

## DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS MESÉNQUIMALES HUMANAS DEL TEJIDO ADIPOSO HACIA EL LINAJE EPITELIAL

Marian Rodríguez O.<sup>1</sup>, Elizabeth Merentes<sup>1\*</sup> y Elena Velasco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología Experimental. Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores. Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. <sup>2</sup>Facultad de Medicina. Unidad de Microscopía Electrónica. Universidad Central de Venezuela. \*emerentes@gmail.com

### RESUMEN

Estudios *in vitro* han demostrado que el tejido adiposo es una fuente importante de células madre mesenquimales (MSCs) que bajo condiciones específicas de cultivo se pueden diferenciar hacia varios tipos celulares de origen mesodérmico. Recientemente se ha demostrado que las MSCs pueden dar origen a linajes celulares de origen ectodérmico. En tal sentido en nuestro trabajo se estudió el potencial de diferenciación de las células mesenquimales provenientes del tejido adiposo humano hacia el linaje epitelial, simulando un microambiente específico *in vitro*. Para ello, las células fueron aisladas a partir de muestras de abdominoplastias. Las células obtenidas fueron caracterizadas morfológicamente mediante inmunohistoquímica contra vimentina y CD49d. Para inducir la diferenciación epitelial, las MSCs se cultivaron con Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) e Insulina y se comparó con una mezcla de medios condicionados obtenidos de queratinocitos y fibroblastos de ratón. Las células cultivadas bajo estas condiciones fueron caracterizadas morfológicamente y también se evaluó la expresión de PanCK y E-cadherina. Los datos obtenidos mostraron que las MSCs del tejido adiposo pueden diferenciarse hacia células similares a epiteliales, las cuales expresaron PanCK y E-cadherina siendo los resultados más significativos con los medios condicionados. Esto sugiere que las MSCs del tejido adiposo poseen la capacidad de diferenciarse hacia células epiteliales y por lo tanto podrían ser utilizadas en ingeniería de tejidos, terapia celular del tejido epitelial y en estudios de diferenciación celular.

**Palabras clave:** Células mesenquimales, tejido adiposo, linaje epitelial, medios condicionados, diferenciación.

### Differentiation of human mesenchymal stem cells adipose tissue into the epithelial lineage *in vitro*

### ABSTRACT

*In vitro* studies have shown that adipose tissue is an important source of mesenchymal stem cells (MSCs) that under specific culture conditions can be differentiated into various cell types of mesodermal origin. It has recently been shown that MSCs can give rise to cell lineages of ectodermal origin. In this sense, in our work we studied the differentiation potential of MSCs from human adipose tissue towards the epithelial lineage, simulating a specific microenvironment *in vitro*. Mesenchymal stem cells were isolated from abdominoplasty samples and were characterized by immunohistochemistry against vimentin and CD49d. To induce epithelial differentiation, MSCs were cultured with Epidermal Growth Factor (EGF) and insulin; and compared to a mixture of conditioned media obtained from mouse keratinocytes and fibroblasts. Cells grown under these conditions were morphologically characterized and

the expression of PanCK and E-cadherin was also evaluated. The data obtained showed that MSCs from adipose tissue can differentiate into epithelial-like cells, which expressed PanCK and E-cadherin, being the most significant results with conditioned media. Moreover, the establishment of cell junctions was observed through electronic microscopy. This suggests that MSCs from adipose tissue can differentiate into epithelial cells and therefore could be used in tissue engineering, cell therapy of epithelial tissue and cell differentiation studies.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, adipose tissue, epithelial lineage, conditioned media, differentiation.

## INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (MSCs) han sido definidas como una población de células capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse hacia distintos tipos de células especializadas no solo morfológicamente sino también funcionalmente (Jiang *y col.*, 2002; Raff, 2003; Caplan, 2004; Dominici *y col.*, 2006; Gimble *y col.*, 2007; Orbay *y col.*, 2012). Las MSCs de tejidos adultos se localizan entre las células especializadas de un tejido en particular. La principal función de estas células es mantener y reparar el tejido en el cual se encuentran. Sin embargo, los diferentes tipos de tejidos del organismo poseen una mayor o menor capacidad de reparar por sí mismo los daños que sufren. Esto junto con la pérdida de la homeostasis celular contribuye al desarrollo de diversas enfermedades degenerativas.

Las MSCs de tejidos adultos se aislaron y caracterizaron originalmente a partir de la médula ósea y diversos estudios han demostrado que se pueden mantener, expandir y manipular en condiciones *in vitro* siendo capaces de diferenciarse a numerosos tipos celulares incluyendo: adipocitos, mioblastos, osteoblastos, condrocitos, queratinocitos, entre otros (Pittenger *y col.*, 1999; Rodríguez, 2005; Paunescu *y col.*, 2007; Witkowska-Zimny *y col.*, 2011). Sin embargo, las MSCs también se han aislado de otros tejidos como el cordón umbilical, pulpa dental, músculo y tejido adiposo. Este último al igual que la médula ósea se deriva del mesodermo embrionario y ha sido considerado como fuente importante de células madre adultas con una gran potencialidad de diferenciación (Zuk *y col.*, 2002; Mizuno *y col.*, 2003; Gimble y Guilak, 2003; Baer y Geiger, 2012, Orbay *y col.*, 2012). La utilización de estas células madre para su aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades es de gran significado hoy en día, si se tiene en cuenta la facilidad de obtención de estas células del tejido graso, su expansión *in vitro* y su potencial de diferenciación múltiple (Bertassoli *y col.*, 2013, Czerwiec *y col.*, 2023). Además, estas células secretan numerosos mediadores, citoquinas y factores de crecimiento que contribuyen a la cicatrización de heridas de la piel (Almaski, 2022) y en la regeneración de órganos (Al Ghadban *y col.*, 2023). Estas características las hace una fuente ideal de células madre para la investigación de la ingeniería de tejidos y terapia celular. En este sentido,

