural, también se ha mostrado en células de la papila dérmica con origen en el mesodermo (Jinno et al., 2010), tal es el caso de la papila dérmica de este trabajo, ya que los folículos pilosos proceden de la región occipital del cuero cabelludo. El factor PDGF aumenta la proliferación de las células de la papila dérmica y de las células madre dérmicas del folículo piloso (González et al., 2017), mientras que el factor de crecimiento EGF estimula el crecimiento *in vitro* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

El número de células totales obtenido tras el cultivo primario ($5,53 \times 10^4$ células totales) fue similar al obtenido por Bajpai et al. (2012), quienes realizaron una digestión enzimática para favorecer el aislamiento de células de la papila dérmica. Teniendo en cuenta los datos de Bajpai et al. (2012), según los cuales cada folículo piloso puede dar lugar a aproximadamente $5,00 \times 10^4$ MSCs durante dos semanas de cultivo, la comparación resultó favorable en cuanto al número de células totales obtenidas mediante la metodología de obtención de hHF-MSCs empleada en este trabajo. Sin embargo, la duración del cultivo primario necesaria para el aislamiento y expansión de las hHF-MSCs de nuestro estudio fue superior a la

mostrada por Bajpai et al. (2012). No obstante, durante el primer pase se observó una alta duplicación de la población, con un valor de 4,73 para la mediana (intervalo de confianza del 95% de 3,93 a 5,15).

Los cultivos primarios son poco estables, ya que las células se están modificando continuamente para adaptarse y, durante la expansión de los primeros pases hasta alcanzar al menos el tercer pase, tiene lugar la selección de los tipos celulares con mayor capacidad de proliferación y se alcanzan poblaciones más homogéneas (Vargas et al., 2016).

En contraste con otras metodologías más complicadas y laboriosas, hemos desarrollado una metodología de migración y enriquecimiento en hHF-MSCs que favorece la obtención de una cantidad de células por folículo similar a la obtenida con otros métodos, sin requerir microdisecciones específicas de regiones mesenquimales específicas y/o procesos de digestión enzimática, lo que además reduce la manipulación del compartimento mesenquimal del folículo piloso. Asimismo, esta metodología proporciona una alta cantidad de células que permite continuar su expansión tras el cultivo primario y alcanzar un número suficiente para proceder a su criopreservación, caracterización fenotípica y funcional, análisis de su potencial multipotente y otros ensayos diseñados a obtener medios condicionados inductores de la osteogénesis como alternativa al reemplazo celular; así como para analizar su capacidad proliferativa y adecuación para futuros ensayos en terapia celular. Sin embargo, hay que tomar en consideración el hecho de que otras poblaciones celulares, que se encuentran también en nichos asociados al folículo piloso y tejidos circundantes, no retirados ni digeridos enzimáticamente, podrían ser aisladas conjuntamente con las hHF-MSCs, ya que el lisado de plaquetas humano también aporta factores de crecimiento que permiten la proliferación de otros tipos celulares diferentes de MSCs (Taylor et al., 2014). Para conseguir el enriquecimiento en hHF-MSC se empleó el lisado de plaquetas humano al 30%, ya que habitualmente se emplean porcentajes del 10-20% de suero para el aislamiento y expansión de estas poblaciones celulares, ya que el empleo de suero heterólogo humano al 30% demostró un aislamiento y proliferación más eficiente de hHF-MSCs según datos previos obtenidos por el Grupo BIOMICs (UPV/EHU).

2 La edad del donante de folículo piloso y otros factores relativos a las condiciones de cultivo afectan a la obtención de hHF-MSCs.

La generación de una metodología de enriquecimiento en hHF-MSCs optimizada podría facilitar la producción de un mayor número de células con una óptima capacidad de duplicación y, en un futuro, la generación de hHF-MSCs como productos de terapia celular que exhiban de manera consistente y robusta el rango deseado de propiedades terapéuticamente significativas. Para conocer el efecto de diversos factores, tales como la edad, hemos estudiado la proliferación celular a partir de explantes de donantes de distintas edades y medios suplementados con suero heterólogo (HS) frente a lisados de plaquetas humanas comerciales (HPL) durante el cultivo primario y primer pase, así como el del efecto de la edad del donante y la densidad de siembra celular empleada en los sucesivos pases tras el cultivo primario y hasta el quinto pase.

Para valorar si el empleo de suero heterólogo, como suplemento al medio basal de cultivo, aumenta la eficiencia del aislamiento y proliferación celular de las hH-MFSCs, frente a la suplementación con HPL, comparamos el efecto de ambos sueros durante el cultivo primario y primer pase. Aunque la obtención de hH-MFSCs viables no mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto al uso de ambos tipos de suero, con el empleo de HPL se observó una menor dispersión de los datos respecto a HS, debido probablemente a que los sueros comerciales están más estandarizados, por lo que ofrecen resultados menos variables. Asimismo, se observó que el suero HPL mostró una eficiencia significativamente mayor para promover la proliferación de las hH-MFSCs durante el primer pase tras el cultivo primario.

No obstante, ambos sueros promovieron cultivos con una reducida expansión celular, con baja confluencia celular, inferior al 25% (densidad celular de alrededor de 1.500 células viables/cm²), e incluso la pérdida del cultivo. Asimismo, se observó una tendencia en la disminución de la eficacia en la obtención de cultivos proliferativos conforme aumentaba la edad del donante, tanto en hHF-MSCs expandidas con suero heterólogo como con lisado de plaquetas humano comercial.

Con el objetivo de estudiar si la escasa capacidad de proliferación de los cultivos primarios y en primer pase se debe a la edad del donante y/o al suero empleado como suplemente al medio basal de cultivo y, por tanto, si ambos factores son variables explicativas de la reducida eficacia para favorecer la obtención de hHF-MSCs tras el cultivo primario y primer pase, se llevó a cabo una modelización estadística para la optimización de la metodología de obtención de hHF-MSCs en estas primeras fases. El modelado estadístico para optimizar el cultivo de MSCs ha sido empleado en estudios previos por la ISCT y ha generado la patente “#US62/397,572”, de la University Health Network en Toronto, para la producción óptima de MSCs derivadas de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo en cultivos bi y tridimensionales, destinados a ensayos de terapia celular.

Es probable que la heterogeneidad en el cultivo primario y en el primer pase sea superior a la que pueda presentarse a partir de los pases 3-4 (Vargas, 2016), por lo que esta heterogeneidad podría explicar también los resultados de eficacia en el ajuste a un modelo predictivo de regresión logística múltiple. Debido a que un modelo estadístico complejo puede tener demasiados parámetros para ser útil, nuestro estudio se centró en encontrar un modelo simple para poder ajustarlo a nuestros datos, que nos brindase parámetros que ayuden a comprender cual es la variable es más explicativa o está más fuertemente asociada a la eficacia en la obtención de hHF-MSCs en las etapas iniciales hasta alcanzar la confluencia en el pase 1. Asimismo, un modelo bien ajustado ayuda a diseñar nuevos experimentos que en un futuro faciliten el aislamiento y expansión óptima de hHF-MSCs para su aplicación en terapia celular.

El modelo generado en nuestro trabajo ha mostrado que, tanto el aumento de la edad de los donantes, como el empleo de suero HS, frente al empleo de HPL como suplemento al medio de cultivo, disminuyen de forma significativa la probabilidad de obtener hHF-MSCs tras el cultivo primario y primer pase, siendo el aumento de la edad del donante una variable explicativa más fuertemente relacionada con la eficacia.

Asimismo, el modelo generado puede emplearse para predecir la probabilidad de éxito para obtener hHF-MSCs tras el cultivo primario y el primer pase.

La expansión de las hHF-MSCs tras el primer pase se continuó hasta el pase 5 con HPL como suplemento al medio basal de cultivo por haber demostrado mayor eficacia que el suero heterólogo. Los cultivos se realizaron con diferentes densidades de siembra, según la disponibilidad de hHF-MSCs viables tras cada subcultivo, con el fin de valorar el efecto de la densidad celular en la duplicación de la población HFSC.

Aún en ausencia de contacto celular, y tal y como se observó tras el cultivo primario y primer pase, algunos cultivos detuvieron su proliferación. Para intentar reactivar la proliferación de las hHF-MSCs se procedió a tripsinizar y volver a sembrar las células con medio de cultivo fresco, para reactivar la proliferación de las células quiescentes que, a diferencia de las senescentes, se caracterizan por la detención reversible del ciclo celular. Asimismo, como es sabido por estudios previos, cuando existe una acumulación de células en fase G0/G1, la adición de medio completo conduce a que la mayoría de las células comiencen de modo simultáneo el proceso de duplicación (Achille et al., 2011). Sin embargo, en algunos casos no fue posible reactivar la población celular en cultivo, lo que sugiere que las células de esos cultivos se encontraban mayoritariamente en estado de senescencia.

Las células de la papila dérmica del folículo piloso exhiben una autorrenovación limitada debida a un aumento en la senescencia celular que se manifiesta con el aumento en la edad del donante (Agabalyan et al., 2017). Aunque la región occipital del cuero cabelludo ha sido ampliamente aceptada como un área no afectada de alopecia androgenética (AGA) para ambos sexos, se ha demostrado que la AGA puede afectar el área occipital de pacientes masculinos con enfermedad avanzada (Khunkhet et al., 2021), por lo que la obtención de hHF-MSCs en estos pacientes podría verse más afectada independientemente de la edad del donante. Además de factores como la edad del donante o alteraciones del folículo piloso derivadas de la AGA, las condiciones de cultivo también pueden afectar a la capacidad proliferativa de las hHF-MSCs. Por ello, buscar la densidad de siembra óptima para una expansión máxima, evitando procesos de senescencia celular, es útil tanto para el uso de las hHF-MSCs en investigaciones *in vitro*, como para potenciales aplicaciones clínicas *in vivo*, ya que el procedimiento de cultivo celular puede durar menos tiempo, lo que reduce el riesgo de contaminación del cultivo o pérdida de fenotipo, además de conseguir que el proceso sea más eficiente. En este sentido, nuestros ensayos muestran que se puede lograr una expansión rápida para alcanzar un número suficiente de hHF-MSCs para aplicaciones clínicas utilizando densidades de siembra de 5.000-8.000 células/cm², aunque a densidades más bajas como 2.000 células/cm² se aumenta significativamente la proliferación celular, probablemente por la mayor disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento por célula, tal y como ha sido observado previamente para MSCs de otras fuentes de procedencia (Freshney et al., 2006; Neuhuber et al., 2008; Nekanti et al., 2010; Fossett & Khan, 2012) y para células tumorales (Wright Muelas et al., 2018), por lo que esta densidad también podría ser recomendada para uso terapéutico, si bien este procedimiento no ha sido utilizado en nuestros ensayos, ya que la densidad de siembra de 5.000 a 8.000 células/cm² es la

más ampliamente aceptada. Sin embargo, es importante evitar densidades de siembra muy altas (14.000 células/cm²) ya que han demostrado un efecto negativo sobre la duplicación celular de hHF-MSCs. No obstante, densidades de siembra de 9.000 a 14.000 células/cm² pueden emplearse cuando la expansión de hHF-MSCs *in vitro* no esté destinada a ensayos futuros de reemplazo celular en pacientes. También existen excepciones como la expansión de hHF-MSCs con propósitos de diferenciación osteogénica. Se ha descrito previamente que densidades de siembra altas puede favorecer su potencial osteogénico (Abo-Aziza & Zaki, 2016), incluso se ha observado que la formación de nódulos de calcio por los osteoblastos derivados de hHF-MSCs de la papila dérmica del folículo piloso se presenta en las zonas de cultivo donde existen agregados multicapa (Kiseleva et al., 2009).

La observación de que tanto el aumento de la densidad de siembra, como el aumento de la edad del donante, parecen afectar la capacidad proliferativa de las hHF-MSCs nos condujo a la generación de un modelo de regresión logística múltiple para determinar qué variable es más explicativa o está más fuertemente asociada a la capacidad de duplicación de las hHF-MSCs durante los primeros pases tras el cultivo primario (pases 1 a 5).

El modelo generado de regresión logística múltiple para optimizar la producción de hHF-MSCs tras el cultivo primario y hasta el quinto pase ha mostrado que, tanto el aumento en la densidad de siembra, como el aumento de la edad de los donantes, reducen de forma significativa la probabilidad de obtener hHF-MSCs con capacidad de duplicación, siendo la densidad de siembra la variable explicativa más fuertemente relacionada con la capacidad de duplicación de la población. La elección de este tipo de regresión como modelo que mejor se ajusta a nuestros resultados, también fue debida a que estudios previos con células derivadas de folículo piloso habían observado que los individuos mayores de 40 años con problemas de alopecia mostraban una reducción en la capacidad de proliferación celular (Garza et al., 2011) consecuente con un aumento en el número de células apoptóticas (Zhou et al., 2008).

Garza et al. (2011) observaron el número de células madre del bulge del folículo piloso de donantes caucasoides de entre 40 y 65 años con problemas de alopecia se mantiene inalterado, pero su actividad proliferativa disminuye, al igual que sucede en los cultivos de hHF-MSCs procedentes de donantes de folículo piloso de nuestro estudio, y al igual que ocurre con la capacidad proliferativa de las células de la papila dérmica del folículo piloso descrita previamente en este apartado, lo que concuerda con la baja capacidad proliferativa mostrada en los donantes de entre 40 y 47 años de nuestro estudio. Por otra parte, se ha descrito que los cultivos de MSCs de pacientes de edad más avanzada muestran mayor proporción de células apoptóticas, ya que los efectos fisiológicos del envejecimiento en las MSCs inducen senescencia (Zhou et al., 2008).

En cuanto al análisis del efecto del género del donante en la obtención de hHF-MSCs no pudo realizarse ya que se recibieron explantes de folículo piloso de una única donante debido a una mayor demanda de análisis e injertos capilares por parte del género masculino, por lo que no se ha podido valorar este factor

a la hora de analizar la eficacia en la obtención de hHF-MSCs a partir de explantes de folículo piloso. No obstante, es de interés considerar los resultados de Faustini et al. (2010), quienes mostraron que las MSCs de tejido adiposo de mujeres tienen un rendimiento significativamente superior ($7,77 \pm 4,31 \times 10^6$ células) a las MSCs de varones ($4,22 \pm 5,05 \times 10^6$ células). Esto, añadido al conocimiento de que las células madre tienen receptores de estrógenos y andrógenos, sugiere que puede haber diferencias de género que influyan en la proliferación de MSCs. Se cree que los niveles, más altos de estrógenos en las mujeres, y de andrógenos en los hombres, son responsables de las diferencias entre las MSCs masculinas y femeninas (Ray et al., 2008). Por otra parte, la mayoría de los estudios sugieren que los andrógenos tienen un efecto inhibitorio del crecimiento de las MSCs (Chang et al., 2006), mientras que los estrógenos tienen un papel excitador controlando los niveles de citoquinas y la producción de factores de crecimiento (Crisostomo et al., 2008; Ray et al., 2008). Sin embargo, estos resultados tendrían que ser más explorados ya que Dexheimer et al. (2011) no encontraron diferencias de género en la expansión de MSCs procedentes de médula ósea. Para determinar el efecto del género de los donantes en la proliferación de hHF-MSCs serían necesarios nuevos estudios comparativos con individuos de ambos sexos y mismos grupos de edad.

Los modelos estadísticos predictivos desarrollados en este trabajo han permitido optimizar el aislamiento a partir de explantes de folículo piloso y la producción de hHF-MSCs tras el cultivo primario y los primeros cinco pases, así como predecir la probabilidad de éxito en la obtención de hHF-MSCs según la edad del donante. De esta forma, se visto que la probabilidad de obtener cultivos proliferativos de hHF-MSCs expandidas con lisado de plaquetas humano comercial de un donante de 25 años, tras el pase 1, es del 90%, mientras que esa probabilidad disminuye un 12% en caso de emplear suero heterólogo. Si la edad del donante es de 40 años, la probabilidad de obtener hHF-MSCs, tras el cultivo primario y primer pase, de forma eficaz se reduce un 60% cuando se emplea suero heterólogo. Asimismo, tras el cultivo primario, y si se emplean densidades de siembra de 5.000 células/cm² y un suero rico en plaquetas, la probabilidad de éxito se mantiene cercana al 85%, pero si partimos de un donante con 40 años, y empleamos densidades de siembra de 8.000 células/cm², la probabilidad de éxito disminuye por debajo del 65%.

En síntesis, el modelo estadístico predictivo ha mostrado que el aumento de la edad del donante es la variable explicativa más fuertemente relacionada con la eficacia en la obtención de hHF-MSCs a partir del explante de folículo piloso durante el cultivo primario y primer pase, que puede ser debida a la disminución en el potencial de autorrenovación de las células de la papila dérmica que se manifiesta con la edad. Por otro lado, para optimizar la obtención de hHF-MSCs en cultivo se recomienda el uso de lisados de plaquetas humanos comerciales, en lugar de emplear suero heterólogo de donantes no estandarizado. En cuanto a la obtención de hHF-MSCs tras el primer pase y hasta el quinto pase, el aumento en la densidad de siembra y de la edad de los donantes disminuye de forma significativa la probabilidad de obtener cultivos con capacidad de duplicación, siendo la densidad de siembra la variable explicativa más fuertemente relacionada con la capacidad de duplicación de estas células.

La densidad de siembra de 5.000 células/cm² ha sido empleada como densidad de siembra de referencia en estudios previos para iniciar la expansión de MSCs derivadas de diversos tejidos (Petrenko et al., 2020), por lo que su uso favorece la comparación con los resultados obtenidos por otros grupos de trabajo. Debido a que no se han observado diferencias significativas las densidades de siembra de 5.000 a 8.000 células/cm², y a que se observó que ambas densidades dan lugar a un mayor número de cultivos viables frente a cultivos con incidencias en su expansión, los cultivos de hHF-MSCs pueden iniciarse con una densidad de siembra de 5.000-8.000 células/cm², aunque a densidades más bajas como 2.000 células/cm² se aumenta significativamente la proliferación celular, por lo que esta densidad también podría ser de interés para uso terapéutico. Sin embargo, es importante evitar densidades de siembra muy altas con propósitos terapéuticos de reemplazo celular (14.000 células/cm²) ya que han demostrado un efecto negativo sobre la duplicación celular de hHF-MSCs. Dependiendo del uso al que vayan destinadas las hHF-MSCs deben tenerse en cuenta las densidades de siembra empleadas así como otros factores que pueden afectar a la capacidad de duplicación para poder optimizar los ensayos y/o la obtención de hHF-MSCs para su aplicación en terapia celular. Para edades superiores a los 60 años, la probabilidad de obtener hHF-MSCs es muy reducida, por lo que el estudio de mecanismos que puedan estimular la capacidad de duplicación celular en cultivos menos proliferantes puede suponer una oportunidad para emplear MSCs autólogas en pacientes de edad avanzada.

3 El empleo de suero bovino fetal disminuye la capacidad proliferativa de las hHF-MSCs sin afectar su potencial multipotente.