recientemente se ha planteado su enorme potencial terapéutico en la medicina regenerativa, numerosos estudios preclínicos y clínicos han demostrado que las células mesenquimales del tejido adiposo pueden regenerar órganos tales como hueso, cartilago, piel, hígado entre otros (Yang y col., 2019, Zhang y col., 2020).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Establecimiento de los cultivos celulares.** Las MCS del tejido adiposo humano fueron aisladas a partir de 10 muestras de abdominoplastia de pacientes entre 35 y 45 años de edad. Las cuales fueron suministradas por el Centro Médico de Caracas bajo el consentimiento del paciente. Las muestras de tejido adiposo fueron colocadas en un tampón fosfato libre de calcio y magnesio (PBS) y se seccionaron en pequeños trozos. Seguidamente, se realizó disgregación enzimática con colagenasa tipo I (SIGMA) al 0.075%. La viabilidad celular fue determinada con el colorante de exclusión azul tripano y se cuantificó el número de células con un hemocitómetro y se sembraron a una densidad celular de  $7 \times 10^5$  a  $2 \times 10^6$ .

Las células obtenidas fueron mantenidas en medio de cultivo Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM) (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO), 100 U/ml penicilina G y 2 mg/ml anfotericina e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, se realizaron los subcultivos, los cuales fueron utilizados para los ensayos de caracterización y diferenciación celular. Paralelamente se establecieron los cultivos de fibroblastos embrionarios y de células epidérmicas obtenidas de embriones de ratón de 11 a 13 días de gestación y neonatos de ratón respectivamente (Merentes, 2016). Los fibroblastos fueron mantenidos con medio DMEM suplementado con 10% de SFB, antibióticos y antimicóticos, mientras que las células epidérmicas fueron cultivadas con medio DMEM suplementado con 10% SFB, 10 ng/ml Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), 100 U/ml penicilina G y 2 mg/ml anfotericina. Ambos cultivos fueron mantenidos a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la confluencia con cambios de medios periódicos, luego de lo cual se realizaron los subcultivos con el fin de amplificar la población de fibroblastos y células epidérmicas que fueron utilizados para obtener los medios condicionados.

**Caracterización de las MSC del tejido adiposo humano.** Con la finalidad de observar las características morfológicas y desarrollo *in vitro* de las células en los cultivos, se llevaron a cabo observaciones periódicas en el microscopio invertido de contraste de fases y microscopía de luz. Adicionalmente, para observar la heterogeneidad u homogeneidad de los

cultivos primarios y subcultivos se llevó a cabo una evaluación histológica con Hematoxilina-Eosina siguiendo el protocolo histológico estándar. También se evaluó la presencia de adipocitos y gotas de lípidos con Sudan III.

Para caracterizar y evidenciar la población de MSCs en los cultivos *in vitro* se determinó la expresión de vimentina (anticuerpo monoclonal de ratón, dilución 1:100, Dako) y CD49d ( $\alpha 4$ -integrina) (anticuerpo policlonal de conejo, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology). La determinación antigénica se llevó a cabo utilizando el protocolo estándar del sistema inmunohistoquímico ABC de Santa Cruz Biotechnology.

**Inducción de la diferenciación epitelial.** Una vez que los cultivos de MSCs alcanzaron la confluencia, se procedió a realizar los ensayos de diferenciación celular hacia el linaje epitelial. Para ello se tomaron células del 3er subcultivo que fueron disgregadas enzimáticamente con Tripsina 0.125%-EDTA 0.02%. La suspensión celular obtenida se resuspendió en medio nutritivo y luego se sembró en placas de 6 pozos (Nunc) a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por pozo.

Inicialmente las células fueron cultivadas con DMEM suplementado con 10% SFB, antibióticos y antimicóticos. A las 24 horas el medio fue reemplazado por el medio control e inductores (Tabla I). Finalmente se incubó a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> por 6 a 12 días con cambio de medio periódicos, luego de lo cual se realizaron las evaluaciones histológicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales correspondientes.

**Tabla 1.** Factores ensayados en el medio base DMEM para inducir la diferenciación de las células MSC del tejido adiposo humano hacia el linaje epitelial.

Medio	Medio	Suero	Suplementación
Control	DMEM	10 % SFB	Antibióticos y antimicóticos.
Medio inductor 1	DMEM	10 % SFB	Medio condicionado de fibroblastos y células epidérmicas (1:1), antibióticos y antimicóticos
Medio inductor 2	DMEM	10 % SFB	EGF 10 ng/ml, insulina 10 $\mu$ g/ml, antibióticos y antimicóticos.

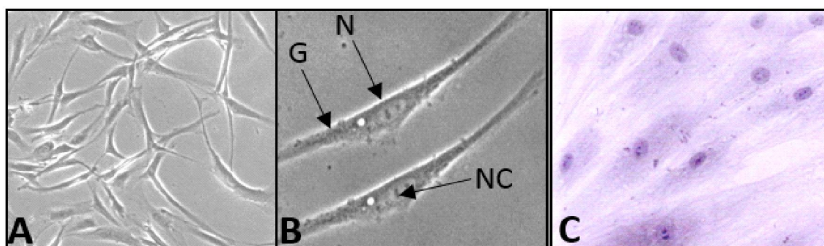
**Caracterización de la diferenciación.** Con el fin de observar los cambios morfológicos que ocurrieron durante la diferenciación *in vitro* de las MSCs del tejido adiposo humano, se llevaron a cabo observaciones periódicas al microscopio de contraste de fases (Olympus IX50) tomándose los registros fotográficos correspondientes. Para observar las características histológicas de las células tanto en el control como en condiciones inductoras, las monocapas fueron fijadas *in situ* con metanol y conservadas en etanol 70% a 4°C para posteriormente realizar los ensayos inmunohistoquímicos correspondientes.

Para determinar si las MSCs del tejido adiposo de humano no solo presentaron cambios morfológicos sino también funcionales bajo las condiciones inductoras evaluadas, se realizó un ensayo inmunohistoquímico para evidenciar la expresión de algunas proteínas específicas del linaje epitelial como la expresión de queratinas y E-cadherina. Para ello se utilizaron anticuerpos primarios Pan-CK (anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce a las CK 4,5,6,8,10,13 y 18, aislado de la A-431 carcinoma epidérmico humano; dilución 1:100; Santa Cruz Biotechnology) y como marcador de la morfogénesis epitelial temprana se utilizó un anticuerpo contra E-cadherina (anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce los aminoácidos 600-707 dentro del dominio extracelular de E-cadherina; dilución 1:100; Santa Cruz Biotechnology).

La determinación antigénica se llevó a cabo utilizando el protocolo estándar del sistema inmunohistoquímico ABC de Santa Cruz Biotechnology. Adicionalmente, y con la finalidad de observar los cambios de la inducción de la diferenciación hacia el linaje epitelial a nivel ultraestructural, se analizaron los cultivos en monocapa mantenidos con medio control e inductor 1 que contiene medio condicionado Epi/Fib. Para ello se siguieron los pasos convencionales de microscopía electrónica como: fijación, lavado, deshidratación, infiltración, inclusión, corte y contraste (Desmond, 1965). Las observaciones y registros fotográficos se realizaron en un Microscopio Electrónico Philips CM 10.

## RESULTADOS

**Caracterización morfológica e inmunohistoquímica de las células en los cultivos primarios y subcultivos.** En los cultivos primarios de las células del estroma del tejido adiposo de humano, se evidenció una población de células con morfología fusiforme tipo fibroblasto, con núcleo ovalado y central, varios nucléolos y delgadas prolongaciones citoplasmáticas con una gran proporción de granulaciones (Figura 1A, 1B). En estos cultivos no se observaron células positivas al Sudan III (Figura 1C).



**Figura 1.** (A) Cultivo primario 3 días de cultivo. Se observa una población de células fusiformes. Contraste de fases 100X. (B) Detalle de las células fusiformes, con núcleo ovalado (N), varios nucléolos (NC) y granulaciones citoplasmáticas (G) 400X. (C) Células negativas a Sudan III presente en los cultivos primarios 400X.

La confluencia de los cultivos primarios se alcanzó entre los 10 y 15 días. Luego de lo cual se procedió a llevar a cabo los subcultivos, donde las células con morfología fusiforme se mantuvieron hasta el 8vo pasaje, sin cambios morfológicos aparentes asociados a la diferenciación y senescencia. Para observar la presencia de células de origen mesodérmico y la expresión de uno de los marcadores de la población de células del tejido adiposo humano en los cultivos celulares, se determinó la expresión de vimentina y CD49d, observándose que las células expresan vimentina en el citoplasma y CD49d en la membrana celular (Figura 2A, 2B, 2C).

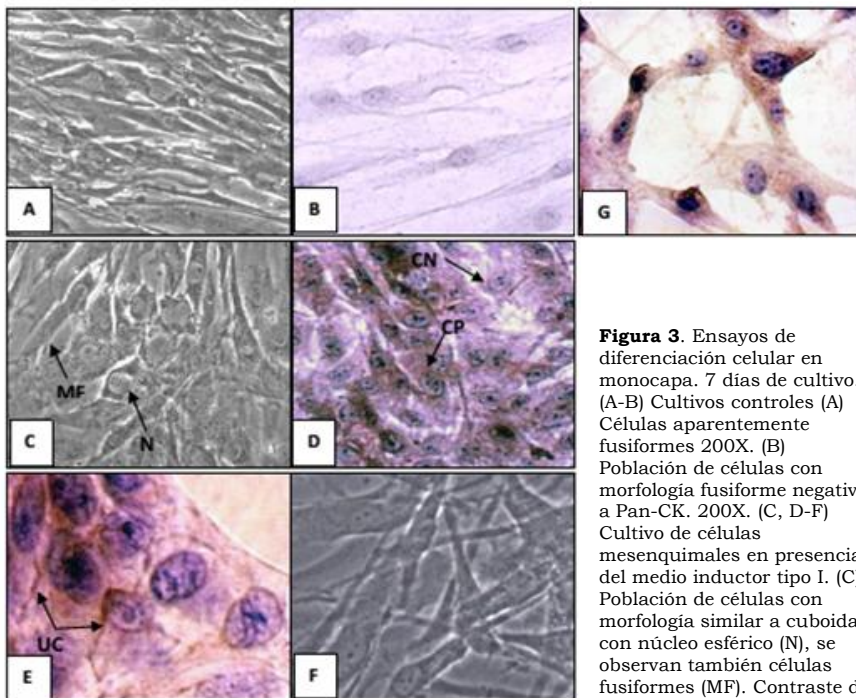


**Figura 2.** (A) Población de células con morfología fusiforme positiva a vimentina en toda la extensión del citoplasma 400X. (B) Detalle de las células que expresan vimentina 1000X. (C) Población de células con zonas positivas en la superficie celular a nivel de la membrana celular (MP) 400X.