También hemos llevado a cabo ensayos con medios de cultivo suplementados con suero bovino fetal (FBS) para utilizar hHF-MSCs con fines de investigación ya que las células no pierden sus propiedades en estas condiciones (Gregory et al., 2006; Matthyssen et al., 2017). Estos estudios no se han realizado para la expansión de estas células con fines terapéuticos. Por este motivo, aunque no están permitidos los cultivos con suero FBS en terapia regenerativa (Petrenko et al., 2020), hemos usado FBS en ensayos de adhesión de nuestras hHF-MSCs a patrones de proteínas (Hamon et al., 2016) y en la expansión celular de esta población previa a ensayos de transfección celular (Azuaje-Hualde et al., 2021) y de diferenciación osteogénica y condrogénica de hHF-MSCs ya que el potencial de diferenciación a los tres linajes mesodérmicos, empleando previamente FBS como suplemento del medio de cultivo, no muestra cambios significativos frente al empleo previo del suero HPL (Matthyssen et al., 2017), con la excepción de que, en el caso de la diferenciación condrogénica, se observó un aumento significativo en la formación de micromasas cuando se suplementaba el medio de cultivo con suero HPL (Matthyssen et al., 2017).

Las células hHF-MSCs expandidas con FBS mostraron un aumento del diámetro cercano al 30%, respecto al diámetro mostrado cuando fueron expandidas con suero HPL. Estos resultados fueron observados también en MSCs por Matthyssen et al. (2017) tras el empleo de suero FBS.

Se ha descrito previamente que el tiempo de duplicación de la población (PDT) de MSCs derivadas del estroma corneal expandidas con HPL es 1,5 veces más rápido que el presentado por las mismas células expandidas con FBS (Matthyssen et al., 2017). En hHF-MSCs el tiempo de duplicación de la población tras la expansión con suero FBS fue significativamente superior al mostrado por las células expandidas con HPL, de modo que la comparación resultó en un PDT casi el doble de veces más rápido cuando las células fueron expandidas con suero HPL que el mostrado por las hHF-MSCs expandidas con FBS.

Por todo lo anterior, el suero FBS puede emplearse en la expansión de las hHF-MSCs destinadas a ensayos no terapéuticos, teniendo en cuenta que el uso de este suero aumenta el diámetro celular y el tiempo de duplicación de la población, aunque no afecta negativamente a su potencial multipotente.

4 La población celular obtenida mediante migración y enriquecimiento de células del folículo piloso está formada por células madre del compartimento mesenquimal del folículo piloso (hHF-MSCs).

La población hHF-MSC, obtenida mediante la migración y enriquecimiento células del folículo piloso, ha mostrado cumplir los criterios mínimos propuestos por la ISCT para definir a una población celular como MSC (Dominici et al., 2006). Tal y como se muestra en este trabajo, esta población celular se caracteriza por: a) su capacidad de adhesión a la superficie sin revestimiento del frasco de cultivo; b) su inmunofenotipo CD73+/CD90+/CD105+ en más del 98% de la población y una expresión de los marcadores de superficie CD14, CD34 y CD45 inferior al 2%, y c) por su potencial de diferenciación a los tres linajes mesodérmicos (adipogénico, osteogénico y condrogénico) *in vitro*, demostrado mediante tinciones específicas de los depósitos de lípidos, nódulos de calcio y proteoglicanos sulfatados respectivamente, tras su diferenciación a cada uno de estos linajes.

La morfología mostrada por la población hHF-MSC es fusiforme similar a fibroblasto y característica de MSCs. En la población en cultivo pudieron apreciarse morfologías poligonales aplanadas, así como algunas células con una morfología más alargada y dendrítica. La observación de células con morfología poligonal aplanada no compacta es característica de las células de la papila dérmica (Yang et al., 2010), mientras que las células de la vaina dérmica, aunque similares a miofibroblastos (Agabalyan et al., 2017), se observan con una morfología más alargada y dendrítica cuando son expandidas con el factor de crecimiento FGF2 (Desai et al., 2014) contenido en los lisados de plaquetas.

Asimismo, la observación de algunas células con morfología tricúspide sugiere la presencia de MSCs más comprometidas de la vaina dérmica (Agabalyan et al., 2017) y de fibroblastos dérmicos y/o de la unión dermo-hipodermal circundantes al folículo piloso, tal y como también observaron Haydont et al. (2020). No obstante, la presencia de células con morfología tricúspide fue escasa.

La ausencia de morfologías poligonales compactas parece indicar que nuestra metodología no favorece la presencia de células madre/progenitores con origen en la cresta neural de la dermis interfolicular (Vasylyev et al., 2019), ni de células madre epiteliales derivadas de la cresta neural o queratinocitos (Ponce et al., 2017). Asimismo, no se formaron agregados o esferas similares a cuerpos embrioides característicos de las células Muse (Wakao et al., 2011; Heneidi et al., 2013; Kuroda et al., 2013; Ogura et al., 2014; Wakao et al., 2018) y de las células madre/progenitores con origen en la cresta neural del bulge (Dupin & Sommer, 2012; Ge et al., 2016; Yu et al., 2010), lo que sugiere que estas poblaciones no parecen proliferar junto con las hHF-MSCs cuando se emplea nuestra metodología de enriquecimiento.

El estudio mediante citometría de flujo no mostró cambios en el tamaño y complejidad celular de la población hHF-MSC entre los pases a corto y medio plazo, lo que sugiere que el método de enriquecimiento utilizado mantiene una población de hHF-MSCs similar a lo largo de los pases.

Las hHF-MSC en cultivo mostraron capacidad de expansión en monocapa con la formación de agregados multicapa tras alcanzar la confluencia total. Esta misma observación fue mostrada en estudios previos por Wu et al. (2005) en células de la papila dérmica de folículo piloso en confluencia celular, quienes además puntualizaron que esta característica muestra que, de existir fibroblastos dérmicos del tejido circundante al folículo piloso, éstos se encontrarían en muy baja proporción (Wu et al., 2005).

Además de demostrar la presencia de hHF-MSCs mediante su morfología y capacidad de formación de agregados multicapa, la presencia de hHF-MSCs de la papila dérmica y de la vaina dérmica del folículo piloso fue confirmada mediante la tinción Alcian Blue. La coloración azul pálido, observada tras la tinción, reveló que, en su mayoría, la población celular estaba formada por hHF-MSCs, ya que el citoplasma de la mayor parte de las células de la papila dérmica y vaina dérmica del folículo piloso muestran coloración azul con Alcian Blue (Wu et al., 2005; Lavoie et al., 2009; Kiseleva et al., 2009), a diferencia de los fibroblastos dérmicos que no muestran coloración tras la tinción (Wu et al., 2005), por lo que se confirma que, los fibroblastos dérmicos parecen encontrarse en una proporción insignificante. Cabe destacar que la coloración azul pálido mostrada por las hHF-MSCs de nuestro estudio fue muy similar a la mostrada en estudios previos en MSCs de folículo piloso (Kiseleva et al., 2009; Zhang et al., 2013). Este menor nivel de intensidad del color en la tinción de las células de la papila dérmica y vaina dérmica del folículo piloso fue descrito previamente por Wu et al. (2005).

La propiedad de adherencia de las MSCs, por sí sola, no es suficiente para aislar una población de hHF-MSCs, porque otras poblaciones celulares distintas a MSCs pueden ser aisladas y expandidas junto a las hHF-MSCs. Tras la selección y el análisis de expresión de los marcadores para la selección de hHF-MSCs, la observación de la sobreexpresión del gen CD56 típicamente mesenquimal contribuyó a la confirmación de la presencia de MSCs en los cultivos, y en concreto, de células proliferantes de la vaina dérmica del folículo piloso (Ge et al., 2016; Vasylyev et al., 2017). A su vez, la expresión positiva, aunque leve, del gen ALP parece reforzar la hipótesis la posibilidad de encontrar células de la papila dérmica y de la zona

peribulbar del folículo piloso (McElwee et al., 2003; Rendl et al., 2003; Driskell et al., 2011). Por tanto, la expresión de marcadores de superficie apoya que metodología seguida en este trabajo favorece la migración desde el explante primario y el enriquecimiento en células hH-MSCs en los cultivos.

Por otro lado, la expresión de genes como propios de células madre, *SOX2*, *ALP* y *CD56*, también fue estudiada. La expresión moderada del gen *SOX2* ayudó a confirmar la presencia de células de la papila dérmica y de la región peribulbar (Izadpanah et al., 2006; Biernaskie et al., 2009; Driskell et al., 2013; Yang et al., 2013; Driskell et al., 2015; Agabalyan et al., 2017; Lynch et al., 2018; Lim et al., 2019; Vasyliov et al., 2019), sin embargo, debido a que la expresión de *SOX2* disminuye a lo largo de los pases (Agabalyan et al., 2017), la ausencia de expresión de este marcador no hubiera descartado la presencia de hHF-MSCs. Como señalaron, Rendl et al. (2005) y Mao et al. (2015) los fibroblastos dérmicos no expresan los genes *ALP* y *SOX2*, pero la expresión del gen *CD56* no descarta la presencia de éstos en la población hHF-MSCs (Blasi et al., 2011; Brohem et al., 2013), de igual forma que no se descartó la presencia de pericitos debido a la expresión positiva de los genes *ALP* (Crisan et al., 2008; Fisher et al., 2009) y *SOX2* (Bouacida et al., 2012). Aunque las células Muse también expresan *ALP* (Kuroda et al., 2010; Wakao et al., 2011; Ogura et al., 2014) y *SOX2* (Kuroda et al., 2010; Heneidi et al., 2013; Kuroda et al., 2013), la presencia de esta población pluripotente quedó descartada ya que no se observaron agregados similares a cuerpos embrioides en nuestros cultivos, así como tampoco coexpresión de los marcadores de superficie CD177 y CXCR4 y de sobreexpresión de los genes *FOXA2* y *SOX17*, que hubieran revelado la obtención de células de linaje endodérmico (Wong et al., 2012) a partir de la diferenciación de células Muse cuando la población hHF-MSCs fue inducida a diferenciación.

El marcador CD133 (PROM1) presenta cambios dinámicos en su expresión a medida que avanza el ciclo de crecimiento del pelo y solo muestra una expresión positiva en la fase anágena del crecimiento (Biernaskie et al., 2009; Driskell et al., 2011; Ge et al., 2016; Agabalyan et al., 2017), por lo que no se seleccionó para su análisis en este trabajo.

El empleo de la metodología de migración y enriquecimiento podría no evitar la proliferación, junto a las hHF-MSCs, de otras poblaciones localizadas en el tejido circundante al folículo piloso: fibroblastos dérmicos y pericitos que se localizan predominantemente alrededor del folículo piloso. Los resultados del estudio del fenotipo de la población hHF-MSCs mostraron que la presencia de fibroblastos es baja, tal y como se discute en el apartado anterior, y además no se descarta la presencia de pericitos en la población hHF-MSCs. No obstante, al igual que en nuestro trabajo, otras poblaciones de MSCs, como las aisladas de tejido adiposo o médula ósea, también han mostrado la presencia de otras poblaciones celulares diferentes a MSCs (Zuk et al., 2001; Billon et al., 2007; Gimble et al., 2007; Silva et al., 2010; Tang et al., 2008; Wrage et al., 2008; Zimmerlin et al., 2010, Bourin et al., 2013; Zimmerlin et al., 2013). No obstante, y aunque estén representados los fibroblastos y pericitos en una pequeña proporción, esto no es un inconveniente ya que la ISCT MSC admite la heterogeneidad de las poblaciones MSCs e incluso considera que las funciones secretoras e inmunomoduladoras asociadas con los beneficios clínicos de las MSCs

residen en la heterogeneidad de estas poblaciones (Viswanathan et al., 2019). Además, en caso de que se requiera la eliminación de algunas de estas poblaciones de la población hHF-MSC obtenida en este trabajo, se puede realizar un *sorting* con marcadores específicos de este tipo celular.

Las hHF-MSCs de la papila dérmica tienen un efecto antifibrótico, mientras que los fibroblastos tienen un riesgo mayor de provocar efectos fibróticos en la cicatrización de heridas (Rippa et al., 2019). Por tanto, si con el propósito de emplear las hHF-MSCs en terapia celular se deseara evitar la presencia de fibroblastos, podría realizarse un *sorting* con el marcador S100A4 (Lv et al., 2014). En el caso de los pericitos, aunque pueden participar en la homeostasis de los tejidos mesenquimales y también en la cicatrización de heridas al igual que las hHF-MSCs, estudios previos han sugerido que, al igual que los fibroblastos, pueden promover la fibrosis en lugar de acelerar la cicatrización (Mills et al., 2013), por lo que un *sorting* con CD56 no seleccionaría esta población celular. Asimismo, y con propósitos de terapia celular, si se requiere la eliminación de células Muse (ya sean Muse-MSCs o Muse-Fibroblastos), se podría realizar un *sorting* con el marcador SSEA-3.

5 La metodología de enriquecimiento de las hHF-MSCs no favorece la presencia de poblaciones celulares CD34+.

Las MSCs carecen de expresión (< 2%) del marcador CD34 (Dominici et al., 2006). El inmunofenotipo típicamente mesenquimal mostrado por las hHF-MSCs descarta la presencia de células endoteliales y hematopoyéticas en la población aislada. El análisis de los resultados de citometría de los marcadores propuestos por la ISCT para la definición de MSCs, mostrado en el apartado 2.3 de Resultados, indicó que más del 98% de la población hHF-MSC aislada de explantes de folículo piloso coexpresa los marcadores CD73, CD90 y CD105, por lo que la presencia de poblaciones como telocitos y células madre epiteliales no derivadas de la cresta neural progenitoras de queratinocitos (EpSCs) es insignificante ya que no coexpresan estos marcadores mesenquimales.

Las poblaciones celulares localizadas en el compartimento epitelial del folículo piloso, que podrían proliferar en cultivo junto con las hHF-MSCs y que expresan el marcador CD34 son: a) MSCs de la zona perivascular circundante al folículo piloso/progenitores de tránsito pericíticos (da Silva et al., 2008; Yamanishi et al., 2012; Zimmerlin et al., 2013); b) células madre de la piel con origen en la cresta neural (Waters et al., 2007; Ge et al., 2016; Ali et al., 2018); c) la fracción CD34+ de los telocitos (Ceafalan et al., 2012; Zimmerlin et al., 2013; Manole et al., 2016; Mitrofanova et al., 2020; Sanches et al., 2020); y d) células madre epiteliales no derivadas de la cresta neural (EpSCs) (Tumbar et al., 2004; Rendl et al., 2005; Waters et al., 2007; Wakao et al., 2011; Wakao et al., 2018; Mitrofanova et al., 2020; Sanches et al., 2020).

La ausencia de expresión del marcador de superficie CD117 corrobora, por un lado, que las células progenitoras de tránsito melanocíticas, que también son CD34+, no se encuentran entre las aisladas del explante de folículo piloso y, por otro lado, coincide con los resultados de estudios previos sobre MSCs procedentes de folículo piloso (Coelho de Oliveira et al., 2017) y sobre MSCs procedentes de otros tejidos

(Asensi et al., 2014). Asimismo, la coexpresión inapreciable de CD117 y CD184 en la población hHFSC descarta la presencia de progenitores del linaje endodérmico (Wong et al., 2012) que pudieran ser debidos a un proceso de transdiferenciación. En diversos estudios previos, el marcador CD184 ha mostrado expresión variable en MSCs según el tejido de procedencia (Baek et al., 2011; Cappelleso-Fleury et al., 2010; Naji et al., 2019) y no ha mostrado expresión en fibroblastos (Cappelleso-Fleury et al., 2010).

En el caso de las células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural (SDSCs), teniendo en cuenta sus requerimientos para facilitar su adherencia al frasco de cultivo y su proliferación, probablemente su presencia sea prácticamente inexistente. Las SDSCs se consideran células mesectodérmicas o ectomesenquimales, a diferencia de las MSCs que son células madre mesenquimales derivadas del mesodermo (Agabalyan et al., 2017; Dupin & Sommer, 2012; Ge et al., 2016; Takashima et al., 2007). Cuando estas células crecen en monocapa muestran una morfología similar a fibroblasto, al igual que las MSCs; no obstante, las SDSCs de la dermis interfolicular muestran una morfología poligonal compacta, por lo que son fácilmente distinguibles (Vasyliov et al., 2019). Si bien las hSDSCs no presentan la capacidad de adherencia de las MSCs *in vitro*, pueden llegar a adherirse a la superficie de cultivo cuando se recubre con poli-L-lisina (Mao et al., 2015), colágeno (Vasyliov et al., 2017) o fibronectina (Yu et al., 2010) y crecer en monocapa. Para su proliferación *in vitro*, las hSDSCs precisan que el medio de cultivo esté suplementado con Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) (Ge et al., 2016; Wang et al., 2020); de lo contrario, se produce una pérdida gradual de estas células a lo largo de los pases (Wang et al., 2020). No obstante, Mao et al. (2015) consiguieron la proliferación de estas células en monocapa empleando el medio de cultivo clásico para la proliferación de MSCs sin adición de ITS tras facilitar su adherencia a la superficie de cultivo con poli-L-lisina.

En cuanto a su inmunofenotipo, las SDSCs presentan un perfil típicamente mesenquimal (Hoogdjuin et al., 2006; Vasyliov et al., 2017; Vasyliov et al., 2019); así como potencial de diferenciación a linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico (Achilleos & Trainor, 2012; Nilforoushzadeh et al., 2019; Toma et al., 2001; Lavoie et al., 2009; Huang et al., 2010; Yu et al., 2010; Dupin et al., 2012; Vasyliov et al., 2017; Vasyliov et al., 2019), cumpliendo los criterios mínimos recomendados por la ISCT para la definición de MSCs (Dominici et al., 2006). Por otra parte, las SDSCs muestran potencial de diferenciación a melanocitos (Achilleos et al., 2012; Dupin et al., 2012), neuronas (Achilleos et al., 2012; Dupin et al., 2012; Vasyliov et al., 2017; Vasyliov et al., 2019) y células de Schwann (Toma et al., 2001; Sieber-Blum et al., 2004; Fernandes et al., 2004; McKenzie et al., 2006; Biernaskie et al., 2006; Achilleos et al., 2012; Dupin et al., 2012; Vasyliov et al., 2019); así como a fibroblastos y miofibroblastos (Shu et al., 2014; Mao et al., 2015; Ge et al., 2016).

Con el fin de evitar la proliferación de poblaciones, como las SDSCs del bulge y de la dermis, no se favoreció su adherencia a la superficie de cultivo mediante revestimientos proteicos, ni su proliferación mediante la adición de ITS. Así, aunque a pesar de las características de la superficie del frasco de cultivo se hubiesen

podido adherir cierto número de SDSCs, éstas dejarían gradualmente de proliferar a lo largo de los primeros subcultivos (Wang et al., 2020), pese a la presencia de los factores de crecimiento FGF2 y EGF en el medio que pudieran favorecer su crecimiento (Jinno et al., 2010; Wong et al., 2015), ya que para su proliferación *in vitro*, precisan de la suplementación del medio de cultivo con el nutriente sintético ITS (Ge et al., 2016; Wang et al., 2020). A pesar de todo lo anterior, se ha visto la proliferación de SDSCs en medios de cultivo sin la suplementación con ITS (Mao et al., 2015).