**Inducción de la diferenciación.** Al analizar el aspecto morfológico de las células provenientes del tejido adiposo de humano y el comportamiento *in vitro* en los cultivos en monocapa, se pudo observar que durante todo el período de estudio, en el cultivo control las células mostraron una morfología fusiforme semejante a fibroblastos (Figura 3A), y además, estas fueron negativas a Pan-CK (Figura 3B), mientras que en los cultivos mantenidos con el medio inductor tipo 1, las células presentaron una morfología fusiforme hasta el cuarto día, cuando se observó que las células se agruparon con un crecimiento similar a las células epiteliales donde algunas células cambiaron de fusiforme a células redondeadas, poligonales y otras similares a células cuboidales, con núcleo redondeado y de ubicación central (Figura 3C). En estos cultivos, algunas de las células que presentaron cambios morfológicos expresaron Pan-CK (Figura 3D). Además, bajo esta condición también se observó, a nivel de las interacciones celulares, positividad al inmunomarcaje con E-cadherina (Figura 3E).

Por otra parte, en los cultivos mantenidos con el medio inductor 2 se evidenció a los 5 días de cultivo una población de células que mantuvieron morfología fusiforme (Figura 3F) que fueron negativas a la determinación antigénica contra Pan-CK y E-cadherina, mientras que otras células mostraron una morfología redondeada o poligonal similar a las observadas en las células cultivadas con el medio inductor 1, las cuales expresaron Pan-CK (Figura 3G), pero fueron negativas a E-cadherina.

**Características ultraestructurales.** Para complementar los resultados obtenidos se realizó un análisis ultraestructural de las monocapas de las células fusiformes del tejido adiposo humano bajo la condición control e inductora con el medio inductor 1, permitiendo evidenciar diferencias ultraestructurales en cuanto a la forma celular, establecimientos de contactos celulares, cantidad y organización de los organelos.

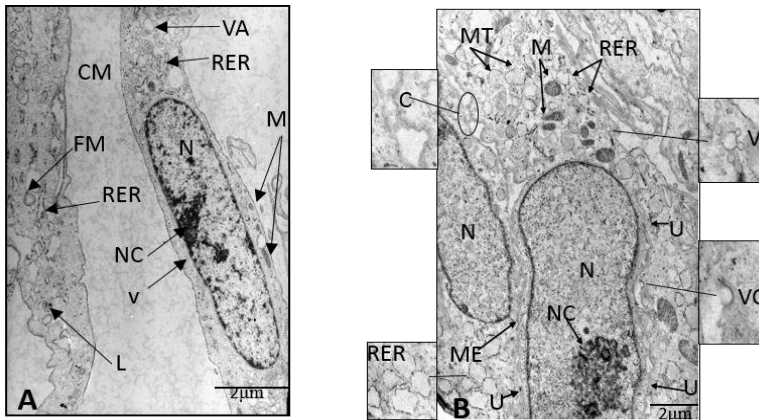


**Figura 3.** Ensayos de diferenciación celular en monocapa. 7 días de cultivo. (A-B) Cultivos controles (A) Células aparentemente fusiformes 200X. (B) Población de células con morfología fusiforme negativas a Pan-CK. 200X. (C, D-F) Cultivo de células mesenquimales en presencia del medio inductor tipo I. (C) Población de células con morfología similar a cuboidal con núcleo esférico (N), se observan también células fusiformes (MF). Contraste de fases 200X.

(D) Se observan células con morfología similar a cuboidal intensamente positivas a Pan-CK (CP) y algunas negativas (CN) 200X. (E) Células que expresan E-cadherina en las uniones celulares (UC) 1000X. (F-G) Cultivo en monocapa de las células mesenquimales del tejido adiposo inducido con el medio inductor tipo 2. (F) Células con morfología fusiforme. Contraste de fases 400X. (G) Células positivas a Pan-CK 400X.

De esta manera, en los cultivos control se observaron células aisladas con morfología fusiforme, con un núcleo ovalado y alargado. El nucléolo se encuentra cerca de la envoltura nuclear. En el citoplasma se evidenció RER alargado, mitocondrias electrondensas, vesículas, lisosomas, algunas mitocondrias y figuras mielínicas (Figura 4A), mientras que en los cultivos celulares mantenidos con el medio inductor 1, se evidenció aparentemente una mayor densidad celular que en el control, donde las células presentaron un núcleo prominente con invaginaciones leves en la envoltura nuclear y el nucléolo presentó una disposición abierta. En el citoplasma se evidenció gran

cantidad de RER con cisternas dilatadas, numerosas mitocondrias de distintas electrodensidades y tamaños, ribosomas libres y vesículas pinocíticas cercanas a la membrana celular y en el espacio intercelular, donde una vesícula aparentemente de catrina hace contacto con la superficie celular de una célula vecina (Figura 4B). Además, las células bajo esta condición aparentemente comenzaron a establecer uniones celulares con las células adyacentes, evidenciadas por el contacto, engrosamiento y presencia de zonas electrodensas a nivel de las membranas celulares (Figura 4B).



**Figura 4.** Cultivo en monocapa control (A) e inducidas con el medio inductor 1 Epi/Fib (B) de las células mesenquimales del tejido adiposo humano. 8 días de cultivo A. En la micrografía se observan células con morfología fusiforme. Núcleo ovalado y alargado (N), con un nucléolo cercano a la envoltura nuclear (NC). A nivel del citoplasma se aprecian algunas mitocondrias electrodensas (M), retículo endoplasmático rugoso (RER), vesículas pinocíticas (V), figuras mielínicas (FM), algunas vacuolas (VA) y lisosomas (L) 52.000X. (B) En la micrografía se observa una densidad celular mayor constituidas por dos porciones citoplasmáticas de 2 células, una de ellas presenta un núcleo prominente con invaginaciones leves en la envoltura nuclear, nucléolo, citoplasma reducido, pero se logran observar vesículas pinocíticas y ribosomas libres, además esta célula comienza a establecer contacto con la células adyacentes evidenciado por el engrosamiento de la membrana (ME) y zonas electrodensas que sugieren el establecimiento de una unión celular específica (U). En las porciones citoplasmáticas vecinas se observa gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso, numerosas mitocondrias electrodensas (M) y electrotransparentes (MT). Así como el inicio del contacto celular (C) entre las membranas de 2 células. Además, se observan vesículas pinocíticas (V) en el espacio intercelular 66.000 X.

## DISCUSIÓN

Las condiciones brindadas a las células en cultivo, permitieron la proliferación y mantenimiento del potencial de diferenciación de la población de células fusiformes del tejido adiposo humano. En la etapa inicial de los cultivos primarios las células fusiformes proliferaron rápidamente en las condiciones *in vitro* suministradas siendo la morfología similar a las



observadas en los diferentes estudios que se han realizado sobre estas células (Zuk y col., 2002; Mizuno y col., 2003; Brzoska y col., 2005; Ando y col., 2008; Kiseleva y col., 2009; Loskutoff y col., 2010). Diferentes grupos de investigadores han demostrado que los métodos de cultivo de células multipotentes del tejido adiposo en presencia y ausencia del SFB, presentan diferencias importantes, ya que en medio libre de SFB se mantienen los preadipocitos y el potencial de diferenciación adipogénico. Por el contrario, ante la presencia de SFB, la cantidad de preadipocitos va disminuyendo y se pierde el potencial de diferenciación de las células que pudiesen estar comprometidas con el linaje adipogénico, permitiéndoles canalizarse hacia otros linajes celulares según el microambiente circundante (Rodríguez y col., 2004; Gomillion y col., 2006; Fuchs, 2007; Gimble y col., 2007).

En los cultivos después de varios pasajes se mantienen las células tipo fusiformes. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores (Gimble y col., 2007; Ando y col., 2008; Kiseleva y col., 2009; Vossmerbaeumer y col., 2009), quienes obtuvieron un cultivo celular compuesto por células fusiformes, las cuales expresan vimentina. Esta es una proteína que pertenece a la familia de filamentos intermedios presentes en el citoesqueleto y es altamente expresada en células de origen mesenquimal, por lo que actualmente es empleada como un marcador de las mismas e indica el origen mesodérmico de las células en los cultivos. Además, algunas células presentes en los subcultivos también expresaron CD49d ( $\alpha$ -4 integrina). Esta molécula de adhesión celular también ha sido relacionada con las células progenitoras del tejido adiposo (Gronthos y col., 2001; Zuk y col., 2002; Pawitan, 2009; Kiseleva y col., 2009).

Estos resultados sugieren que el sistema de cultivo empleado permite obtener poblaciones de células fusiformes de origen mesodérmico con potencial de diferenciación. Se ha demostrado que la población de células con potencial de diferenciación del tejido adiposo no parece requerir de muchos factores específicos para proliferar y mantener su potencial de diferenciación (Zuk y col., 2002; Pawitan, 2009; Kiseleva y col., 2009). Sin embargo, en estudios *in vitro* se ha observado la presencia de subpoblaciones de células tipo fibroblasto que pueden variar en cuanto a potencialidad de diferenciación, tamaño y granularidad (Baer y Geiger, 2012). Igualmente, se ha señalado que la densidad del cultivo es crítica ya que puede modular los patrones de expresión de genes específicos en las poblaciones heterogéneas mesenquimales del tejido adiposo (Kim y col., 2014). Adicionalmente, estas características pueden variar de un organismo a otro (Blau y col., 2001; Nakagawa y col., 2005; Fu y col., 2006; Schneider y col., 2008). Esto agrega una variable a los cultivos, lo que resulta importante para la selección, pureza y comportamiento de las células en cultivo.

Como se ha reportado en estudios previos, las MSCs del tejido adiposo parecen tener la capacidad para diferenciarse hacia células epiteliales, esta diferenciación depende del microambiente circundante. En este

sentido, los resultados muestran la necesidad de la simulación de un microambiente similar a las condiciones *in vivo* donde proliferan y se diferencian las células epiteliales, dicho microambiente está constituido por factores solubles específicos tales como KGF, EGF, IGF, TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , que pueden regular de forma paracrina la proliferación y diferenciación celular. Algunos autores han señalado que estas MSCs del tejido adiposo pueden inclusive transdiferenciarse y coexpresar marcadores epiteliales en la piel cuando son trasplantadas a ratones (Derby *y col.*, 2014), así como también en células epiteliales del pulmón cuando se utilizan andamios descelularizados provenientes de pulmón de rata (Méndez *y col.*, 2014).

En este trabajo al observar las características morfológicas de los cultivos en monocapa sin añadir factores al medio nutritivo se pudo apreciar que no ocurrieron cambios morfológicos y no fueron positivas a los marcadores epiteliales Pan-CK y E-cadherina. No obstante, bajo las condiciones inductoras mostraron cambios morfológicos y expresión de marcadores del linaje epitelial, donde se puede destacar que en los cultivos mantenidos con los medios condicionados algunas células cambiaron su morfología de fusiforme a poligonales y similares a cuboidales. Algunas de estas células fueron positivas a Pan-CK, pero solo una proporción de células expresaron E-cadherina bajo la inducción de la combinación de medios condicionados.