En cuanto a la presencia de MSCs en la región perivascular, Zimmerlin et al. (2013) hallaron una subpoblación de pericitos CD34+ que es altamente proliferativa, en contraste con los pericitos CD34-, y que coexpresan los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105 en alta proporción, de forma similar a las MSCs. Por otra parte, Yamanishi et al. (2012) detectaron MSCs CD34+ en nichos perivasculares del cuero cabelludo humano y observaron que las MSCs CD34+ son abundantes alrededor del folículo piloso, por lo que sugirieron que las zonas perivasculares dérmicas actúan como un nicho de MSCs CD34+ en la dermis del cuero cabelludo. Además, se ha evidenciado que las MSCs del tejido adiposo residen en la región perivascular como células CD34+ (da Silva et al., 2008; Zimmerlin et al., 2013). Por todo lo anterior, Zimmerlin et al. (2013) sugirieron que la subpoblación de pericitos CD34+ son progenitores de tránsito de las MSCs.

Los resultados de la expresión del marcador de superficie CD34 mostraron que menos del 2% de la población obtenida mediante la metodología de migración y enriquecimiento expresaba este antígeno. Por tanto, es insignificante la presencia de las poblaciones anteriormente mencionadas en la población hHF-MSC, y se confirma que la población celular aislada del explante de folículo piloso procede del compartimento mesenquimal del folículo piloso, y no del compartimento epitelial o de tejidos circundantes, a excepción de una pequeña proporción de fibroblastos y pericitos.

No obstante, si con propósitos terapéuticos se desea eliminar alguna población CD34+ remanente esto puede realizarse mediante *sorting* con este marcador. Asimismo, la selección de la población CD90+ mediante *sorting* eliminaría del cultivo los telocitos remanentes, si los hubiere, ya que no expresan este antígeno de superficie típicamente mesenquimal (Ceafalan et al., 2012; Xiong et al., 2016; Sanches et al., 2020). En caso de detectar la presencia de células madre con origen en la cresta neural, si se desea descartarlas, se puede hacer un *sorting* con NESTIN.

Un estudio comparativo de los transcriptomas de poblaciones presentes en el folículo piloso podría ofrecer una firma transcripcional que facilitase la identificación de las hHF-MSCs. Por otra parte, debido a que el análisis transcriptómico y funcional de las MSCs de diferentes fuentes biológicas ha revelado firmas transcripcionales que difieren según la procedencia, con capacidades de diferenciación cercanas pero, no obstante, diferentes (Naji et al., 2019) y, tomando en consideración que la identidad de las MSCs aún está bajo debate, para apoyar su identificación con fines terapéuticos, es vital comprobar sus propiedades biológicas, las cuales incluyen su potencial de autorrenovación, multipotencia, capacidad trófica,

anidamiento/migración e inmunosupresión (Naji et al., 2019; Ripa et al., 2019; Petrenko et al., 2020; Jiang et al., 2021).

6 7. La población hHF-MSC muestra potencial de autorrenovación y diferenciación multipotente.

La población hHF-MSC de nuestro trabajo ha mostrado sobreexpresión de tres genes implicados en el potencial de autorrenovación celular: *HSPA9*, *KAT7* y *KAT8*. La expresión del gen *HSPA9* se asocia con la proliferación celular, la respuesta al estrés y el mantenimiento de las mitocondrias, mientras que los genes *KAT* participan en la regulación de la transcripción y replicación del ADN (GeneCards; PANTHER). A su vez, *NOTCH1* es un gen regulador de la división simétrica/asimétrica de las células madre para su autorrenovación/especialización, y está involucrado en la capacidad angiogénica de las hHF-MSCs.

Asimismo, las hHF-MSCs obtenidas mostraron la capacidad de diferenciarse a los tres linajes mesodérmicos: adipogénico, condrogénico y osteogénico.

En el caso de la diferenciación adipogénica se observó la presencia de depósitos lipídicos tras la tinción con Oil Red. Tras la extracción del colorante y la lectura de la densidad óptica a 510 nm (OD_{510}) los resultados mostraron una presencia significativa de lípidos, por lo que se corroboró el potencial adipogénico de las hHF-MSCs.

Tras la diferenciación osteogénica de las hHF-MSCs, la tinción con Alizarin Red S mostró la presencia de nódulos de calcio. La presencia de nódulos producidos por osteoblastos mostró un potencial osteogénico similar al mostrado por hHF-MSCs en distinto pase en estudios previos (Kiseleva et al., 2009; Zhang et al., 2013; Lu et al., 2019) y en hHF-MSCs en el mismo pase (Bajpai et al., 2012). Asimismo, estos resultados fueron similares a los mostrados por células de la papila dérmica (Hoogdjuin et al., 2006) y vaina dérmica del folículo piloso (Jahoda et al., 2003; Hoogdjuin et al., 2006), lo que confirma el aislamiento de hHF-MSCs. Este potencial osteogénico mostrado por las hHF-MSCs obtenidas por nosotros fue similar al mostrado por MSCs derivadas de la dermis (Brohem 2013), la córnea (Matthyssen et al., 2017) y la región sinovial (Fernandes et al., 2018) tras el empleo del mismo medio de inducción osteogénico comercial, sin embargo, en MSCs de tejido adiposo procedentes de individuos de edad similar a la de los donantes de nuestras hHF-MSCs, se observó una mayor producción de nódulos mineralizados (Maredziak et al., 2016). En cuanto a los fibroblastos dérmicos, Kiseleva et al. (2009) mostraron la ausencia de formación de nódulos de calcio tras su diferenciación osteogénica. Este mismo resultado fue mostrado por Haydont et al. (2020) para los fibroblastos de la dermis papilar y reticular. En contraste, los fibroblastos de la unión dermo-hipodermal (F-DHJ) mostraron un alto potencial osteogénico en donantes 20 a 31 años (Haydont et al., 2020), por lo que la presencia de este tipo de fibroblastos en nuestra población hHFSC fue probablemente insignificante, en caso de haberse aislado del explante de folículo piloso. El mayor potencial osteogénico también fue observado en células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural de la dermis humana (Soma et al., 2013).

Por todo lo anterior, nuestra población celular muestra más similitud en su potencial de diferenciación osteogénico con MSCs de folículo piloso que con otras poblaciones celulares del folículo y tejidos circundantes, lo que concuerda con resultados anteriores que indican que nuestra población está formada mayoritariamente por células madre mesenquimales del folículo piloso.

Por último, hemos demostrado el potencial condrogénico mediante la tinción de proteoglicanos sulfatados cartilaginosos con Alcian Blue. La obtención de una masa cartilaginosa tras el periodo de diferenciación pudo ser favorecida por la suplementación del medio basal con suero bovino fetal (FBS), ya que este suero aumenta el potencial de formación de micromasa (Matthyssen et al., 2017).

7 Las hHF-MSCs muestran una caracterización funcional propia de células madre.

La población hHF-MSC puede contener otras poblaciones celulares distintas a MSCs que proliferan junto a estas como ha sido discutido anteriormente. Dada esta heterogeneidad en la población en cultivo, y en función del uso terapéutico al que vayan destinadas las MSCs, la ISCT MSC recomienda caracterizar funcionalmente estas poblaciones mediante la demostración de la secreción de factores tróficos, la modulación de las células inmunitarias y la promoción de la angiogénesis para demostrar la funcionalidad de estas células. Asimismo, pueden caracterizarse los exosomas secretados por las MSCs y/o microARNs (Viswanathan et al., 2019). Asimismo, para resolver las preguntas sobre si las MSCs expandidas *in vitro* muestran funcionalmente distintas a las MSCs *in vivo*, y si ambas tienen funciones paracrinas e inmunomoduladoras superpuestas, la ISCT MSC sugiere la realización de ensayos de secuenciación de células individuales (single-cell), agrupaciones estadísticas y análisis de datos (Viswanathan et al., 2019).

Los ensayos para la caracterización funcional de las hHF-MSCs llevados a cabo en este trabajo, han mostrado la expresión de 20 genes con expresión positiva diferencial, que se clasifican como: a) marcadores específicos de células madre, entre los que se encuentran reguladores del ciclo celular (*CCND2*, *FGF2* y *MYC*), moduladores del cromosoma y la cromatina (*HDAC2*, *KAT2A*, *KAT7* y *KAT8*), reguladores de la división celular (*NOTCH1*), marcadores del potencial de autorrenovación (*HSPA9*, *KAT7* y *KAT8*), citoquinas y factores de crecimiento (*BMP2*, *FGF2* y *JAG1*), reguladores de la comunicación célula-célula (*DLL1* y *JAG1*) y moléculas de adhesión (*CD44* y *NCAM1*), b) marcadores del potencial de diferenciación de células madre pluripotentes (*KRT15* y *MSX1*), c) vías de señalización importantes para el mantenimiento de las células madre (vía Notch: *DLL1*, *DTX2*, *DVL1*, *EP300*, *KAT2A*, *HDAC2*, *JAG1*, y *NOTCH1*, y vía *Wnt*: *MYC* y *PPARD*). Los 5 genes más subexpresados se identificaron como: reguladores del ciclo celular (*CCNA2*, *CDK1* y *FGF1*), marcadores metabólicos (*ALDH2*), expresión condrogénica en MSCs (*COL1A1*), y de citoquinas y factores de crecimiento (*FGF1*).

Tras la caracterización funcional de las hHF-MSCs, mediante el sistema de clasificación bioinformática PANTHER, se observó que las hHF-MSCs aquí obtenidas sobreexpresan genes implicados en 19 rutas, de

las cuales 2 son vías de señalización implicadas en el mantenimiento de las MSCs (Notch y Wnt) y 3 de las rutas intervienen en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington.

Asimismo, 5 de los genes sobreexpresados por las hHF-MSCs están implicados en la angiogénesis. El gen *FGF2* participa como factor neurotrófico en la ruta angiogénica. Otros genes angiogénicos/neurotróficos expresados por las hHF-MSCs fueron: *DLL1*, *JAG1*, *NOTCH1* y *DVL1*.

El conjunto de los resultados de expresión muestra que las hHF-MSCs de nuestro estudio muestran una funcionalidad de células madre *in vitro*. La caracterización funcional de las hHF-MSCs puede ayudar en un futuro a su aplicación en terapia celular contra enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer o el Parkinson, por lo que es importante evaluar la expresión de genes involucrados en estas enfermedades. En nuestra población hHF-MSC se observó la expresión de *KAT7*, que es ~~caracterización funcional de las hHF-MSCs se observó que~~ *KAT7* es uno de los genes implicados en la enfermedad de Alzheimer junto con *CD44*, *NOTCH1* y *DVL1*, mientras que *HPSA9* está implicado en la enfermedad de Parkinson. El conocimiento de las proteínas que producen las hHF-MSCs, y las rutas en las que estas proteínas intervienen, aporta información sobre qué proteínas se deberían inhibir para interrumpir las rutas clave en una enfermedad, con propósitos de aplicación futura de las hHF-MSCs en terapia celular.

8 La cinética de crecimiento de las hHF-MSCs muestra una capacidad proliferativa similar a la de las células del compartimento mesenquimal de folículo piloso observada en estudios previos.

El recuento de hHF-MSCs viables tras cada pase mostró que, cada vez que la población celular se subcultivaba volvía a crecer hasta alcanzar la densidad celular que existía antes del subcultivo. Esta propiedad es característica de las células en cultivo y, cada vez que una población celular se subcultiva, el ciclo de crecimiento se repite (Freshney et al., 2006).

Como era de esperar, el valor de la duplicación de la población en pase 1 se mostró significativamente superior al resto de pases, como consecuencia de la menor densidad celular de siembra (~2.000 células/cm²), debida al menor número de células obtenidas tras el cultivo primario. En los sucesivos pases la densidad de siembra fue de ~8.000 células/cm², ya que no mostró diferencias significativas con la densidad de siembra de referencia empleada por Petrenko et al. (2020) (5.000 células/cm²).

El factor de duplicación de la población hHF-MSC entre los pases 2 a 5 estuvo comprendida entre 2,29 y 3,50, resultado similar al de MSCs procedentes de la papila dérmica y vaina dérmica del folículo piloso analizadas por Bajpai et al. (2012) (2,50 – 3,50), quienes además demostraron que, a largo plazo (pases superiores a 12), los valores de duplicación de la población disminuían significativamente, lo cual se correspondía con un aumento en el tiempo de duplicación. El aumento en el tiempo de duplicación en las

hHF-MSCs fue más significativo en los pases posteriores al pase 3. Estos resultados fueron los esperados ya que el envejecimiento celular afecta a células madre (Rando, 2006).

En el pase 3, el valor acumulado de duplicaciones de la población (cPD) de hHF-MSCs (10,43 [I.C. del 95% de 8,30 a 13,20]) mostró un valor similar al obtenido por Bajpai et al. (2012) (8-10 duplicaciones) en MSCs procedentes de la papila dérmica y la vaina dérmica de folículo piloso humano. Asimismo, el valor cPD obtenido para las hHF-MSCs en nuestro estudio mostró un valor comprendido entre los obtenidos por Petrenko et al. (2020) para MSCs de tejido adiposo y de Warton-Jelly ($9,60 \pm 0,40$ y $12,30 \pm 0,70$, respectivamente), cuyos valores cPD fueron significativamente superiores a los observados en MSCs de médula ósea ($6,00 \pm 0,50$) (Petrenko et al., 2020). Como consecuencia, el tiempo de duplicación de la población (PDT) fue más bajo en nuestras hHF-MSCs (36,61 horas, con un I.C. del 95% de 33,25 a 45,61) que en las MSCs de médula ósea ($99,00 \pm 22,00$ h), similar al tiempo de duplicación presentado por la población MSCs de tejido adiposo ($40,00 \pm 7,00$ h), y superior a MSCs de Warton-Jelly ($21,00 \pm 2,00$ h). Comparando los resultados del PDT en MSCs de la misma fuente de procedencia, Coelho de Oliveira et al. (2017) mostraron un tiempo de duplicación similar ($34,50 \pm 0,02$ h), aunque sus MSCs fueron aisladas de la región temporal de donantes sometidos a cirugía estética facial y expandidas en medio de cultivo suplementado con suero FBS.

Para poder comparar la duplicación de la población de hHF-MSCs con estudios previos a medio plazo, se tomó el valor acumulado de las duplicaciones de la población en el pase 4 y se obtuvo un valor de 12,72 duplicaciones (I.C. del 95% de 10,50 a 17,20), inferior al obtenido por Kim et al. (2019) para MSCs de médula ósea (16,00) en el mismo pase. Estos datos confirman las diferencias que habíamos detectado en la duplicación entre las hHF-MSCs y las MSCs de médula ósea analizadas por Petrenko et al. (2020).

Las cinéticas de crecimiento de las hHF-MSCs varían cuando se emplea suero FBS como suplemento al medio de cultivo. Por esta razón, y teniendo en cuenta que estudios previos analizaron el PDT en cultivos suplementados con FBS, es de interés comparar los resultados obtenidos en nuestras hHF-MSCs con MSCs también de folículo piloso de estudios previos y con otras poblaciones celulares que pueden aislarse juntas a éstas a partir del explante de folículo piloso. El valor PDT para las células de la papila dérmica del folículo piloso y de la región peribulbar cultivadas con FBS fue de alrededor de 60 horas (Wu et al., 2005; Sarugaser et al., 2005), aunque Bassukas et al. (1991) observaron un tiempo de duplicación de 93,00 horas, mientras que en las células de la vaina dérmica fue de entre 80,00 y 88,20 horas (Jahoda et al., 2003); valores similares a los obtenidos por MSCs expandidas con suero FBS de nuestro estudio (78,21 horas, con un I.C. del 95% de 72,66 a 88,40).

En cuanto a estudios previos en otras poblaciones celulares que pueden aislarse del explante de folículo piloso, se ha observado, que las poblaciones expandidas con suero FBS, muestran un valor PDT de 72 a 120 horas en células melanocíticas y de la vaina externa del folículo piloso (Na et al., 2006). En cuanto al PDT observado en células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural (SDSCs) los valores

oscilan entre 29,71 y 30,13 horas durante los primeros tres pases tras el cultivo primario (Vasyliev et al., 2017), mientras que Gunawardena et al. (2019) observaron un PDT de entre 44 y 110 horas en pases 2 a 5. Respecto a MSCs de tejido adiposo, se han obtenido valores de entre 83,40 y 112,80 h (Mitchell et al., 2006) y de 72,00 h (Sowa et al., 2013), aunque otros estudios han mostrado PDTs más bajos: entre 24,00 y 57,50 horas en donantes de 20 a 50 años, respectivamente (Maredziak et al., 2016) y de 38 – 46 horas (Blasi et al., 2011). Los PDTs de las hHF-MSCs en pases de 6 a 12 (78,21 horas, con un I.C. del 95% de 72,66 a 88,40) obtenidos en este trabajo sugieren que las SDSCs probablemente no están presentes, o se encuentran en una proporción insignificante en nuestra población hHF-MSC ya que, de hallarse en los cultivos, sus tiempos de duplicación más bajos habrían facilitado su proliferación antes que las MSCs del folículo piloso.

Las comparaciones entre las cinéticas de crecimiento de las hHF-MSCs de nuestro estudio con MSCs de folículo piloso y de tejidos humanos de otras procedencias muestran que las hHF-MSCs presentan una capacidad de proliferación similar las MSCs del compartimento mesenquimal del folículo piloso y una capacidad de proliferación intermedia frente a otras MSCs. Una comparación más precisa requeriría que la comparación entre MSCs de distintos tejidos de procedencia a partir de los mismos donantes.

9 Las fases del crecimiento en cultivo de las hHF-MSCs revelan el tiempo máximo que deberían mantenerse en cultivo para evitar fenómenos de senescencia.

Con el objetivo de aplicar MSCs en terapia celular se ensayaron diversos protocolos para evitar los efectos negativos que tienen algunos factores como la alta confluencia celular en la proliferación de hHF-MSCs.

Tras el análisis de las fases de crecimiento de las hHF-MSCs, se observó un periodo de latencia de 1,33 días de duración (I.C. del 95% de 1,09 a 1,60). Los periodos de latencia facultan a las MSCs para su reentrada en el ciclo celular, ya que este periodo les permite recuperarse de la tripsinización, reconstruir su citoesqueleto, y establecer uniones de adhesión a la superficie de cultivo y expandirse sobre la misma (Freshney et al., 2006).

Con una densidad de siembra de 5.000 células/cm² se recomienda realizar el subcultivo del cuarto al quinto día, para no sobrepasar el 80% de confluencia, ya que el porcentaje de células en crecimiento será mayor y el tiempo de recuperación de la fase de latencia será más corto y, se evitará, asimismo, el aumento de la senescencia celular y la preservación del fenotipo. Esto es importante, ya que, las células pueden subcultivarse en fase estacionaria, donde existe una confluencia total y no se observa duplicación de la población, pero es preferible subcultivarlas antes de alcanzar dicha fase, ya que el porcentaje de células en crecimiento será mayor y el tiempo de recuperación durante la fase de latencia, será más corto (Freshney et al., 2006) y se evitará, asimismo, el aumento de la senescencia celular (Ho et al., 2011). Además, mantener la densidad celular baja mediante subcultivos frecuentes contribuye a la preservación

del fenotipo normal (Vargas et al., 2016). Por todo ello, es importante registrar el número de duplicaciones transcurridas tras cada pase para poder predecir el tiempo hasta la senescencia, y tenerlo en cuenta tanto para expansión celular como para la criopreservación.