Los cambios morfológicos y la expresión de marcadores epiteliales evidenciados en los cultivos en monocapa han sido reportados por diversos autores con diversos factores inductores como HGF, IGF, KGF, EGF, BMP-7, ácido trans-retinoico, activina (Brzoska *y col.*, 2005; Paunescu *y col.*, 2007; Ando *y col.*, 2008, Griesche *y col.*, 2012) y con medios condicionados de fibroblastos (Huang *y col.*, 2008) y de células epiteliales (Vossmerbaumer *y col.*, 2009). Aunque en este estudio se observó cambios morfológicos y expresión de Pan-CK con el medio inductor que contenía EGF e insulina, los resultados más significativos se obtuvieron con la combinación de medios condicionados de queratinocitos y fibroblastos. Diversos autores han señalado que en dicho medio se encuentran factores solubles como: KGF, EGF, IGF, TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  (Marinero *y col.*, 1999; Lanza *y col.*, 2007; Prowse *y col.*, 2007). Estos factores solubles cumplen un rol fundamental en los eventos de proliferación y diferenciación hacia el linaje epitelial.

Diversos investigadores han señalado que la síntesis de las diferentes CK no es estimulada por todos los factores solubles involucrados en el proceso de diferenciación epitelial, pero ha sido relacionada específicamente con la activación del EGFR por los factores de crecimiento EGF y TGF- $\alpha$ . Otro de los factores importantes en la diferenciación epitelial presente en los medios condicionados es el TGF- $\beta$ , el cual activa la síntesis de CK8, CK18 y posteriormente CK 5 y CK14 que

expresan las células poco diferenciadas del estrato basal del epitelio epidérmico. Además, el TGF- $\beta$  estimula la síntesis de colágeno y fibronectina (Huang *y col.*, 2008). Estas CK5 y CK14 son las primeras que se expresan durante el desarrollo de los epitelios y posteriormente son sustituidas por las CK secundarias específicas de cada fenotipo epitelial (Brzoska *y col.*, 2005; Paunescu *y col.*, 2007; Huang *y col.*, 2008).

Por otra parte, la expresión de E-cadherina en los cultivos de MSCs de tejido adiposo humano está relacionada con el establecimiento y mantenimiento de uniones celulares que promueven la integridad celular. Como se conoce la E-cadherina es una glucoproteína transmembrana que está involucrada en el establecimiento de uniones intercelulares, la cual es específica de los epitelios y es importante para mantener la integridad de los epitelios. Esta característica es fundamental en los tejidos epiteliales (Geneser, 2003, Sueblinvong *y col.*, 2007; Schneider *y col.*, 2008). Asimismo, algunos autores han señalado que la expresión de E-cadherina está relacionada con la morfogénesis temprana epitelial (Sueblinvong *y col.*, 2007; Schneider *y col.*, 2008; Vossmerbaeumer *y col.*, 2009). Los resultados obtenidos en estos ensayos de diferenciación celular en monocapa, sugieren que en los medios condicionados se encuentran una combinación de factores solubles que generan parte del microambiente epitelial que permite canalizar de forma dinámica la diferenciación epitelial, llevando consigo cambios morfológicos, síntesis y expresión de marcadores epiteliales en una población de células fusiformes del estroma del tejido adiposo humano.

Se ha planteado recientemente que en el medio condicionado de las células mesenquimales del tejido adiposo producen un subtipo de vesículas extracelulares de alrededor de 30 a 200 nm, denominados exosomas, los cuales contiene diferentes moléculas que pueden participar en múltiples procesos biológicos, tales como proliferación, diferenciación. Se ha considerado que estos exosomas de las células mesenquimales pueden ser una plataforma con un gran potencial terapéutico en terapias libres de células para tratar diferentes patologías en la medicina regenerativa (Al-Ghadban *y col.*, 2022).

En este estudio del potencial de diferenciación de las MSCs del tejido adiposo hacia el linaje epitelial, se tomaron los resultados más resaltantes de los cultivos en monocapa para observar las diferencias a nivel ultraestructural de las células mantenidas bajo la condición control y con el medio inductor 1. Mediante este análisis ultraestructural se pudo apreciar en los cultivos control de MSCs del tejido adiposo humano, células aisladas y fusiformes donde los organelos seguían manteniendo la morfología característica de estas células. Adicionalmente se observaron algunas mitocondrias y figuras mielínicas. Estas características ultraestructurales concuerdan con las observadas en microscopía de contraste de fases.

En contraste con el control, las células cultivadas con el medio inductor tipo 1 mostraron aparentemente una mayor densidad celular y cambios a nivel ultraestructural, entre los que se destaca una mayor proporción de RER que sugiere una alta síntesis de proteínas. Adicionalmente se observaron numerosas mitocondrias de diferentes electrodensidades, lo que sugiere la coexistencia de poblaciones distintas de mitocondrias, lo cual puede estar relacionado con la alta actividad energética de las células.

Por otra parte, se evidenciaron múltiples vesículas pinocíticas en el citoplasma y una vesícula aparentemente recubierta por clatrina que pareciera hacer contacto con la membrana celular de una célula vecina. Esto evidencia una gran actividad celular donde posiblemente las proteínas sintetizadas por RER son liberados por exocitosis y mediante endocitosis son incorporadas a las células vecinas, probablemente se trata de factores solubles como factores de crecimiento, enzimas, entre otros que podrían canalizar la diferenciación de las células adyacentes. Estas moléculas solubles son denominadas morfógenos y pueden especificar la vía de diferenciación de más de un tipo celular (Scott, 2006). A nivel de la proporción de los organelos se puede decir que cualitativamente se aprecia una mayor proporción de RER, mitocondrias, vesículas y ribosomas libres en las células cultivadas en los medios condicionados que en los controles. Esto representa una diferencia entre los dos tipos de cultivo que permite sugerir que evidentemente ocurren cambios a nivel ultraestructural en las células bajo la influencia de los medios condicionados. Estas diferencias han sido reportadas en la transición mesénquima-epitelio donde ocurre un aumento gradual en la cantidad de los organelos anteriormente señalados (Ullman *y col.*, 2007; Eastham *y col.*, 2007).

Además de la actividad celular y la proporción de organelos, el aspecto más resaltante bajo esta condición fue el establecimiento de contactos con las membranas de las células adyacentes evidenciado por el engrosamiento de la membrana y la presencia de zonas electrondensas, que sugiere que se podría estar iniciando el establecimiento de uniones específicas. Esto podría estar relacionado con la síntesis de CK y E-cadherina observada en los cultivos en monocapa. Estos resultados concuerdan con los de Schneider *y col.* (2008) quienes observaron que las MSCs de la médula ósea bajo factores inductores epiteliales se conectaban entre sí mediante uniones específicas. Adicionalmente se ha reportado que la expresión de CK 8 y CK18 es paralela con la formación de uniones específicas tipo desmosoma (Huang *y col.*, 2008).

Finalmente, con base en los resultados obtenidos se ha evidenciado que las células mesenquimales del tejido adiposo pueden diferenciarse hacia células similares epiteliales, por lo tanto, podrían ser utilizadas como una fuente de células madre en la bioingeniería y terapia celular del tejido epitelial, así como en estudios de diferenciación celular.

## AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por el FONACIT y la Universidad Central de Venezuela.

## LITERATURA CITADA

- Almaski, S.G. 2022. Adipose-derived mesenchymal stem cells and wound Healing. Potential clinical applications in wound repair. *Saudi Med J.* 43 (10): 1075-1086.
- Al-Ghadban, S., M. Artiles y B. Bunnell. 2023. Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine: Looking Forward. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:837464.doi: 10.3389/fbioe.2021.837464.
- Ando, Y., M. Inaba, Y. Sakaguchi, M. Tsuda, G.K. Quan, M. Omae, K. Okasaki y S. Ikehara. 2008. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6, trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 14(6):826-838.
- Baer, P.C. y H. Geiger. 2012. Adipose-derived mesenchymal stromal/StemCells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells International* Article ID 812693, doi:10.1155/2012/812693.
- Blau, H. M., T.R. Brazelton y J.M. Wiman. 2001. The evolving concept of stem cells: Entity or function. *Cell* 105:829-841.
- Bertassoli, B. M., A. Chaves de Assis, F. Delys de Oliveira, M.A. Machado, J.S. Pires, J. Barbosa da Silva, G. Conceição, y P. Beltrão. 2013. Mesenchymal stem cells-emphasis in adipose tissue. *Brazilian Archives Biol. Technol.* 56 (4):607-617.
- Brzoska M., H. Geiger, S. Gauer y P. Baer. 2005 Epithelial differentiation of human adipose-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res. Commun.* 330:142-150.
- Caplan, A.I. 2004. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 21:429-435.
- Czerwicz, K., M. Zawrzykraj, M. Deptuła, A. Skoniecka, A. Tymińska, J. Zieliński, A. Kosiński y M. Pikuła. 2023. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Basic Research and Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 24(4), 3888; <https://doi.org/10.3390/ijms24043888>.
- Derby, B., H. Dai, J. Reichensperger, L. Cox, C. Harrison, N. Cosenza, M. Yang, R.A. Bueno y M. Neumeister. 2014. Adipose-derived stem cell to epithelial stem cell transdifferentiation: a mechanism to potentially improve understanding of fat grafting's impact on skin rejuvenation. *Aesthetic Surgery J* 34(1):142-153.
- Desmond, H. 1965. Techniques for electron microscopy. Blackwell Scientific Publications. Philadelphia, USA.
- Dominici, M., K. LeBlank, I. Mueller, I. Slaper-Conterbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
- Eastham, A., H. Spencer, F. Soncini, S. Ritson, C. Merry, P. Stern y C. Ward. 2007. Epithelial-mesenchymal transition events during embryonic stem cells differentiation. *Cancer Res* 67: 11254-11262.
- Fu, X., L. Fang, X. Li, B. Cheng, Z. Sheng. 2006. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen* 14:325-335.
- Fuchs, E. 2007. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437:275-280.