Cuando el propósito es terapéutico, reemplazamiento celular en tejido dañado, sería recomendable no sobrepasar un 70-80% de confluencia durante los subcultivos, para evitar los efectos de la inhibición celular por contacto en la proliferación, ya que dicho contacto provoca una senescencia acelerada de MSCs (Ho et al., 2011). No obstante, la viabilidad y capacidad de proliferación observada a confluencias superiores al 80% mostraron que las poblaciones de hHF-MSCs se pueden llevar a confluencias altas, manteniendo su capacidad proliferativa al menos en el momento de alcanzar dicha confluencia. La similitud entre el porcentaje de células viables entre los diferentes grados de confluencia analizados (50-60 y superior al 80%) ha sido observada en MSCs de médula ósea de rata, donde no se encontraron diferencias significativas entre el 50, 70 y 80% de confluencia (Abo-Aziza et al., 2017). además, se ha demostrado que una tasa de proliferación más alta está relacionada con un potencial de diferenciación osteogénico, condrogénico y adipogénico más fuerte (Dexheimer et al., 2011), por lo que con propósitos terapéuticos que no empleen el reemplazamiento celular podrían emplearse altas densidades de siembra para favorecer, por ejemplo, la diferenciación osteogénica.

10 Las hHF-MSCs muestran un ciclo celular lento característico de las poblaciones mesenquimales del folículo piloso.

Los cultivos de hHF-MSCs de nuestro estudio han mostrado una alta viabilidad y un ciclo celular lento característico de MSCs similar al observado por Zhang et al. (2013) en células de la papila dérmica y vaina dérmica del folículo piloso y por Rahmani et al. (2014) en células madre dérmicas de la zona peribulbar del folículo, presentando una capacidad de proliferación similar a la mostrada por MSCs de la misma fuente (Bajpai et al., 2012) y de MSCs procedentes de otros nichos (Petrenko et al., 2020).

El porcentaje de hHF-MSCs obtenido en la fase G0/G1 (75,98%; con un intervalo de confianza del 95% de 74,27 a 77,61) fue similar al obtenido por Ho et al. (2011) en MSCs de la médula ósea (74,19%). Comparando el porcentaje de hHF-MSCs en las fases proliferativas S + G2/M (24,03% [I.C. 95% de 22,39 a 25,73]) con los obtenidos por Zhang et al. (2013) en MSCs de la misma fuente (20,43%), se observa que ambas poblaciones muestran un ciclo celular lento característico de las células madre mesenquimales (Zhang et al., 2013; Ho et al., 2011), en contraste con el porcentaje de células en fases proliferativas que muestran las líneas celulares tumorales, como la línea celular humana de cáncer de mama MCF-7, cuyo porcentaje de población en fases S + G2/M del ciclo celular es del 59,6% (Nafie et al., 2020). Aunque, cabe señalar, que en los cultivos de células stem cancerosas (CSCs) también se observan células en estado quiescente (Triana-Martínez et al., 2020), al igual que observamos en las hHF-MSCs.

Asimismo, la comparación de los datos de citometría de flujo obtenidos para las hHF-MSCs de nuestro estudio en los pases 5-6 con los mostrados por Zhang et al. (2013) en pases 9 a 11 (79,57% en fase G0/G1,

14,40% en fase S y 6,03% en fase G2/M) sugieren que el ciclo celular lento característico de las células madre mesenquimales se mantiene en las hHF-MSCs de nuestro estudio durante los mismos pases en los que las MSCs de folículo piloso de estudios previos todavía no comienzan a mostrar signos de senescencia celular (Bajpai et al., 2012).

Por otra parte, las hHF-MSCs en fase 5-6 muestran una fracción de S+G2/M superior a la hallada por Zhang et al. (2013) en pases más altos (pases 9 a 11) de MSCs de la misma fuente de procedencia. Este dato confirma que, en pases tempranos, el índice de proliferación es más alto y, por tanto, el tiempo de duplicación de la población hHF-MSC es significativamente menor, tal y como quedó demostrado en el análisis de las cinéticas de crecimiento. Esta correlación entre los números de células en los distintos compartimentos del ciclo celular y la cinética de crecimiento también puede observarse en MSCs de otras fuentes de procedencia distinta a la del folículo piloso (Ho et al., 2011; Petrenko et al., 2020).

Freshney (2006) describieron que las MSCs pueden sufrir un promedio de 39 cPDs antes de alcanzar la senescencia. En el caso de las MSCs derivadas de folículo piloso, estas células pueden ser mantenidas en cultivo durante alrededor de 45 duplicaciones antes de que comiencen a mostrar signos de senescencia celular (Bajpai et al., 2012). Esto permite estimar, tras la alta correlación obtenida entre los pases y la duplicación de la población acumulada (Figura 29-A), que los valores cPD descritos previamente se alcanzarían en nuestras hHFSCs en cultivo entre los pases 13 y 15 para alcanzar 39 y 45 duplicaciones de la población, respectivamente.

Asimismo, Bajpai et al. (2012) obtuvieron un valor cPD de 36 durante los pases 11-12 para MSCs de la misma fuente. El valor cPD de 36 duplicaciones para las hHF-MSCs en estudio se estimó que se alcanzaría en el pase 12 (pase 10 para el 75% de los cultivos), en concordancia con los datos aportados por Bajpai et al. (2012).

En cuanto al rendimiento teórico antes de que la población mostrase signos de envejecimiento, se estimó en un mínimo de 10^{17} células viables para un PD acumulado de 39. Estudios previos estimaron valores de 10^{15} células para un cPD de 36 en hHF-MSCs (Bajpai et al., 2012), por lo que la estimación del rendimiento teórico de nuestras hHF-MSCs resulta ventajoso. Los datos de duplicación de la población de hHF-MSCs mostraron, a su vez, una mejor cinética de crecimiento que la presentada por hBM-MSCs, cuyo valor cPD alcanzaba las 36 duplicaciones en el pase 9 (Petrenko et al., 2020).

Asimismo, y teniendo en cuenta que la densidad de folículos pilosos en el cuero cabelludo es de alrededor de 200 folículos por cm^2 y la mayor parte se encuentran en fase anágena durante tiempo prolongado (Bajpai et al., 2012), el potencial de las hHF-MSCs como fuente de células *stem* para medicina regenerativa es muy prometedor.

11 La capacidad proliferativa de las hHF-MSCs muestra su adecuación para futuros usos en terapia celular.

Antes de emplear MSCs *in vivo*, es necesario conseguir un número mínimo de células clínicamente suficiente, en nuestro caso de hHF-MSCs. Este valor se estableció en 140 millones de células madre mesenquimales (Petrenko et al., 2020). Tras el análisis de las cinéticas de crecimiento de las hHF-MSC de nuestro trabajo, se estimó que entre el pase 2 y 3 se alcanzaba el rendimiento celular esperado para su aplicación clínica, similar al observado para MSCs de otras fuentes de procedencia, como MSCs de tejido adiposo (AT-MSCs) y Warton-Jelly (hWJ-MSCs) (Petrenko et al., 2020).

Habitualmente, el número de días para alcanzar una confluencia del 90% durante el cultivo primario varía según la procedencia de las hMSCs (Petrenko et al., 2020); el valor promedio para hAT-MSCs y hBM-MSCs, es de entre 7 y 8 días respectivamente, y 13 días para hWJ-MSCs (Petrenko et al., 2020). La duración en días observada en el cultivo primario de hHF-MSCs resultó más elevada que la observada por Petrenko et al. (2020) para hMSCs de otros tejidos, y más elevada que la obtenida por Soma et al. (2013) para MSCs derivadas de folículo piloso (14 días), probablemente como consecuencia del método empleado en este trabajo para el aislamiento de hHF-MSCs a partir de folículo piloso, en el que no se realiza digestión enzimática, ni procesos de sedimentación. Las papilas dérmicas del folículo piloso aisladas con dispasa, colagenasa IV y colagenasa D mostraron una mejora significativa del aislamiento celular a partir del explante y un aumento en el número de células viables en comparación con los explantes no tratados (Wu et al., 2005). Aunque el número de células de la papila dérmica no cambia durante el ciclo de crecimiento del pelo, la matriz extracelular, que es abundante en fase anágena, se reduce en la fase telógena, especialmente en el contenido de glucosaminoglicanos, con los que parece que está relacionado el comportamiento agregativo de las células de la papila dérmica del folículo piloso. Por ello, una digestión enzimática de la papila dérmica favorece el aislamiento a partir del explante en fase anágena (Wu et al., 2005). No obstante, con nuestra metodología, los días necesarios para alcanzar un número de células clínicamente relevante tras el cultivo primario entra dentro del rango presentado por las células de la papila dérmica y vaina dérmica del folículo piloso observados Botchkareva et al. (2020). En cuanto a otros estudios previos para otras poblaciones celulares procedentes del folículo piloso, pero diferentes de las MSCs, y que pueden aislarse junto con éstas durante el cultivo primario, Vasyliov et al. (2017) demostraron que la duración del cultivo primario para células madre derivadas de la piel con origen en la cresta neural del bulge del folículo piloso fue de $16,20 \pm 2,50$ días, valor inferior al presentado por las MSCs derivadas de folículo piloso de este estudio.

Para alcanzar un número mínimo de hHF-MSCs clínicamente relevante (140×10^6), se requieren 12,00 (9,00 – 13,00) días de expansión celular tras el cultivo primario, superior al requerido por hWJ-MSCs (7,60 días), similar al requerido por hAT-MSCs (13,00 días) e inferior al necesario en el caso de células hBM-MSCs (34,60 días). En cuanto al total de días necesarios, desde el inicio del proceso de aislamiento celular

hasta alcanzar 140×10^6 células, el tiempo requerido para hHF-MSCs fue inferior (32,50 [27,50 - 36,00] días) al tiempo requerido para hBM-MSCs (43,10 días).

De estos datos de cinéticas de crecimiento para las MSCs se desprende que las hHF-MSCs requieren un tiempo 1,60 veces mayor respecto a hAT-MSCs y hWJ-MSCs para conseguir el número mínimo de células clínicamente relevante, si bien el tiempo requerido fue inferior al de las hBM-MSCs, cuyo tiempo requerido es el doble que el de hAT-MSCs y hWJ-MSCs.

Las hHF-MSCs mostraron un alto potencial de proliferación durante los primeros pases tras el aislamiento, con una viabilidad de 80 - 90%. El número mínimo de células clínicamente relevante se alcanzó en el pase 2, al igual que refieren Petrenko et al. (2020) para las hAT-MSCs y hWJ-MSCs. No obstante, el límite inferior del intervalo de confianza no alcanzó el valor mínimo de 140×10^6 células. Este valor se alcanza con el límite inferior del I.C. (95%) del pase 3. Al coincidir este valor con el primer cuartil en dicho pase, se estableció que el 25% de los cultivos requirió llegar hasta el pase 3 para conseguir el número mínimo clínicamente relevante.

El estudio de la capacidad proliferativa *in vitro* se mostró similar a la de hHF-MSCs de estudios previos, y adecuada para el uso de esta población en futuros ensayos de terapia celular, mostrada por su alta viabilidad en cultivo, su cinética de crecimiento y la caracterización de su ciclo celular. No obstante, aunque las hHF-MSCs pueden ser subcultivadas repetidamente hasta los pases 12-14 sin mostrar signos de senescencia, se ha demostrado que el número de células en fase G0/G1 aumenta gradualmente conforme se incrementa el valor acumulado de la duplicación de la población (cPD) (Ho et al., 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que, para evitar un aumento en la proporción de células quiescentes, es recomendable. Los pases 3 y 4 podrían ser los más adecuados para su trasplante *in vivo*, ya que se evita el efecto del envejecimiento por subcultivo y estos pases ofrecen suficiente número de células para su aplicación clínica y para su criopreservación.

12 Efecto de la confluencia y la privación de nutrientes en la proliferación de las hHF-MSCs.

Los ensayos sobre el efecto de la inhibición por contacto celular y los estados de privación de nutrientes y factores de crecimiento en la población hHF-MSC mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células en fase G0/G1, como era de esperar y al igual que observaron Ho et al. (2011) en MSCs de médula ósea. El porcentaje de células en fase G0/G1 en la población hHF-MSC sincronizada fue del 91,00% (intervalo de confianza del 95% de 89,63 a 92,29), valor muy similar al obtenido en cultivos MSCs de tejido adiposo sometidos a privación (Lee et al., 2019), y al mostrado por MSCs endometriales tras su sincronización mediante contacto celular y tras 24 horas en estado privación de factores de crecimiento (Lyublinskaya et al., 2015).

La sincronización de la población hHF-MSC de nuestros cultivos en fase G0/G1 del ciclo celular cuando se aseguraba el contacto celular y el agotamiento de nutrientes y factores de crecimiento mostró una afectación significativa de su capacidad de duplicación, tal y como se observó tras el análisis de las cinéticas de crecimiento, por lo que debe evitarse alcanzar estados de agregación multicapa en los cultivos celulares, ya que no permiten mantener la capacidad proliferativa de las hHF-MSCs con propósitos de aplicación clínica en terapia celular. Sin embargo, esto no afecta a su capacidad de diferenciación osteogénica, que, por el contrario, ésta se ve potenciada.

Por otra parte, la sincronización en fase G0/G1 provocó una disminución significativa en la viabilidad celular y aumentó la apoptosis. Se ha descrito que la senescencia inducida por contacto celular conlleva un incremento de especies oxígeno reactivas (ROS) en MSCs de médula ósea (Ho et al., 2011; Lyublinskaya et al., 2015; Petrenko et al., 2020) y una disminución de enzimas antioxidantes (Ho et al., 2011). En contraste, Petrenko et al., 2020 mostraron que tras mantener MSCs de otras fuentes, como MSCs de tejido adiposo y Warton-Jelly, en estado de agotamiento de factores de crecimiento no se observa una reducción significativa en la actividad metabólica, preservándose la viabilidad celular en estas condiciones de estrés.

Los datos del tiempo de duplicación de la población obtenidos en células sincronizadas en fase G0/G1 resultaron similares a los mostrados por Ho et al. (2011) en MSCs de médula ósea (BM-MSCs) y de cordón umbilical (UC-MSCs) (98,25 horas y 81,08 horas, respectivamente), quienes establecieron que las variaciones en las cinéticas de crecimiento inducidas por contacto celular en MSCs no estaban asociadas con la longitud de los telómeros, ni se inducía un incremento en el daño del ADN. En cuanto a los resultados para cultivos hHF-MSCs que no habían sido sincronizadas en fase G0/G1, el PDT (39,89 horas) resultó, como era de esperar en un valor inferior al presentado por Ho et al. (2011) para BM-MSCs y UC-MSCs (52,14 y 44,17 horas, respectivamente).

La expresión del gen p53 (*cell cycle checkpoint regulator*) y el acortamiento de telómeros no se ven afectados por el contacto celular (Ho et al., 2011) y, dado que los estados de apoptosis temprana inducidos por p53 son reversibles (Geske et al., 2001), hemos analizado la expresión de caspasas 3/7 activas en hHF-MSCs, para valorar el efecto del contacto celular en un estado no proliferativo e irreversible, como es la apoptosis. Aunque el aumento, tanto de células apoptóticas como necróticas, no fue muy elevado tras el contacto celular, sí que fue significativo, por lo que es recomendable no sobrepasar la confluencia del 70-80% durante la expansión celular.

La reducción en la proliferación observada por las cinéticas de crecimiento de cultivos sincronizados es debida, en parte, a la inhibición por contacto favorecida por el mantenimiento de los cultivos en fase estacionaria y, en parte, al agotamiento de nutrientes y factores de crecimiento en el medio de cultivo (Freshney et al., 2006), consecuencia de la alta densidad celular (Freshney et al., 2006).

Cuando se induce un estado de inhibición por contacto, la disminución de la viabilidad también ha sido observada en BM-MSCs de rata por Abo-Aziza et al. (2017) quienes emplearon el mismo método de conteo de viabilidad celular por exclusión con azul tripán que en este trabajo.

Los datos de apoptosis y necrosis en MSCs procedentes de médula ósea mostraron resultados similares a los obtenidos para hHF-MSCs de nuestro trabajo, siendo los valores de apoptosis y necrosis de 2,46% y 0,49%, respectivamente (Peltz et al., 2012).

Asimismo, Zhu et al. (2006) demostraron que el estado de agotamiento de factores de crecimiento durante 48 horas induce la apoptosis. Dado que las hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 se mantuvieron durante al menos 48 horas en estado de privación y en fase estacionaria, nuestros resultados de aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas están de acuerdo con lo establecido por Zhu et al. (2006). Aunque la inducción a la apoptosis parece estar controlada por otros factores, ya que Ho et al. (2011) no observaron aumento en la apoptosis debido al contacto celular.

Tras los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento y en los análisis de estados proliferativos y no proliferativos y, con el propósito de emplear las hHF-MSCs en terapia celular, llegamos a la conclusión de que debe evitarse una alta confluencia que favorezca la agregación multicapa y los estados de privación durante la expansión de hHF-MSCs *in vitro*. Sin embargo, para propósitos concretos de inducción a la diferenciación osteogénica y/o transfección, pueden emplearse densidades del 80-100% de confluencia.

13 Reversión de cultivos celulares en estado no proliferativo mediante resveratrol.

Los estados no proliferativos de algunos cultivos pueden ser activados a su reentrada en el ciclo celular mediante el empleo de moléculas como el resveratrol. La quiescencia, al contrario que la senescencia, se caracteriza por un estado de detención reversible del ciclo celular. A pesar de que la inhibición por contacto acelera la senescencia replicativa en MSCs humanas (Ho et al., 2011), se ha descrito que determinadas moléculas como el resveratrol (Peltz et al., 2012) o Dlk1 (*DLK1 delta like non-canonical Notch ligand 1*) (Walker et al., 2019) inducen la reentrada en el ciclo celular.

El tratamiento con resveratrol 10 μ M ha mostrado efecto para inducir la reentrada en el ciclo celular de las hHF-MSCs quiescentes de nuestros cultivos. Este efecto ha sido observado en estudios previos de MSCs de otras fuentes de procedencia. Peltz et al. (2012) mostraron que hBM-MSCs, en iguales condiciones de estudio, eran también inducidas a entrar en ciclo celular, lo que sugiere que moléculas como el resveratrol pueden impedir los efectos de la sincronización de hHF-MSCs por inhibición por contacto y estado de privación de nutrientes y factores de crecimiento.

El resveratrol 10 μ M no mostró efectos apreciables sobre la apoptosis y necrosis en hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 que reentraron en ciclo celular, por lo que, en principio esta molécula no parece afectar a la viabilidad celular de las hHF-MSCs. Esta apreciación ya fue realizada en MSCs de médula ósea (Peltz et al., 2012), cuyos cultivos tratados con diferentes dosis, incluida la dosis 10 μ M de resveratrol, no mostraron aumento de apoptosis.

Asimismo, como la quiescencia es un proceso reversible, las hHF-MSCs sincronizadas en fase G0/G1 pueden reentrar en el ciclo celular con un cambio en las condiciones de cultivo (Lyublinskaya et al., 2015; Triana-Martínez et al., 2020). Se ha descrito que el resveratrol aumenta la capacidad de proliferación de MSCs de médula ósea (Peltz et al., 2012) debido al aumento de la expresión del gen *Cdk2* (Peltz et al., 2012). En contraste, el aumento en la proliferación es limitado por el efecto inhibitorio de la autorrenovación, debido a la inhibición de la expresión de genes *Sirtuin 1*, *Sirtuin 2*, *Birc5* & *Birc4* implicados en la supervivencia a dosis 10 μ M (Peltz et al., 2012), por lo que las células quedan detenidas en fase S del ciclo celular. Esto a su vez hace aumentar el tiempo de duplicación.

De los resultados obtenidos parece desprenderse que el resveratrol es una molécula capaz de promover la reentrada en el ciclo celular y, por tanto, su aplicación sería de interés para la obtención de hHF-MSCs autólogas de pacientes de edad avanzada. Sería necesario realizar un estudio para determinar la dosis adecuada en la que se favorece la proliferación celular disminuyendo su toxicidad para su aplicación *in vivo*. El empleo de resveratrol en cultivos de hHF-MSCs también reduciría el tiempo necesario para conseguir el número mínimo clínicamente relevante de hHF-MSCs y los tiempos de experimentación con este tipo celular. Sin embargo, serían necesarios nuevos estudios con hHF-MSCs a diferentes dosis de resveratrol, tanto para analizar el efecto sobre el ciclo celular, como para valorar el efecto sobre la muerte celular y determinar qué dosis aumentan la proliferación debido al aumento de la expresión del gen *Cdk2*.

14 Diferenciación de hHF-MSCs a linaje osteogénico y producción de medios condicionados inductores de osteogénesis.

Las hHF-MSCs inducidas a diferenciación con medios de inducción comerciales, mostraron una morfología similar a osteoblasto en los últimos días de diferenciación osteogénica (Pae et al., 2014; Shen et al., 2019). Tras la tinción con Alizarin Red S se demostró la presencia de nódulos de calcio, lo que indica que tuvo lugar una mineralización de la matriz llevada a cabo por los osteoblastos. Sin embargo, el potencial osteogénico observado fue muy bajo.

Para aumentar el potencial osteogénico de las hHF-MSCs, se mantuvo el medio condicionado producido durante los 21 días de diferenciación y durante este periodo se adicionó medio inductor comercial cada 7 días en una proporción del 50%. Los medios condicionados producidos por los osteoblastos derivados de hHF-MSCs con esta proporción de medio condicionado combinado (CM) con medio inductor comercial (OM) CM:OM (1:1) mostraron un aumento significativo de la producción de depósitos de calcio frente al empleo de medios inductores sin medio condicionado secretado por los osteoblastos derivados de la

diferenciación de las hHF-MSCs. La concentración de calcio obtenida con el medio combinado fue de $435,45 \text{ mM} \pm 72,02$. Sin embargo, este valor fue tres veces inferior al obtenido por Houlihan et al. (2012) para MSCs de médula ósea (alrededor de 1.400 mM). La obtención de osteoblastos fue confirmada mediante la expresión positiva diferencial del gen *RUNX2*, lo que sugirió la presencia de osteoblastos inmaduros e intermedios. Asimismo, el aumento de expresión de otros marcadores de osteoprogenitores y osteoblastos, y el aumento de expresión de marcadores adipogénico y condrogénico, cuya expresión se incrementa bajo condiciones de inducción osteogénica parece confirmar la obtención de preosteoblastos y osteoblastos intermedios tras la diferenciación. La ausencia de aumento en la expresión de algunos marcadores osteogénicos también fue observada en estudios previos para MSCs de otras fuentes de procedencia (Murgia et al., 2016).

En comparación con el potencial osteogénico de MSCs de otras fuentes de procedencia, la obtención de osteoblastos tras 21 días de diferenciación de la población hHF-MSC con medio condicionado CM:OM (1:1) mostró que el tiempo requerido para la obtención de osteoblastos a partir de hHF-MSCs es similar al tiempo requerido por MSCs procedentes de membrana coriónica y decidua (Shen et al., 2019); mientras que MSCs procedentes de membrana amniótica y cordón umbilical requieren menos tiempo para la obtención de osteoblastos.

No obstante, para comprobar si el aumento de los días de diferenciación osteogénica mejora el proceso de diferenciación se realizó el mismo ensayo CM:OM (1:1) a 35 días. Tras 35 días de diferenciación osteogénica no se observó un incremento significativo en la producción de nódulos de calcio, con una lectura de la densidad óptica ($0,48 \text{ OD}_{405}$ (con un intervalo de confianza del 95% de $0,32$ a $0,49$) fue similar a la obtenida por Gregory et al. (2006) para MSCs de médula ósea. La cuantificación de contenido de calcio mostró por tanto un aumento en la concentración de $1.027,04 \text{ mM}$ tras 35 días de diferenciación.

Sin embargo, y con el fin de reducir los días de diferenciación sin perder potencial osteogénico en las hHF-MSCs, impulsamos la diferenciación osteogénica mediante el empleo de medios condicionados secretados por los osteoblastos obtenidos de la diferenciación de las hHF-MSCs con el medio combinado CM:OM (1:1). Hemos empleado estos medios condicionados con una concentración inferior al 50%, ya que el empleo de concentraciones bajas ha mostrado que la disminución en la proporción de medios inductores de la osteogénesis aumenta el potencial osteogénico de las hHF-MSCs. Este aumento en el potencial osteogénico al disminuir la concentración del medio inductor también fue observado por Zhong et al. (2019).

Los resultados mostraron que, tras 7 días de diferenciación con una dosis única de medio condicionado secretado por osteoblastos tras 21 días de diferenciación, al 40% era capaz de inducir las hHF-MSCs al linaje osteogénico, ya que tras los 7 días de diferenciación, y tras realizar un cambio de medio con un medio basal no inductor, y mantener las células durante otros 7 días, se obtuvieron depósitos de calcio. Este potencial osteogénico para la obtención de osteoblastos en tan solo 14 días pudo deberse a una pre-

inducción osteogénica con medio OB-CM al 40% durante los primeros 7 días que, probablemente provocó la diferenciación de las hHF-MSCs a osteoprogenitores y, en una pequeña proporción, a osteoblastos. Al mantenerse este cultivo en privación durante los siguientes 7 días, la población hHF-MSC no pudo proliferar y, teniendo en cuenta que la diferenciación osteogénica había sido iniciada durante la primera semana, la continuación del proceso de diferenciación hacia osteoblastos fue probablemente debida a la autoinducción de los osteoprogenitores. Shen et al. (2019) observaron que las MSCs derivadas de la membrana amniótica humana y del cordón umbilical a los 7 días formaban células precursoras de osteoblastos.

Tras el diseño de nuevos protocolos de inducción a la diferenciación osteogénica de nuestras hHF-MSCs, se valoró la posibilidad de mejorar aún más los resultados. Se ha descrito que la transfección de genes *SOX5/SOX6/SOX9* y *BMP-2* vía electroporación mejora los datos de diferenciación condrogénica y osteogénica, respectivamente. Por otra parte, el uso de la metodología de transfección por lipofección de MSCs con el gen *FOXA2* dio resultados óptimos en regeneración de hígado (Lee et al., 2019). Tras los resultados obtenidos con las hHF-MSCs transfectadas mediante lipofección, aunque el porcentaje de transfección es inferior al que podría obtenerse mediante otras técnicas, las hHF-MSCs mostraron capacidad para ser transfectadas sobre patrones de adhesión de proteínas en célula individual (Azuaje-Hualde et al., 2021), por lo que podrían emplearse para generar células pluripotenciales y aumentar el potencial de aplicación en terapias regenerativas.

VI. CONCLUSIONES

El folículo piloso es una rica y fácilmente accesible fuente de MSCs. El presente trabajo muestra el desarrollo de una metodología que simplifica el aislamiento y enriquecimiento de células madre/progenitores mesenquimales de folículos pilosos humanos (hHF-MSCs) de la región occipital del cuero cabelludo de donantes de entre 20 y 40 años, y que, a su vez, favorece su capacidad de duplicación y predice la probabilidad de éxito en la obtención de cultivos proliferativos, lo que facilita su adecuación para su futuro uso en terapia celular.

1. Se ha desarrollado una metodología sencilla y eficiente para obtener cultivos de células adherentes del folículo piloso occipital humano, mediante cultivo primario de explantes preparados con disección manual y sembrados en un medio de cultivo basal suplementado con un lisado de plaquetas humanas (HPL) al 30%.
2. La cinética de crecimiento de las poblaciones de células adherentes derivadas de explantes de folículo piloso a lo largo de los pases tras el cultivo primario ha demostrado que la edad de los donantes es un factor asociado a la capacidad de proliferación de las células en cultivo. Se ha estimado que los cultivos de donantes menores de 34 años tienen mayor capacidad de proliferación.
3. El modelo estadístico predictivo basado en los resultados de confluencia celular y edad del donante ha demostrado que el aumento de la edad es una variable explicativa fuertemente asociada a la eficacia en la obtención de células adherentes durante el cultivo primario y primer pase, lo que parece estar relacionado con la disminución del potencial de autorrenovación de las células de la papila dérmica del folículo piloso que se observa con la edad.
4. Por otro lado, el modelo estadístico predictivo basado en los resultados de la capacidad de duplicación, confluencia celular, densidad de siembra y edad del donante ha demostrado que la densidad de siembra, seguida de la edad del donante, están fuertemente asociadas con la capacidad de duplicación celular desde el primer pase tras el cultivo primario hasta el quinto pase de cultivo.
5. El estudio del inmunofenotipo ha revelado que más del 99% de las células muestran CD73+/CD90+/CD105+/CD14-/CD34-/CD45-, lo que corresponden a marcadores de superficie característicos de células madre mesenquimales.
6. La caracterización morfológica, llevada a cabo mediante el estudio de las células en medio de cultivo suplementado con HPL, ha mostrado que tienen la capacidad de crecer adheridas a la superficie de frascos de cultivo sin revestimiento, una morfología característica de células mesenquimales poligonales aplanadas propias de la papila dérmica, y formas más alargadas y dendríticas propias de las células mesenquimales de la vaina dérmica, y también se ha observado una pequeña proporción de células con morfología tricúspide lo que no descarta la presencia de

una muy baja proporción de fibroblastos en el cultivo. Además, la tinción positiva con alcian blue, la expresión de los genes *ALP*, *CD56* y *SOX2*, así como la formación de agregados multicapa cuando alcanzan la confluencia, apoyan un fenotipo y genotipo característico de célula madre mesenquimal del folículo piloso.

7. La caracterización funcional de las células en cultivo muestra resultados de expresión de los genes *HSPA9*, *KAT7* y *KAT8* indicativos de potencial de autorrenovación en estas células, y del gen *NOTCH1* que regula la división asimétrica. Además, estas células expresan también los genes *FGF2*, *DLL1*, *DVL1*, *JAG1* y *NOTCH1*, característicos de capacidad angiogénica/neurotrófica, y los genes de las vías de señalización NOTCH y WINT implicadas en el mantenimiento de las células madre. El conjunto de los genes expresados durante la caracterización funcional indica la naturaleza de células madre de las células obtenidas en este trabajo.
8. Por último, las células en cultivo han mostrado un potencial de diferenciación multipotente a los tres linajes mesodérmicos: adipocítico, condrogénico y osteogénico.
9. El conjunto de la caracterización morfológica, capacidad de adhesión, inmunofenotipo y potencial multipotente observado en las células cumple los criterios mínimos exigidos por la ISCT para demostrar la presencia de células madre mesenquimales adultas. Esto, unido a los resultados de expresión génica y caracterización funcional *in silico* muestra que la metodología utilizada en este trabajo permite obtener cultivos enriquecidos en células madre mesenquimales derivadas de folículo piloso (hHF-MSCs).
10. La cinética de crecimiento, la alta viabilidad y el ciclo celular lento observados en la población hHF-MSC se muestran similares a los de MSCs de la misma fuente de procedencia, y a los de MSCs de otros tejidos empleadas habitualmente en ensayos de terapia celular, por lo que esta capacidad proliferativa exhibida por las hHF-MSCs muestra su potencial para ser empleadas en futuros ensayos en terapia celular.
11. El efecto prolongado de los cultivos en confluencia total y el mantenimiento en estado de privación disminuyen la viabilidad de la población celular. No obstante, el tratamiento con resveratrol promueve la reentrada en el ciclo celular y, por tanto, su uso sería de interés para mejorar la expansión de hHF-MSCs cuando la capacidad de proliferación es reducida, como ocurre en los donantes de edad avanzada o afectados de alopecia.
12. En este trabajo se ha hecho especial incidencia en la mejora de la capacidad inductora de diferenciación a otros linajes mesodérmicos tomando como modelo la diferenciación a linaje osteogénico. En este sentido, se ha puesto de manifiesto la capacidad de las hHF-MSCs para alcanzar un alto potencial osteogénico mediante el uso de medios suplementados con medio

condicionado generado durante la diferenciación osteogénica. Este resultado indica que las células hHF-MSCs presentan un alto interés para su aplicación en terapia celular.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abo-Aziza, F. A.-A. M., & Zaki, A. E.-K. A. (2016). The impact of confluence on BMMSC proliferation and osteogenic differentiation. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 11(2), 121–132.
2. Achille, V., Mantelli, M., Arrigo, G., Novara, F., Avanzini, M. A., Bernardo, M. E., Zuffardi, O., Barosi, G., Zecca, M., & Maccario, R. (2011). Cell-Cycle phases and genetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expanded in vitro from healthy donors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(7), 1817–1821. <https://doi.org/10.1002/jcb.23100>
3. Achilleos, A., & Trainor, P. A. (2012). Neural crest stem cells: Discovery, properties and potential for therapy. *Cell Research*, 22(2), 288–304. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.11>
4. Agabalyan, N. A., Rosin, N. L., Rahmani, W., & Biernaskie, J. (2017). Hair follicle dermal stem cells and skin-derived precursor cells: Exciting tools for endogenous and exogenous therapies. *Experimental Dermatology*, 26(6), 505–509. <https://doi.org/10.1111/exd.13359>
- 1 Ali, I. Q., Salih, S. M., & Abdulla, G. A. (2018). Differentiation of CD34+ Human Hair Follicle Stem Cells into Functional Melanocytes. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 454(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/454/1/012013>
- 2 Alt, E., Yan, Y., Gehmert, S., Song, Y.-H., Altman, A., Gehmert, S., Vykoukal, D., & Bai, X. (2011). Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biology of the Cell*, 103(4), 197–208. <https://doi.org/10.1042/bc20100117>
- 3 Anastassakis K. (2022) Morphology and Histology of the Pilosebaceous Unit. In: Androgenetic Alopecia From A to Z. *Springer*, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-76111-0_4
5. Asensi, K. D., Fortunato, R. S., dos Santos, D. S., Pacheco, T. S., de Rezende, D. F., Rodrigues, D. C., Mesquita, F. C. P., Kasai-Brunswick, T. H., de Carvalho, A. C. C., Carvalho, D. P., Carvalho, A. B., & Goldenberg, R. C. do S. (2014). Reprogramming to a pluripotent state modifies mesenchymal stem cell resistance to oxidative stress. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(5), 824–831. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12226>
- 4 Azuaje-Hualde, E., Rosique, M., Calatayud-Sanchez, A., Benito-Lopez, F., M. de Pancorbo, M., & Basabe-Desmots, L. (2021). Continuous monitoring of cell transfection efficiency with micropatterned substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(7), 2626–2636.
6. Baek, S. J., Kang, S. K., & Ra, J. C. (2011). In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Experimental and Molecular Medicine*, 43(10), 596–603. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.10.069>
- 5 Bai, T., Liu, F., Zou, F., Zhao, G., Jiang, Y., Liu, L., Shi, J., Hao, D., Zhang, Q., Zheng, T., Zhang, Y., Liu, M., Li, S., Qi, L., & Liu, J. Y. (2017). Epidermal growth factor induces proliferation of hair follicle-derived mesenchymal stem cells through epidermal growth factor receptor-mediated activation of erk and akt signaling pathways associated with upregulation of cyclin d1 and downregulation of p1. *Stem Cells and Development*, 26(2), 113–122. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0234>
- 6 Bajpai, V. K., Mistriotis, P., & Andreadis, S. T. (2012). Clonal multipotency and effect of long-term in vitro expansion on differentiation potential of human hair follicle derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research*, 8(1), 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.07.003>
- 7 Baksh, D., Yao, R., & Tuan, R. S. (2007). Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *Stem Cells*, 25(6), 1384–1392. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0709>
- 7 Bassukas, I. D., Arai, A., Schell, H., & Hornstein, O. P. (1991). Growth and cell kinetics of human hair papilla cells in vitro. An autoradiographic and flow cytometric study. *Cell Proliferation*, 24(4), 367–374. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1991.tb01165.x>

- 8 Ben-David, U., & Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 11(4), 268–277. <https://doi.org/10.1038/nrc3034>
- 9 Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 18(3), e264–e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
- 10 Beresford JN (1989) Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res* 240:270–280
- 11 Bergeron, L., Busuttill, V., & Botto, J. M. (2020). Multipotentiality of skin-derived precursors: application to the regeneration of skin and other tissues. *International Journal of Cosmetic Science*, 42(1), 5–15. <https://doi.org/10.1111/ics.12587>
- 12 Bianco, P. (2014). “Mesenchymal” stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 677–704. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013132>
- 13 Biernaskie, J., Paris, M., Morozova, O., Fagan, B. M., Marra, M., Pevny, L., & Miller, F. D. (2009). SKPs Derive from Hair Follicle Precursors and Exhibit Properties of Adult Dermal Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 5(6), 610–623. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.10.019>
8. Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M. C., Glaviuex-Pardanaud, C., Richardson, W. D., Kassaris, N., Dani, C., & Dupin, E. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*, 134(12), 2283–2292. <https://doi.org/10.1242/dev.002642>
- 14 Birmingham, E., Niebur, G. L., Mchugh, P. E., Shaw, G., Barry, F. P., & McNamara, L. M. (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European Cells and Materials*, 23(353), 13–27. <https://doi.org/10.22203/eCM.v023a02>
- 15 Blasi, A., Martino, C., Balducci, L., Saldarelli, M., Soleti, A., Navone, S., Canzi, L., Cristini, S., Invernici, G., Parati, E., & Alessandri, G. (2011). Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vascular Cell*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1186/2045-824X-3-5>
9. Bouacida, A., Rosset, P., Trichet, V., Guilloton, F., Espagnolle, N., Cordonier, T., Heymann, D., Layrolle, P., Sensébé, L., & Deschaseaux, F. (2012). Pericyte-Like Progenitors Show High Immaturity and Engraftment Potential as Compared with Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048648>
10. Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., ... Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
- 16 Brachvogel, B., Moch, H., Pausch, F., Schlötzer-Schrehardt, U., Hofmann, C., Hallmann, R., von der Mark, K., Winkler, T., & Pöschl, E. (2005). Pervascular cells expressing annexin A5 define a novel mesenchymal stem cell-like population with the capacity to differentiate into multiple mesenchymal lineages. *Development*, 132(11), 2657–2668. <https://doi.org/10.1242/dev.01846>
- 17 Brohem, C. A., De Carvalho, C. M., Radoski, C. L., Santi, F. C., Baptista, M. C., Swinka, B. B., De, C., De Araujo, L. R. R., Graf, R. M., Feferman, I. H. S., & Lorencini, M. (2013). Comparison between fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from dermal and adipose tissue. *International Journal of Cosmetic Science*, 35(5), 448–457. <https://doi.org/10.1111/ics.12064>
- 18 Budel, L., & Djabali, K. (2017). Rapid isolation and expansion of skin-derived precursor cells from human primary fibroblast cultures. *Biology Open*, 6(11), 1745–1755. <https://doi.org/10.1242/bio.025130>
11. Caplan A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- 19 Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>