- Geneser, F. 2003. *Histología*. 3era. Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. 227-230 pp.
- Gimble, J. y F. Guilak. 2003. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr Top Dev Biol* 58:137-60.
- Gimble, J., A. Katz y B. Bunnell. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100:1249-1260.
- Gomillion, C. y K. Burg. 2006. Stem cells and adipose engineering. *Biomaterials* 27:6052-6063.
- Griesche, N., J. Bereiter-Hahn, H. Geiger, R. Schubert y P. Baer. 2012. During epithelial differentiation of human adipose-derived stromal/stem cells, expression of zonula occludens protein-1 is induced by a combination of retinoic acid, activin-A and bone morphogenetic protein-7. *Cytotherapy* 14(1):61-69.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Stroms y J. Gimble. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189:54-63.
- Huang, H., Q. Gao, B. Tao y S. Jiang. 2008. Long-term culture of keratinocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 44:193-203.
- Jiang, Y., B. Jahagirdar, L. Reinhardt, R.E Schwartz, C. Keene, X. Ortiz-González, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, D.M. Jingbo, S. Aldrich, A. Lisberg, W. Low, D. Largaespada, y C.M. Verfaillie. 2002. Pluripotent nature of adult marrow derived mesenchymal stem cells. *Nature* 418:41-49.
- Kim, D.S., M.W. Lee, K.H. Yoo, T.H. Lee, H.J. Kim, I.K. Jang, Y.H. Chun, H.J. Kim, S.H. Park, M.H. Son, H.L. Jung, K.W. Sung y H. H. Koo. 2014. Gene expression profiles of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are modified by cell culture density. *PLoS ONE* 9(1): e83363. doi: 10.1371/journal.pone.0083363.
- Kiseleva, E., E. Chermnykh, E. Vorotelyak, A. Volozhin, A. Vasiliev y V. Terskikh. 2009. Differentiation capacity of stromal fibroblast-like cells from human bone marrow, adipose tissue, hair follicle dermal papilla and derm. *Cell Tissue Biol* 3:42-49.
- Lanza, R.P., R.S. Langer y J. Vacanti. 2007. Principles of tissue engineering. 3rd Edition. San Diego CA. Academic Press.
- Loskutoff, D. y F. Samada. 2010. The adipose and homeostatic balance in obesity: studies of PAI-1. *J American Heart Association* 18:1-6
- Marinero, J., E. Hendrich, K. Leeding y Bach, L. 1999. HaCat human keratinocytes express IGF-II, IGFBP-6 and an acid-activated protease with activity against IGFBP-6. *Am J Physiol Endocrin Metab.* 276: 536-542.
- Mendez, J., M. Ghaedi, D. Steinbacher y L. Niklason. . 2014. Epithelial cell differentiation of human mesenchymal stromal cells in decellularized lung scaffolds. *Tissue Engineering Part A.* 20(11-12):1735-1746.
- Merentes, E. 2016. Manual de técnicas básicas del cultivo celular. Ediciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Mizuno, H. y H. Hyakusoku. 2003. Mesengenic potential and future clinical of human processed lipoaspirated cells. *J Nippon Med Sch* 70:300-306.
- Nakagawa, H., S. Akita, M. Fukui, T. Fujii y K. Akino. (2005) Human mesenchymal stem cells successfully improve skin substitute wound healing. *Br J Dermatol* 153:29-36.
- Orbay, H., M. Tobita y H. Mizuno. 2012. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications. *Stem Cells International*, Article ID 461718, doi:10.1155/2012/461718.

- Pawitan, J.A. 2009. Prospect of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Cell Tissue Transplantation Therapy* 2:7-9.
- Păunescu, V., E. Deak, D. Herman, I. Raluka, G. Tănăsie, C. Bunu, S. Anghel, C. Tatu, T. Oprea, R. Henschler, B. Ruster, R. Bistran y E. Seifreid. 2007. *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med* 11:502-508.
- Pittenger, M., A. Mackay, S. Beck, R. Jaiswal, R. Douglas, J. Mosca, M. Moorman, D. Simonetti, S. Craig y D. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Prowse, A., L. McQuade, K. Bryant, H. Marcal y P. Gray. 2007. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. *J Proteome Res* 6: 3796-3807.
- Raff, M. 2003. Adult stem cells plasticity: fact or artefact? *Annu Rev. Cell Dev Biol* 19:1-22.
- Rodríguez, V. (2005) Células madres: Conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas Scientiarum* 10:5-14.
- Rodríguez, A.M., C. Elabd, F. Delteid, J. Astier, C. Vernochet y P. Saint-Mare, 2004. Adipocyte differentiation of multipotent cell established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 315:255-263.
- Schneider, R., S. Neuss, R. Stainforth, N. Laddach, M. Bovi, R. Knuechel y A. Perez-Bouza. 2008. Three dimensional epidermis-like growth of human mesenchymal stem cells on dermal equivalents: contribution to tissue organization by adaptation of myofibroblast phenotype and function. *Differentiation* 76:156-167.
- Scott, G. 2005. *Biología del Desarrollo*. 7ma edición. Edit. Medica Panamericana.
- Sueblinvong, V., R. Loi, P. Eisenhauer, I. Berstein, B. Suratt, J. Spees, D. Wiss. 2007 Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med* 177:67-100.
- Ullman, U., P. Veld, G. Gilles, M. De Rycke y H. Van de Velde. 2007. Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Mol Hum Rep.* 13:21-32.
- Vossmerbaeumer, U., S. Ohnesorge, S. Kuehl, M. Haapalahti, H. Kluter, J. Jonas, H. Thierse y K. Bieback. 2009. Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 11:177-188.
- Witkowska-Zimny, M. y K. Walenko. 2011. Stem cells from adipose tissue *Cell Mol Biol Lett* 16:236-257.
- Yan, Y., X. Fang, X. Wen, B. Li, Z. Zhou, S. Peng, A. H, Arisha, W. Liu y J. Hua. 2019. Therapeutical applications of adipose derived mesenchymal stem cells on acute liver injury in canines. *Research Veterinary Science* 126: 233-239.
- Zhang, J., L. Yuzhe, Y. Chen, L. Yuan, H. Liu, J. Wang, Q. Liu y Y. Zhang, 2020. Adipose-derived stem cells: Current applications and future directions in the regeneration of multiples tissues. *Stem Cell International* ID: 8810813.
- Zuk, P., M. Zhu, P. Ashjian, D. De Ugarte, J. Huang, H. Mizuno, C. Alfonso, J. Fraser, P. Benhaim y M. Hedrick. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *MBC* 13 (12):4279-95.