- 20 Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(5), 1076–1084. <https://doi.org/10.1002/jcb.20886>
- 21 Cappelleso-Fleury, S., Puissant-Lubrano, B., Apoil, P. A., Titeux, M., Winterton, P., Casteilla, L., Bourin, P., & Blancher, A. (2010). Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical Immunology*, 30(4), 607–619. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9415-4>
- 22 Carriel, V. S., Aneiros-Fernandez, J., Arias-Santiago, S., Garzón, I. J., Alaminos, M., & Campos, A. (2011). A novel histochemical method for a simultaneous staining of melanin and collagen fibers. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59(3), 270–277. <https://doi.org/10.1369/0022155410398001>
- 23 Castro-Malaspina, H., Gay, R., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H., & Moore, M. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 56(2), 289–301. <https://doi.org/10.1182/blood.v56.2.289.bloodjournal562289>
- 24 Ceafalan, L., Gherghiceanu, M., Popescu, L. M., & Simionescu, O. (2012). Telocytes in human skin - are they involved in skin regeneration? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(7), 1405–1420. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01580.x>
- 25 Chang, C. Y., Hsuuw, Y. D., Huang, F. J., Shyr, C. R., Chang, S. Y., Huang, C. K., ... & Huang, K. E. (2006). Androgenic and antiandrogenic effects and expression of androgen receptor in mouse embryonic stem cells. *Fertility and sterility*, 85, 1195-1203.
- 26 Chen, C.-T., Shih, Y.-R. V., Kuo, T. K., Lee, O. K., & Wei, Y.-H. (2008). Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 26(4), 960–968. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0509>
- 27 Chen, F. G., Zhang, W. J., Bi, D., Liu, W., Wei, X., Chen, F. F., Zhu, L., Cui, L., & Cao, Y. (2007). Clonal analysis of nestin- vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *Journal of Cell Science*, 120(16), 2875–2883. <https://doi.org/10.1242/jcs.03478>
- 28 Chen, X., Ye, S., & Ying, Q. L. (2015). Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: Past, current and future. *BMB Reports*, 48(12), 668–676. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.12.215>
12. Chou, W. C., Takeo, M., Rabbani, P., Hu, H., Lee, W., Chung, Y. R., ... Ito, M. (2013). Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mc1r signaling. *Nature medicine*, 19(7), 924–929. <https://doi.org/10.1038/nm.3194>
- 29 Cotsarelis, G. (2006). Epithelial stem cells: A folliculocentric view. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(7), 1459–1468. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700376>
- 30 Covas, D. T., Panepucci, R. A., Fontes, A. M., Silva, W. A., Orellana, M. D., Freitas, M. C. C., Neder, L., Santos, A. R. D., Peres, L. C., Jamur, M. C., & Zago, M. A. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*, 36(5), 642–654. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.12.015>
- 31 Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P. N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badylak, S., Buhring, H. J., Jacobino, J. P., Lazzari, L., ... Péault, B. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
13. Crisostomo, P. R., Wang, Y., Markel, T. A., Wang, M., Lahm, T., & Meldrum, D. R. (2008). Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF κ B- but not JNK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 294(3), 675–682. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00437.2007>
- 32 da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I., & Nardi, N. B. (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 26(9), 2287–2299. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1122>
- 33 Daneshmandi, L., Shah, S., Jafari, T., Bhattacharjee, M., Momah, D., Saveh-Shemshaki, N., Lo, K. W. H., & Laurencin, C. T. (2020). Emergence of the Stem Cell Secretome in Regenerative *Engineering*. *Trends in Biotechnology*, 38(12), 1373–1384. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.04.013>

- 34 Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelt, B., & Traganos, F. (1996). Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry*, 25(1), 1–13. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960901\)25:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960901)25:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-N)
- 35 De Oliveira, V. C. C., Silva Dos Santos, D., Vairo, L., Kasaibrunswick, T. H., Pimentel, L. A. S., Carvalho, A. B., Campos De Carvalho, A. C., & dos Santos Goldenberg, R. C. (2017). Hair follicle-derived mesenchymal cells support undifferentiated growth of embryonic stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(5), 1779–1788. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4195>
- 36 de Windt, T. S., Vonk, L. A., Slaper-Cortenbach, I. C. M., van den Broek, M. P. H., Nizak, R., van Rijen, M. H. P., de Weger, R. A., Dhert, W. J. A., & Saris, D. B. F. (2017). Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cartilage Regeneration and Are Safe for Single-Stage Cartilage Repair in Humans upon Mixture with Recycled Autologous Chondrons. *Stem Cells*, 35(1), 256–264. <https://doi.org/10.1002/stem.2475>
- 37 Delfino-Machín, M., Chipperfield, T. R., Rodrigues, F. S. L. M., & Kelsh, R. N. (2007). The proliferating field of neural crest stem cells. *Developmental Dynamics*, 236(12), 3242–3254. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21314>
14. Dennis, J. E., & Charbord, P. (2002). Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem cells*, 20(3), 205–214. <https://doi.org/10.1634/stemcells.20-3-205>
- 38 Dennis, J. E., Haynesworth, S. E., Young, R. G., & Caplan, A. I. (1992). Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell transplantation*, 1(1), 23–32. <https://doi.org/10.1177/096368979200100106>
15. Denu, R. A., Nemcek, S., Bloom, D. D., Goodrich, A. D., Kim, J., Mosher, D. F., & Hematti, P. (2016). Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta haematologica*, 136(2), 85–97. <https://doi.org/10.1159/000445096>
- 39 Desai, V. D., Hsia, H. C., & Schwarzbauer, J. E. (2014). Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086865>
- 40 Dexheimer, V., Mueller, S., Braatz, F., & Richter, W. (2011). Reduced reactivation from dormancy but maintained lineage choice of human mesenchymal stem cells with donor age. *PLoS one*, 6(8), e22980.
- 41 Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Madrid, J. F., Acosta, E., Avila, J., Diaz-Flores, L., & Martin-Vasallo, P. (2012). Cell sources for cartilage repair; Contribution of the mesenchymal perivascular niche. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, 4 S(4), 1275–1294. <https://doi.org/10.2741/s331>
- 42 Doherty, M. J., & Canfield, A. E. (1999). Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- 43 Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- 44 Donnelly, H., Salmeron-Sanchez, M., & Dalby, M. J. (2018). Designing stem cell niches for differentiation and self-renewal. *Journal of the Royal Society Interface*, 15(145). <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0388>
- 45 Driskell, R. R., & Watt, F. M. (2015). Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in Cell Biology*, 25(2), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.001>
- 46 Driskell, R. R., Clavel, C., Rendl, M., & Watt, F. M. (2011). Hair follicle dermal papilla cells at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(8), 1179–1182. <https://doi.org/10.1242/jcs.082446>
- 47 Driskell, R. R., Lichtenberger, B. M., Hoste, E., Kretzschmar, K., Simons, B. D., Charalambous, M., Ferron, S. R., Heral, Y., Pavlovic, G., Ferguson-Smith, A. C., & Watt, F. M. (2013). Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*, 504(7479), 277–281. <https://doi.org/10.1038/nature12783>

- 48 Driskell, R. R., Lichtenberger, B. M., Hoste, E., Kretzschmar, K., Simons, B. D., Charalambous, M., Ferron, S. R., Herault, Y., Pavlovic, G., Ferguson-Smith, A. C., & Watt, F. M. (2013). Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*, 504(7479), 277–281. <https://doi.org/10.1038/nature12783>
16. Dupin, E., & Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: From early development to adulthood. *Developmental Biology*, 366(1), 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.02.035>
- 49 Ehninger, A., & Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: Mesenchymal stem cells and macrophages move in. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 421–428. <https://doi.org/10.1084/jem.20110132>
17. Eirin, A., Zhu, X. Y., Krier, J. D., Tang, H., Jordan, K. L., Grande, J. P., ... Lerman, L. O. (2012). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. *Stem cells*, 30(5), 1030–1041. <https://doi.org/10.1002/stem.1047>
18. Erices, A., Conget, P., & Minguell, J. J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British journal of haematology*, 109(1), 235–242. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x>
19. Faustini, M., Bucco, M., Chlapanidas, T., Lucconi, G., Marazzi, M., Tosca, M. C., ... & Torre, M. L. (2010). Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(6), 1515–1521.
20. Feng, J., Mantesso, A., De Bari, C., Nishiyama, A., & Sharpe, P. T. (2011). Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(16), 6503–6508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015449108>
21. Fernandes, T. L., Kimura, H. A., Pinheiro, C. C. G., Shimomura, K., Nakamura, N., Ferreira, J. R., Gomoll, A. H., Hernandez, A. J., & Bueno, D. F. (2018). Human synovial mesenchymal stem cells good manufacturing practices for articular cartilage regeneration. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 24(12), 709–716. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2018.0219>
22. Fisher M. (2009). Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke*, 40(3 Suppl), S13–S15. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.533117>
23. Fossett, E., & Khan, W. S. (2012). Optimising human mesenchymal stem cell numbers for clinical application: A literature review. *Stem Cells International*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/465259>
24. Freshney, R. I. (2006). *Basic principles of cell culture* (pp. 3-22). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
25. Friedenstein, A. J. (1995). Marrow Stromal Fibroblasts. *Calcified Tissue International*, 56, S17.
26. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4), 393-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
27. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., & Keiliss-Borok, I. V. (1974). Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of the Hemopoietic Tissues. In *Transplantation* (Vol. 17, Issue 4, pp. 331–340). <https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001>
28. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
29. Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 16(3), 381–390.
30. Fukuchi, Y., Nakajima, H., Sugiyama, D., Hirose, I., Kitamura, T., & Tsuji, K. (2004). Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells*, 22(5), 649-658. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-649>
31. Galipeau, J., Krampera, M., Barrett, J., Dazzi, F., Deans, R. J., DeBrujin, J., Dominici, M., Fibbe, W. E., Gee, A. P., Gimble, J. M., Hematti, P., Koh, M. B. C., LeBlanc, K., Martin, I., McNiece, I. K., Mendicino, M., Oh, S., Ortiz, L., Phinney, D. G., ... Sensebe, L. (2015). International Society for Cellular Therapy perspective on

- immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy*, 18(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.11.008>
32. Gallo, R., Gambelli, F., Gava, B., Sasdelli, F., Tellone, V., Masini, M., Marchetti, P., Dotta, F., & Sorrentino, V. (2007). Generation and expansion of multipotent mesenchymal progenitor cells from cultured human pancreatic islets. *Cell Death and Differentiation*, 14(11), 1860–1871. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402199>
 33. Garza, L. A., Yang, C. C., Zhao, T., Blatt, H. B., Lee, M., He, L., Stanton, D. C., Carrasco, L., Spiegel, J. H., Tobias, J. W., & Cotsarelis, G. (2011). Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 613–622. <https://doi.org/10.1172/JCI44478>
 34. Ge, W., Cheng, S. F., Dyce, P. W., De Felici, M., & Shen, W. (2016). Skin-derived stem cells as a source of primordial germ cell- and oocyte-like cells. *Cell Death and Disease*, 7(11), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.366>
 35. Gentile, P., Scioli, M. G., Bielli, A., De Angelis, B., Sio, C. De, De Fazio, D., Ceccarelli, G., Trivisonno, A., Orlandi, A., Cervelli, V., & Garcovich, S. (2019). Platelet-rich plasma and micrografts enriched with autologous human follicle mesenchymal stem cells improve hair re-growth in androgenetic alopecia. *Biomolecular pathway analysis and clinical evaluation. Biomedicines*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines7020027>
 36. Geske, F. J., Lieberman, R., Strange, R., & Gerschenson, L. E. (2001). Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death and Differentiation*, 8(2), 182–191. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400786>
 37. Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*, 100(9), 1249–1260. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>
 38. Gimeno, M. L., Fuentès, F., Barcala Tabarozzi, A. E., Attorressi, A. I., Cucchiani, R., Corrales, L., Oliveira, T. C., Sogayar, M. C., Labriola, L., Dewey, R. A., & Perone, M. J. (2017). Pluripotent Nontumorigenic Adipose Tissue-Derived Muse Cells have Immunomodulatory Capacity Mediated by Transforming Growth Factor- β 1. *Stem cells translational medicine*, 6(1), 161–173. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0014>
 39. González de la Rosa, C. y Beltrán Vargas, N. (2016). *Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos*. Tlalpan, Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana
 40. González, R., Moffatt, G., Hagner, A., Sinha, S., Shin, W., Rahmani, W., Chojnacki, A., & Biernaskie, J. (2017). Platelet-derived growth factor signaling modulates adult hair follicle dermal stem cell maintenance and self-renewal. *Npj Regenerative Medicine*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0013-4>
 41. Gregory, C. A., Reyes, E., Whitney, M. J., & Spees, J. L. (2006). Enhanced Engraftment of Mesenchymal Stem Cells in a Cutaneous Wound Model by Culture in Allogenic Species-Specific Serum and Administration in Fibrin Constructs. *Stem Cells*, 24(10), 2232–2243. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0612>
 42. Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., & Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), 531–535. <https://doi.org/10.1177/154405910208100806>
 43. Guilak, F., Lott, K. E., Awad, H. A., Cao, Q., Hicok, K. C., Fermor, B., & Gimble, J. M. (2006). Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 206(1), 229–237. <https://doi.org/10.1002/jcp.20463>
 44. Gunawardena, T. N. A., Masoudian, Z., Rahman, M. T., Ramasamy, T. S., Ramanathan, A., & Kasim, N. H. A. (2019). Dental derived stem cell conditioned media for hair growth stimulation. *PLoS ONE*, 14(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216003>
 45. Halfon, S., Abramov, N., Grinblat, B., & Ginis, I. (2011). Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells and Development*, 20(1), 53–66. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0040>
 46. Hamon, C., Henriksen-Lacey, M., La Porta, A., Rosique, M., Langer, J., Scarabelli, L., Montes, A. B. S., González-Rubio, G., de Pancorbo, M. M., Liz-Marzán, L. M., & Basabe-Desmonts, L. (2016). Tunable Nanoparticle and Cell Assembly Using Combined Self-Powered Microfluidics and Microcontact Printing. *Advanced Functional Materials*, 26(44), 8053–8061. <https://doi.org/10.1002/adfm.201602225>

47. Haniffa, M. A., Collin, M. P., Buckley, C. D., & Dazzi, F. (2009). Mesenchymal stem cells: The fibroblasts' new clothes? *Haematologica*, 94(2), 258–263. <https://doi.org/10.3324/haematol.13699>
48. Haniffa, M. A., Wang, X.-N., Holtick, U., Rae, M., Isaacs, J. D., Dickinson, A. M., Hilkens, C. M. U., & Collin, M. P. (2007). Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1595–1604. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1595>
49. Harper, R. A., & Grove, G. (1979). Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: Differences in growth potential in vitro. *Science*, 204(4392), 526–527. <https://doi.org/10.1126/science.432659>
50. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling: CCS*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
51. Haydont, V., Neiveyans, V., Perez, P., Busson, É., Lataillade, J. J., Asselineau, D., & Fortunel, N. O. (2020). Fibroblasts from the Human Skin Dermo-Hypodermal Junction are Distinct from Dermal Papillary and Reticular Fibroblasts and from Mesenchymal Stem Cells and Exhibit a Specific Molecular Profile Related to Extracellular Matrix Organization and Modeling. In *Cells* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/cells9020368>
52. Heino, T. J., Hentunen, T. A., & Väänänen, H. K. (2004). Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Experimental Cell Research*, 294(2), 458–468. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.11.016>
53. Heneidi, S., Simerman, A. A., Keller, E., Singh, P., Li, X., Dumesic, D. A., & Chazenbalk, G. (2013). Awakened by cellular stress: isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. *PloS one*, 8(6), e64752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064752>
54. Hermida-Gómez, T., Fuentes-Boquete, I., Gimeno-Longas, M. J., Muiños-López, E., Díaz-Prado, S., De Toro, F. J., & Blanco, F. J. (2011). Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes. *Journal of Rheumatology*, 38(2), 339–349. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100614>
55. Ho, J. H., Chen, Y.-F., Ma, W.-H., Tseng, T.-C., Chen, M.-H., & Lee, O. K. (2011). Cell Contact Accelerates Replicative Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells Independent of Telomere Shortening and p53 Activation: Roles of Ras and Oxidative Stress. *Cell Transplantation*, 20(8), 1209–1220. <https://doi.org/10.3727/0963689109x546562>
56. Hoogduijn, M. J., Gorjup, E., & Genever, P. G. (2006). Comparative characterization of hair follicle dermal stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, 15(1), 49–60. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.15.49>
57. Houlihan, D. D., Mabuchi, Y., Morikawa, S., Niibe, K., Araki, D., Suzuki, S., Okano, H., & Matsuzaki, Y. (2012). Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nature Protocols*, 7(12), 2103–2111. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.125>
58. Hu, M. S., Borrelli, M. R., Lorenz, H. P., Longaker, M. T., & Wan, D. C. (2018). Mesenchymal stromal cells and cutaneous wound healing: A comprehensive review of the background, role, and therapeutic potential. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6901983>
59. Huaiyu Mi, Dustin Ebert, Anushya Muruganujan, Caitlin Mills, Laurent-Philippe Albou, Tremayne Mushayamaha and Paul D Thomas *Nucl. Acids Res.* (2020) doi: 10.1093/nar/gkaa1106s.
60. Huang, G. T. J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Critical reviews in oral biology & medicine: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in Regenerative Medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
61. Huang, H. I., Chen, S. K., Ling, Q. D., Chien, C. C., Liu, H. T., & Chan, S. H. (2010). Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Eng Part A*, 16(5), 1491–1501. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0431>

62. Huang, J. I., Kazmi, N., Durbhakula, M. M., Hering, T. M., Yoo, J. U., & Johnstone, B. (2005). Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res*, 23(6), 1383–1389. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2005.03.008.1100230621>
63. Huang, S., Leung, V. Y., Long, D., Chan, D., Lu, W. W., Cheung, K. M., & Zhou, G. (2013). Coupling of small leucine-rich proteoglycans to hypoxic survival of a progenitor cell-like subpopulation in Rhesus Macaque intervertebral disc. *Biomaterials*, 34(28), 6548–6558. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.027>
64. Huang, Z., Godkin, O., & Schulze-Tanzil, G. (2017). The Challenge in Using Mesenchymal Stromal Cells for Recellularization of Decellularized Cartilage. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(1), 50–67. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9699-8>
65. Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuru, A., Yamaguchi, S., & Takahashi, T. A. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 6(6), 543–553. <https://doi.org/10.1080/14653240410005366-1>
66. Ito, M., & Sato, Y. (1990). Dynamic ultrastructural changes of the connective tissue sheath of human hair follicles during hair cycle. *Archives of Dermatological Research*, 282(7), 434–441. <https://doi.org/10.1007/BF00402618>
67. Ito, T., Itakura, S., Todorov, I., Rawson, J., Asari, S., Shintaku, J., Nair, I., Ferreri, K., Kandeel, F., & Mullen, Y. (2010). Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function. *Transplantation*, 89(12), 1438–1445. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181db09c4>
68. Izadpanah, R., Kaushal, D., Kriedt, C., Tsien, F., Patel, B., Dufour, J., & Bunnell, B. A. (2008). Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Research*, 68(11), 4229–4238. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5272>
69. Jahoda, C. A.B., Horne, K. A., & Oliver, R. F. (1984). Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature*, 311(5986), 560–562. <https://doi.org/10.1038/311560a0>
70. Jahoda, Colin A.B., & Reynolds, A. J. (2001). Hair follicle dermal sheath cells: Unsung participants in wound healing. *Lancet*, 358(9291), 1445–1448. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06532-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06532-1)
71. Jahoda, Colin A.B., Whitehouse, C. J., Reynolds, A. J., & Hole, N. (2003). Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Experimental Dermatology*, 12(6), 849–859. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2003.00161.x>
72. Jiang, S., Tian, G., Li, X., Yang, Z., Wang, F., Tian, Z., Huang, B., Wei, F., Zha, K., Sun, Z., Sui, X., Liu, S., Guo, W., & Guo, Q. (2021). Research Progress on Stem Cell Therapies for Articular Cartilage Regeneration. *Stem Cells International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8882505>
73. Jiang, X. X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S. X., Wu, Y., Yu, X. D., & Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105(10), 4120–4126. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0586>
74. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., ... Verfaillie CM. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), 41–49. <https://doi.org/10.1038/nature00870>
75. Jinnai, I., Bessho, M., Murohashi, I., Nara, N., & Hirashima, K. Relationship between fibroblastoid colony-forming units (CFU-f) and hemopoietic precursor cells in normal human bone marrow. (1984). *Int J Cell Cloning*, 2(6), 341–347. <https://doi.org/10.1002/stem.5530020602>
76. Jinno, H., Morozova, O., Jones, K. L., Biernaskie, J. A., Paris, M., Hosokawa, R., Rudnicki, M. A., Chai, Y., Rossi, F., Marra, M. A., & Miller, F. D. (2010). Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins. *Stem Cells*, 28(11), 2027–2040. <https://doi.org/10.1002/stem.525>
77. Jones, E. A., English, A., Henshaw, K., Kinsey, S. E., Markham, A. F., Emery, P., & McGonagle, D. (2004). Enumeration and Phenotypic Characterization of Synovial Fluid Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells in Inflammatory and Degenerative Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 50(3), 817–827. <https://doi.org/10.1002/art.20203>

78. Joseph, A., Baiju, I., Bhat, I. A., Pandey, S., Bharti, M., Verma, M., Pratap Singh, A., Ansari, M. M., Chandra, V., Saikumar, G., Amarpal, & Taru Sharma, G. (2020). Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, 235(7–8), 5555–5569. <https://doi.org/10.1002/jcp.29486>
79. Junker, J. P. E., Sommar, P., Skog, M., Johnson, H., & Kratz, G. (2010). Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of clonally derived human dermal fibroblasts. *Cells Tissues Organs*, 191(2), 105–118. <https://doi.org/10.1159/000232157>
80. Kang, H. K., Min, S. K., Jung, S. Y., Jung, K., Jang, D. H., Kim, O. B., Chun, G. S., Lee, Z. H., & Min, B. M. (2011). The potential of mouse skin-derived precursors to differentiate into mesenchymal and neural lineages and their application to osteogenic induction in vivo. *International Journal of Molecular Medicine*, 28(6), 1001–1011. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.785>
81. Kang, Y., Zhu, Z., Zheng, Y., Wan, W., Manole, C. G., & Zhang, Q. (2015). Skin telocytes versus fibroblasts: Two distinct dermal cell populations. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(11), 2530–2539. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12671>
82. Kessler J.A. (2014). Applications of stem cell biology in clinical medicine. Kasper D, & Fauci A, & Hauser S, & Longo D, & Jameson J, & Loscalzo J(Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 19e. McGraw Hill. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1130§ionid=63653377>
83. Khunkhet, S., Chanprapaph, K., Rutnin, S., & Suchonwanit, P. (2021). Histopathological Evidence of Occipital Involvement in Male Androgenetic Alopecia. *Frontiers in Medicine*, 8(November), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.790597>
84. Kiani, M. T., Higgins, C. A., & Almquist, B. D. (2018). The Hair Follicle: An Underutilized Source of Cells and Materials for Regenerative Medicine. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(4), 1193–1207. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.7b00072>
85. Kim, K., Bou-Ghannam, S., Thorp, H., Grainger, D. W., & Okano, T. (2019). Human mesenchymal stem cell sheets in xeno-free media for possible allogenic applications. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50430-7>
86. Kiseleva, E. V., Chermnykh, E. S., Vorotelyak, E. A., Volozhin, A. I., Vasiliev, A. V., & Terskikh, V. V. (2009). Differentiation capacity of stromal fibroblast-like cells from human bone marrow, adipose tissue, hair follicle dermal papilla and derma. *Cell and Tissue Biology*, 3(1), 42–49. <https://doi.org/10.1134/S1990519X09010064>
87. Knoepfler, P. S. (2009). Deconstructing stem cell tumorigenicity: A roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*, 27(5), 1050–1056. <https://doi.org/10.1002/stem.37>
88. Komori T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of cellular biochemistry*, 99(5), 1233–1239. <https://doi.org/10.1002/jcb.20958>
89. Kundrotas G. (2012). Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Acta Medica Lituanica*, 19(2), 75–79. <https://doi.org/10.6001/actamedica.v19i2.2313>
90. Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y., Makinoshima, H., Goda, M., Akashi, H., Inutsuka, A., Niwa, A., Shigemoto, T., Nabeshima, Y., Nakahata, T., Nabeshima, Y., Fujiyoshi, Y., & Dezawa, M. (2010). Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8639–8643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911647107>
91. Kuroda, Y., Wakao, S., Kitada, M., Murakami, T., Nojima, M., & Dezawa, M. (2013). Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nature Protocols*, 8(7), 1391–1415. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.076>
92. Kuznetsov, S. A., Krebsbach, P. H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., & Robey, P. G. (1997). Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(9), 1335–1347. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.9.1335>

93. L., P. K., Kandoi, S., Misra, R., S., V., K., R., & Verma, R. S. (2019). The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 46(February), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>
94. Lavoie, J. F., Biernaskie, J. A., Chen, Y., Bagli, D., Alman, B., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2009). Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem Cells and Development*, 18(6), 893–905. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0260>
95. Li, H., Shen, S., Fu, H., Wang, Z., Li, X., Sui, X., Yuan, M., Liu, S., Wang, G., & Guo, Q. (2019). Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Stem Cells International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9671206>
96. Lichti, U., Weinberg, W. C., Goodman, L., Ledbetter, S., Dooley, T., Morgan, D., & Yuspa, S. H. (1993). In vivo regulation of murine hair growth: Insights from grafting defined cell populations onto nude mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 101(1 SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/0022-202X\(93\)90512-G](https://doi.org/10.1016/0022-202X(93)90512-G)
97. Lim, J., Ng, K. J., & Clavel, C. (2019). Dermal papilla regulation of hair growth and pigmentation. In *Advances in Stem Cells and their Niches* (1st ed., Vol. 3). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.asn.2019.06.002>
98. Liu, J. Y., Peng, H. F., Gopinath, S., Tian, J., & Andreadis, S. T. (2010). Derivation of functional smooth muscle cells from multipotent human hair follicle mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part A*, 16(8), 2553–2564. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0833>
99. Liu, Q., Wang, J., Chen, Y., Zhang, Z., Saunders, L., Schipani, E., Chen, Q., & Ma, P. X. (2018). Suppressing mesenchymal stem cell hypertrophy and endochondral ossification in 3D cartilage regeneration with nanofibrous poly(l-lactic acid) scaffold and matrilin-3. *Acta biomaterialia*, 76, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.027>
100. Lorenz, K., Sicker, M., Schmelzer, E., Rupf, T., Salvetter, J., Schulz-Siegmund, M., & Bader, A. (2008). Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Experimental Dermatology*, 17(11), 925–932. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00724.x>
101. Lv, F. J., Tuan, R. S., Cheung, K. M. C., & Leung, V. Y. L. (2014). Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 32(6), 1408–1419. <https://doi.org/10.1002/stem.1681>
102. Lynch, M. D., & Watt, F. M. (2018). Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 128(1), 26–35. <https://doi.org/10.1172/JCI93555>
103. Lyublinskaya, O. G., Borisov, Y. G., Pugovkina, N. A., Smirnova, I. S., Obidina, J. V., Ivanova, J. S., Zenin, V. V., Shatrova, A. N., Borodkina, A. V., Aksenov, N. D., Zemelko, V. I., Burova, E. B., Puzanov, M. V., & Nikolsky, N. N. (2015). Reactive oxygen species are required for human mesenchymal stem cells to initiate proliferation after the quiescence exit. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/502105>
104. Ma, D., Lee, S. T., & Chua, A. W. C. (2019). Isolation and culture of hair follicle dermal sheath mesenchymal stromal cells. *Methods in Molecular Biology*, 1993, 61–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9473-1_5
105. Mabuchi, Y., Morikawa, S., Harada, S., Niibe, K., Suzuki, S., Renault-Mihara, F., Houlihan, D. D., Akazawa, C., Okano, H., & Matsuzaki, Y. (2013). LNGFR+THY-1+VCAM-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports*, 1(2), 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.06.001>
106. Manole, C. G., & Simionescu, O. (2016). The cutaneous telocytes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 913, 303–323. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1061-3_20
107. Manuguerra-Gagné, R., Boulos, P. R., Ammar, A., Leblond, F. A., Krosi, G., Pichette, V., Lesk, M. R., & Roy, D. C. (2013). Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment. *Stem Cells*, 31(6), 1136–1148. <https://doi.org/10.1002/stem.1364>
108. Mao, Y., Xiong, L., Wang, S., Zhong, J., Zhou, R., & Li, L. (2015). Comparison of the transcriptomes of mouse skin derived precursors (SKPs) and SKP-Derived Fibroblasts (SFBs) by RNA-Seq. *PLoS ONE*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117739>

109. Maredziak, M., Marycz, K., Tomaszewski, K. A., Kornicka, K., & Henry, B. M. (2016). The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2152435>
110. Mareschi, K., Biasin, E., Piacibello, W., Aglietta, M., Madon, E., & Fagioli, F. (2001). Isolation of human mesenchymal stem cells: Bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*, 86(10), 1099–1100.
111. Martin-Rendon, E., Sweeney, D., Lu, F., Girdlestone, J., Navarrete, C., & Watt, S. M. (2008). 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sanguinis*, 95(2), 137–148. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2008.01076.x>
112. Mascotti, K., Mccullough, J., & Burger, S. R. (2000). B l o o d c o m p o n e n t s. 40(June), 693–696.
113. Matthyssen, S., Ní Dhubhghaill, S., Van Gerwen, V., & Zakaria, N. (2017). Xeno-free cultivation of mesenchymal stem cells from the corneal stroma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(5), 2659–2665. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21676>
114. Maxson, S., & Burg, K. J. L. (2010). Conditioned media enhance osteogenic differentiation on poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)/hydroxyapatite scaffolds and chondrogenic differentiation in Alginate. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 21(11), 1441–1458. <https://doi.org/10.1163/092050609X12518804794703>
115. McElwee, K. J., Kissling, S., Wenzel, E., Huth, A., & Hoffmann, R. (2003). Cultured Peribulbar Dermal Sheath Cells Can Induce Hair Follicle Development and Contribute to the Dermal Sheath and Dermal Papilla. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(6), 1267–1275. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1747.2003.12568.x>
116. McKenzie, I. A., Biernaskie, J., Toma, J. G., Midha, R., & Miller, F. D. (2006). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *Journal of Neuroscience*, 26(24), 6651–6660. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1007-06.2006>
117. Messenger, A.G., de Berker, D.A.R. and Sinclair, R.D. (2010). Disorders of Hair. In Rook's Textbook of Dermatology (eds T. Burns, S. Breathnach, N. Cox and C. Griffiths). <https://doi.org/10.1002/9781444317633.ch66>
118. Miao, Z., Jin, J., Chen, L., Zhu, J., Huang, W., Zhao, J., Qian, H., & Zhang, X. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell biology international*, 30(9), 681–687. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.03.009>
119. Millar, S. E. (2002). Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(2), 216–225. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01670.x>
120. Mills, S., Cowin, A., & Kaur, P. (2013). Pericytes, Mesenchymal Stem Cells and the Wound Healing Process. *Cells*, 2(3), 621–634. <https://doi.org/10.3390/cells2030621Na>, G. Y., Paek, S. H., Park, B. C., Kim, D. W., Lee, W. J., Lee, S. J., Kim, M. K., & Kim, J. C. (2006). Isolation and characterization of outer root sheath melanocytes of human hair follicles. *British Journal of Dermatology*, 155(5), 902–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07502.x>
121. Mistriotis, P., & Andreadis, S. T. (2013). Hair follicle: A novel source of multipotent stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 19(4), 265–278. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0422>
122. Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., & Gimble, J. M. (2006). Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem Cells*, 24(2), 376–385. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0234>
123. Mitrofanova, L., Hazratov, A., Galkovsky, B., Gorshkov, A., Bobkov, D., Gulyaev, D., & Shlyakhto, E. (2020). Morphological and immunophenotypic characterization of perivascular interstitial cells in human glioma: Telocytes, pericytes, and mixed immunophenotypes. *Oncotarget*, 11(4), 322–346. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27340>
124. Mohanty, S., Kakkar, A., & Singh, M. (2015). Biological Basis and Molecular Mechanism of Regeneration. June 2017.

125. Mokbel, A. N., El Tookhy, O. S., Shamaa, A. A., Rashed, L. A., Sabry, D., & El Sayed, A. M. (2011). Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-12-259>
126. Morgan, B. A. (2014). The dermal papilla: An instructive niche for epithelial stem and progenitor cells in development and regeneration of the hair follicle. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015180>
127. Mueller, M. B., & Tuan, R. S. (2008). Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis and Rheumatism*, 58(5), 1377–1388. <https://doi.org/10.1002/art.23370>
128. Mull, A. N., Zolekar, A., & Wang, Y. C. (2015). Understanding melanocyte stem cells for disease modeling and regenerative medicine applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 30458–30469. <https://doi.org/10.3390/ijms161226207>
129. Murgia, A., Veronesi, E., Candini, O., Caselli, A., D'Souza, N., Rasini, V., Giorgini, A., Catani, F., Iughetti, L., Dominici, M., & Burns, J. S. (2016). Potency biomarker signature genes from multiparametric osteogenesis assays: Will cGMP human bone marrow mesenchymal stromal cells make bone? *PLoS ONE*, 11(10), 1–32. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163629>
130. Naji, A., Eitoku, M., Favier, B., Deschaseaux, F., Rouas-Freiss, N., & Suganuma, N. (2019). Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(17), 3323–3348. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03125-1>
131. Nekanti, U., Mohanty, L., Venugopal, P., Balasubramanian, S., Totey, S., & Ta, M. (2010). Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Research*, 5(3), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.08.005>
132. Neuhuber, B., Swanger, S. A., Howard, L., Mackay, A., & Fischer, I. (2008). Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Experimental hematology*, 36(9), 1176–1185. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.03.019>
133. Nilforoushzadeh, M. A., Zare, M., Zarrintaj, P., Alizadeh, E., Taghiabadi, E., Heidari-Kharaji, M., Amirkhani, M. A., Saeb, M. R., & Mozafari, M. (2019). Engineering the niche for hair regeneration — A critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 15(1), 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.08.012>
134. Nishimura, E. K., Jordan, S. A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I. J., Barrandon, Y., Miyachit, Y., & Nishikawa, S. I. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature*, 416(6883), 854–860. <https://doi.org/10.1038/416854a>
135. Noden, D. M., & Trainor, P. A. (2005). Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *Journal of Anatomy*, 207(5), 575–601. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00473.x>
136. Nöth, U., Steinert, A. F., & Tuan, R. S. (2008). Technology Insight: Adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 4(7), 371–380. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0816>
137. Ogura, F., Wakao, S., Kuroda, Y., Tsuchiyama, K., Bagheri, M., Heneidi, S., Chazenbalk, G., Aiba, S., & Dezawa, M. (2014). Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem cells and development*, 23(7), 717–728. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0473>
138. Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K., & Barrandon, Y. (2001). Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, 104(2), 233–245. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00208-2)
139. Owen M, Friedenstien AJ (1988) Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136:42–60
140. Pae, A., Lee, H., Noh, K., & Woo, Y. H. (2014). Cell attachment and proliferation of bone marrow-derived osteoblast on zirconia of various surface treatment. *Journal of Advanced Prosthodontics*, 6(2), 96–102. <https://doi.org/10.4047/jap.2014.6.2.96>

141. Paquet-Fifield, S., Schlüter, H., Li, A., Aitken, T., Gangatirkar, P., Blashki, D., Koelmeyer, R., Pouliot, N., Palatsides, M., Ellis, S., Brouard, N., Zannettino, A., Saunders, N., Thompson, N., Li, J., & Kaur, P. (2009). A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2795–2806. <https://doi.org/10.1172/JCI38535>
142. Park, J. C., Kim, J. M., Jung, I. H., Kim, J. C., Choi, S. H., Cho, K. S., & Kim, C. S. (2011). Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: In vitro and in vivo evaluations. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(8), 721–731. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01716.x>
143. Pasolli, H. A., Rgan, C. O. M. I. N. I., Low, F. O. R. S., Dult, Y. A., & Ells, S. T. E. M. C. (2011). Microscopy Microanalysis The Hair Follicle Bulge : A Niche for Adult Stem Cells. 513–519.
144. Patel, A. N., Park, E., Kuzman, M., Benetti, F., Silva, F. J., & Allickson, J. G. (2008). Multipotent menstrual blood stromal stem cells: Isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplantation*, 17(3), 303–311. <https://doi.org/10.3727/096368908784153922>
145. Pawitan, J. A. (2014). Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in. *BioMed Research International*, 2014, 7–9.
146. Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B. G., Aigner, T., & Richter, W. (2006). Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis and Rheumatism*, 54(10), 3254–3266. <https://doi.org/10.1002/art.22136>
147. Peltz, L., Gomez, J., Marquez, M., Alencastro, F., Atashpanjeh, N., Quang, T., Bach, T., & Zhao, Y. (2012). Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037162>
148. Petrenko, Y., Vackova, I., Kekulova, K., Chudickova, M., Koci, Z., Turnovcova, K., Kupcova Skalnikova, H., Vodicka, P., & Kubinova, S. (2020). A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z>
149. Phinney, D. G., & Pittenger, M. F. (2017). Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 35(4), 851–858. <https://doi.org/10.1002/stem.2575>
150. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
151. Ponce, L., Heintz, F., Schäfer, I., Klusch, A., Holloschi, A., Schmelz, M., Petersen, M., & Hafner, M. (2017). Isolation and cultivation of primary keratinocytes from piglet skin for compartmentalized co-culture with dorsal root ganglion neurons. *Journal of Cellular Biotechnology*, 2(2), 93–115. <https://doi.org/10.3233/jcb-15030>
152. Popescu, L. M., & Fausone-Pellegrini, M. S. (2010). TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 729–740. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01059.x>
153. Pretzel, D., Linss, S., Rochler, S., Endres, M., Kaps, C., Alsalameh, S., & Kinne, R. W. (2011). Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage. *Arthritis research & therapy*, 13(2), R64. <https://doi.org/10.1186/ar3320>
154. Prockop, D. J., & Youn Oh, J. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Molecular Therapy*, 20(1), 14–20. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.211>
155. Raghuram, A. C., Yu, R. P., Lo, A. Y., Sung, C. J., Bircan, M., Thompson, H. J., & Wong, A. K. (2020). Role of stem cell therapies in treating chronic wounds: A systematic review. *World Journal of Stem Cells*, 12(7), 659–675. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i7.659>
156. Rahmani, W., Abbasi, S., Hagner, A., Raharjo, E., Kumar, R., Hotta, A., Magness, S., Metzger, D., & Biernaskie, J. (2014). Hair Follicle Dermal Stem Cells Regenerate the Dermal Sheath, Repopulate the Dermal Papilla,

- and Modulate Hair Type. *Developmental Cell*, 31(5), 543–558. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.022>
157. Rando, T. A. (2006). Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*, 441(7097), 1080–1086. <https://doi.org/10.1038/nature04958>
158. Ray, R., Novotny, N. M., Crisostomo, P. R., Lahm, T., Abarbanell, A., & Meldrum, D. R. (2008). Sex steroids and stem cell function. *Molecular Medicine*, 14(7–8), 493–501. <https://doi.org/10.2119/2008-00004.Ray>
159. Rendl, M., Lewis, L., & Fuchs, E. (2005). Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle. *PLoS Biology*, 3(11), 1910–1924. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030331>
160. Rippa, A. L., Kalabusheva, E. P., & Vorotelyak, E. A. (2019). Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*, 8(6), 607. <https://doi.org/10.3390/cells8060607>
161. Risau, W., & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 11, 73–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.000445>
162. Romaldini, A., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., & Descalzi, F. (2018). Platelet lysate activates human subcutaneous adipose tissue cells by promoting cell proliferation and their paracrine activity toward epidermal keratinocytes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(December), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00203>
163. Rompolas, P., & Greco, V. (2014). Stem cell dynamics in the hair follicle niche. *Seminars in cell & developmental biology*, 25–26, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.12.005>
164. Rusu, M. C., Mirancea, N., Mănoiu, V. S., Vâlcu, M., Nicolescu, M. I., & Păduraru, D. (2012). Skin telocytes. *Annals of Anatomy*, 194(4), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.11.007>
165. Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M., & Bianco, P. (2007). Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*, 131(2), 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>
166. Sadler, T. W., & Langman, J. (2012). *Langman's medical embryology* (12th ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
167. Sanches, B. D. A., Maldarine, J. D. S., Tamarindo, G. H., Da Silva, A. D. T., Lima, M. L. D., Rahal, P., Góes, R. M., Taboga, S. R., & Carvalho, H. F. (2020). Explant culture: A relevant tool for the study of telocytes. *Cell Biology International*, 44(12), 2395–2408. <https://doi.org/10.1002/cbin.11446>
168. Sánchez-Guijo, F., Caballero-Velázquez, T., López-Villar, O., Redondo, A., Parody, R., Martínez, C., Olavarría, E., Andreu, E., Prósper, F., Díez-Campelo, M., Regidor, C., Villaron, E., López-Corral, L., Caballero, D., Cañizo, M. C. del, & Pérez-Simon, J. A. (2014). Sequential Third-Party Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 20(10), 1580–1585. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.06.015>
169. Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M., & Davies, J. E. (2005). Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells*, 23(2), 220–229. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0166>
170. Sato, T., Wakao, S., Kushida, Y., Tatsumi, K., Kitada, M., Abe, T., Niizuma, K., Tominaga, T., Kushimoto, S., & Dezawa, M. (2020). A Novel Type of Stem Cells Double-Positive for SSEA-3 and CD45 in Human Peripheral Blood. *Cell Transplantation*, 29, 1–16. <https://doi.org/10.1177/0963689720923574>
171. Schneider, M. R., Schmidt-Ullrich, R., & Paus, R. (2009). The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Current Biology*, 19(3), R132–R142. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.005>
172. Schwab, K. E., Hutchinson, P., & Gargett, C. E. (2008). Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 23(4), 934–943. <https://doi.org/10.1093/humrep/den051>

173. Seeberger, K. L., Dufour, J. M., James Shapiro, A. M., Lakey, J. R. T., Rajotte, R. V., & Korbitt, G. S. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Laboratory Investigation*, 86(2), 141–153. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700377>
174. Shen, C., Yang, C., Xu, S., & Zhao, H. (2019). Comparison of osteogenic differentiation capacity in mesenchymal stem cells derived from human amniotic membrane (AM), umbilical cord (UC), chorionic membrane (CM), and decidua (DC). *Cell and Bioscience*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0281-3>
175. Shu, B., Xie, J. L., Xu, Y. Bin, Yu, J. X., Shi, Y., Liu, J., Wang, P., Liu, X. S., & Qi, S. H. (2014). Directed differentiation of skin-derived precursors into fibroblast-like cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(4), 1478–1486.
176. Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(6), 1380–1389. <https://doi.org/10.1002/stem.1661>
177. Sieber-Blum, M., Grim, M., Hu, Y. F., & Szeder, V. (2004). Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Developmental Dynamics*, 231(2), 258–269. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20129>
178. Silva, K. R., Liechocki, S., Carneiro, J. R., Claudio-Da-Silva, C., Maya-Monteiro, C. M., Borojevic, R., & Baptista, L. S. (2015). Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0029-x>
179. Smith, A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441, 1060 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature04954>
180. Soma, T., Kishimoto, J., & Fisher, D. (2013). Isolation of mesenchymal stem cells from human dermis. *Methods in Molecular Biology*, 989, 265–274. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-330-5_20
181. Soundararajan, M., & Kannan, S. (2018). Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9099–9109. <https://doi.org/10.1002/jcp.26860>
182. Sowa, Y., Imura, T., Numajiri, T., Takeda, K., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., & Nishino, K. (2013). Adipose stromal cells contain phenotypically distinct adipogenic progenitors derived from neural crest. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084206>
183. Sriram, G., Bigliardi, P. L., & Bigliardi-Qi, M. (2015). Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *European Journal of Cell Biology*, 94(11), 483–512. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.08.001>
184. Stoddart, M. J., Bara, J., & Alini, M. (2015). Cells and secretome - towards endogenous cell re-activation for cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.007>
185. Sun, D., Yang, L., Cao, H., Shen, Z. Y., & Song, H. L. (2020). Study of the protective effect on damaged intestinal epithelial cells of rat multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Cell Biology International*, 44(2), 549–559. <https://doi.org/10.1002/cbin.11255>
186. Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A. G., & Nishikawa, S. I. (2007). Neuroepithelial Cells Supply an Initial Transient Wave of MSC Differentiation. *Cell*, 129(7), 1377–1388. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.028>
187. Tang, W., Zeve, D., Suh, J. M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R. E., Tallquist, M. D., & Graff, J. M. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*, 322(5901), 583–586. <https://doi.org/10.1126/science.1156232>
188. Taylor, C. G., Dayment, R. N., Albanna, M. Z., & Woods, E. J. (2014). Applications of cook human platelet lysate in cell therapy. *Cytotherapy*, 16(4), S95. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.01.354>
189. Tobin DJ, Gunin A, Magerl M, Handijski B, Paus R. Plasticity and cytokinetic dynamics of the hair follicle mesenchyme: implications for hair growth control. *J Invest Dermatol*. 2003 Jun;120(6):895-904. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12237.x.

190. Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J. L., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*, 3(9), 778–784. <https://doi.org/10.1038/ncb0901-778>
191. Toma, J. G., McKenzie, I. A., Bagli, D., & Miller, F. D. (2005). Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin. *Stem Cells*, 23(6), 727–737. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0134>
192. Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Mortier, C., Bron, D., & Lagneaux, L. (2005). Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity. *Stem Cells*, 23(8), 1105–1112. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0330>
193. Triana-Martínez, F., Loza, M. I., & Domínguez, E. (2020). Beyond Tumor Suppression: Senescence in Cancer Stemness and Tumor Dormancy. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cells9020346>
194. Tumber, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W. E., Rendl, M., & Fuchs, R. (2004). Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science*, 303(5656), 359–363. <https://doi.org/10.1126/science.1092436>
195. Vaculik, C., Schuster, C., Bauer, W., Iram, N., Pfisterer, K., Kramer, G., Reinisch, A., Strunk, D., & Elbe-Bürger, A. (2012). Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3 PART 1), 563–574. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.355>
196. Vado Y, Puras G, Rosique M, Martin C, Pedraz JL, Jebari-Benslaiman S, de Pancorbo MM, Zarate J, Perez de Nanclares G. (2021). Design and Validation of a Process Based on Cationic Niosomes for Gene Delivery into Novel Urine-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Pharmaceutics*. 13(5):696. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050696>
197. Vapniarsky, N., Arzi, B., Hu, J. C., Nolta, J. A., & Athanasiou, K. A. (2015). Concise Review: Human Dermis as an Autologous Source of Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(10), 1187–1198. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0084>
198. Vargas, N., & González, C. (2016). Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos.
199. Vasyliiev, R. G., Rodnichenko, A. E., Gubar, O. S., Zlatska, A. V., Gordiienko, I. M., Novikova, S. N., & Zubov, D. O. (2017). Large-scale expansion and characterization of human adult neural crest-derived multipotent stem cells from hair follicle for regenerative medicine applications. *Experimental Oncology*, 39(3), 171–180. [https://doi.org/10.31768/2312-8852.2017.39\(3\):171-180](https://doi.org/10.31768/2312-8852.2017.39(3):171-180)
200. Vasyliiev, Roman G., Gubar, O. S., Gordiienko, I. M., Litvinova, L. S., Rodnichenko, A. E., Shupletsova, V. V., Zlatska, A. V., Yurova, K. A., Todosenko, N. M., Khadzhynova, V. E., Shulha, M. V., Novikova, S. N., & Zubov, D. O. (2019). Comparative Analysis of Biological Properties of Large-Scale Expanded Adult Neural Crest-Derived Stem Cells Isolated from Human Hair Follicle and Skin Dermis. *Stem Cells International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9640790>
201. Veraitch, O., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., Sasaki, T., Okuno, H., Tsukashima, A., Amagai, M., Okano, H., & Ohyama, M. (2017). Induction of hair follicle dermal papilla cell properties in human induced pluripotent stem cell-derived multipotent LNGFR(+)THY-1(+) mesenchymal cells. *Scientific Reports*, 7(February), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42777>
202. Visvader, J. E., & Clevers, H. (2016). Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nature Cell Biology*, 18(4), 349–355. <https://doi.org/10.1038/ncb3332>
203. Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
204. Vunjak-Novakovic, G., & Freshney, R. I. (2006). *Culture of cells for tissue engineering*. John Wiley & Sons, Inc.
205. Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Shigemoto, T., Matsuse, D., Akashi, H., Tanimura, Y., Tsuchiyama, K., Kikuchi, T., Goda, M., Nakahata, T., Fujiyoshi, Y., & Dezawa, M. (2011). Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(24), 9875–9880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100816108>

206. Wakao, S., Kushida, Y., & Dezawa, M. (2018). Basic characteristics of muse cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1103, 13–41. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56847-6_2
207. Walker, J. V., Zhuang, H., Singer, D., Illsley, C. S., Kok, W. L., Sivaraj, K. K., Gao, Y., Bolton, C., Liu, Y., Zhao, M., Grayson, P. R. C., Wang, S., Karbanová, J., Lee, T., Ardu, S., Lai, Q., Liu, J., Kassem, M., Chen, S., ... Hu, B. (2019). Transit amplifying cells coordinate mouse incisor mesenchymal stem cell activation. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11611-0>
208. Wang, B., Liu, X. M., Liu, Z. N., Wang, Y., Han, X., Lian, A. B., Mu, Y., Jin, M. H., & Liu, J. Y. (2020). Human hair follicle-derived mesenchymal stem cells: Isolation, expansion, and differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 12(6), 462–470. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V12.I6.462>
209. Wang, Y., Liu, J., Tan, X., Li, G., Gao, Y., Liu, X., Zhang, L., & Li, Y. (2013). Induced Pluripotent Stem Cells from Human Hair Follicle Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(4), 451–460. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9420-5>
210. Waters, J. M., Richardson, G. D., & Jahoda, C. A. B. (2007). Hair follicle stem cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18(2), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.02.003>
211. Wong, A. P., Bear, C. E., Chin, S., Pasceri, P., Thompson, T. O., Huan, L. J., Ratjen, F., Ellis, J., & Rossant, J. (2012). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nature biotechnology*, 30(9), 876–882. <https://doi.org/10.1038/nbt.2328>
212. Wong, C. E., Paratore, C., Dours-Zimmermann, M. T., Rochat, A., Pietri, T., Suter, U., Zimmermann, D. R., Dufour, S., Thiery, J. P., Meijer, D., Beermann, F., Barrandon, Y., & Sommer, L. (2006). Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *Journal of Cell Biology*, 175(6), 1005–1015. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606062>
213. Wong, V. W., Levi, B., Rajadas, J., Longaker, M. T., & Gurtner, G. C. (2012). Stem cell niches for skin regeneration. *International Journal of Biomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/926059>
214. Wrage, P. C., Tran, T., To, K., Keefer, E. W., Ruhn, K. A., Hong, J., Hattangadi, S., Traviño, I., & Tansey, M. G. (2008). The neuro-glial properties of adipose-derived adult stromal (ADAS) cells are not regulated by Notch 1 and are not derived from neural crest lineage. *PLoS ONE*, 3(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001453>
215. Wright Muelas, M., Ortega, F., Breitling, R., Bendtsen, C., & Westerhoff, H. V. (2018). Rational cell culture optimization enhances experimental reproducibility in cancer cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21050-4>
216. Wu, J. J., Liu, R. Q., Lu, Y. G., Zhu, T. Y., Cheng, B., & Men, X. (2005). Enzyme digestion to isolate and culture human scalp dermal papilla cells: A more efficient method. *Archives of Dermatological Research*, 297(2), 60–67. <https://doi.org/10.1007/s00403-005-0554-z>
217. Xiong, J., Menicanin, D., Zilm, P. S., Marino, V., Bartold, P. M., & Gronthos, S. (2016). Investigation of the Cell Surface Proteome of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1947157>
218. Yamanishi, H., Fujiwara, S., & Soma, T. (2012). Perivascular localization of dermal stem cells in human scalp. *Experimental Dermatology*, 21(1), 78–80. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01407.x>
219. Yang, C. C., & Cotsarelis, G. (2010). Review of hair follicle dermal cells. *Journal of dermatological science*, 57(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.11.005>
220. Yang, F., Leung, V. Y. L., Luk, K. D. K., Chan, D., & Cheung, K. M. C. (2009). Mesenchymal stem cells arrest intervertebral disc degeneration through chondrocytic differentiation and stimulation of endogenous cells. *Molecular Therapy*, 17(11), 1959–1966. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.146>
221. Yang, X. F., He, X., He, J., Zhang, L. H., Su, X. J., Dong, Z. Y., Xu, Y. J., Li, Y., & Li, Y. L. (2011). High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical science*, 18(1), 59. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-59>
222. Yang, Z. X., Han, Z. B., Ji, Y. R., Wang, Y. W., Liang, L., Chi, Y., Yang, S. G., Li, L. N., Luo, W. F., Li, J. P., Chen, D. D., Du, W. J., Cao, X. C., Zhuo, G. S., Wang, T., & Han, Z. C. (2013). CD106 identifies a subpopulation of

- mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *PLoS one*, 8(3), e59354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059354>
223. Yu, H., Kumar, S. M., Kossenkov, A. V., Showe, L., & Xu, X. (2010). Stem cells with neural crest characteristics derived from the bulge region of cultured human hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(5), 1227–1236. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.322>
224. Zhang, L. F., Qi, J., Zuo, G. L., Jia, P., Shen, X., Shao, J., Kang, H., Yang, H. L., & Deng, L. F. (2014). Osteoblast-secreted factors promote proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells via VEGF/heme-oxygenase-1 pathway. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099946>
225. Zhang, X., Wang, Y., Gao, Y., Liu, X., Bai, T., Li, M., Li, L., Chi, G., Xu, H., Liu, F., Liu, J. Y., & Li, Y. (2013). Maintenance of high proliferation and multipotent potential of human hair follicle-derived mesenchymal stem cells by growth factors. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(4), 913–921. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1272>
226. Zhang, Y.; McNeill, E.; Tian, H.; Soker, S.; Andersson, K.-E.; Yoo, J.J.; Atala, A. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J. Urol.* **2008**, 180, 2226–2233.
227. Zheng, Y., Zhang, M., Qian, M., Wang, L., Cismasiu, V. B., Bai, C., Popescu, L. M., & Wang, X. (2013). Genetic comparison of mouse lung telocytes with mesenchymal stem cells and fibroblasts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(4), 567–577. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12052>
228. Zhong, S., He, X., Li, Y., & Lou, X. (2019). Conditioned Medium Enhances Osteogenic Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(2), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0173-3>
229. Zhou, S., Greenberger, J. S., Epperly, M. W., Goff, J. P., Adler, C., Leboff, M. S., & Glowacki, J. (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging cell*, 7(3), 335–343. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00377.x>
230. Zhou, X., Ma, Y., Liu, F., Gu, C., Wang, X., Xia, H., Zhou, G., Huang, J., Luo, X., & Yang, J. (2019). Melanocyte Chitosan/Gelatin Composite Fabrication with Human Outer Root Sheath-Derived Cells to Produce Pigment. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41611-5>
231. Zhuang, L., Lawlor, K. T., Schlueter, H., Pieterse, Z., Yu, Y., & Kaur, P. (2018). Pericytes promote skin regeneration by inducing epidermal cell polarity and planar cell divisions. *Life Science Alliance*, 1(4), 1–11. <https://doi.org/10.26508/lsa.201700009>
232. Zimmerlin, L., Donnenberg, V. S., Pfeifer, M. E., Meyer, E. M., Péault, B., Rubin, J. P., & Donnenberg, A. D. (2010). Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry Part A*, 77(1), 22–30. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20813>
233. Zimmerlin, L., Donnenberg, V. S., Rubin, J. P., & Donnenberg, A. D. (2013). Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry Part A*, 83 A(1), 134–140. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22227>
234. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>