



ALGINATO EN PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN CELULAR Y SU ROL COMO FACTOR INDUCTOR DE DIFERENCIACIÓN CONDROGÉNICA¹

ALGINATE IN CELL CRYOPRESERVATION PROCESSES AND ITS ROL AS A CHONDROGENIC DIFFERENTIATION INDUCING FACTOR

Giraldo-Hoyos Juliana María²
Trochêz-Wilchez Diana Fernanda³
Valencia-Serna Juliana⁴
Zapata-Linares Natalia⁵
Londoño-Peláez Carolina⁶
Pineda-Molina Catalina⁷

Correspondencia: cpineda@ces.edu.co

Recibido para evaluación: mayo – 12 – 2011. Aceptado para publicación: septiembre – 2 – 2011.

RESUMEN

En este estudio se evaluó la influencia que ejerce el alginato de sodio en procesos de diferenciación condrogénica de células madre adultas, así como su posible rol como agente criopreservante no penetrante para su mantenimiento por largos periodos de tiempo. Con el fin de alcanzar este objetivo, células madre obtenidas de tejido adiposo, fueron aisladas y cultivadas en una matriz tridimensional de alginato y posteriormente criopreservadas por distintos periodos de tiempo. Se evaluó la influencia del alginato sobre la morfología de las células encapsuladas y se encontró que las células pasaron de tener una morfología fibroblastoide, a una morfología redondeada. Adicionalmente, después de la coloración con Safranina O, se encontró presencia de proteoglicanos en las células encapsuladas, lo que sugiere que el cultivo en este material, provee la generación de una matriz extracelular típica del tejido condrocítico. En cuanto a la viabilidad de las células después de ser criopreservadas en las matrices de alginato por diferentes periodos de tiempo, tenían una menor viabilidad en la mayoría de los casos en comparación con las células normalmente criopreservadas. Dichos resultados sugieren que el alginato de sodio es un buen inductor de diferenciación condrogénica, pero no es tan útil para criopreservación de células madre adultas. **Rev.cienc.biomed. 2011; 2 (2): 201-209**

PALABRAS CLAVE

Células madre. Biomateriales. Tejido adiposo. Diferenciación celular.

¹ Un producto del Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica EIA-CES (GIBEC). Laboratorio de Biotecnología en Salud.

² Joven Investigadora Colciencias 2010. Laboratorio de Biotecnología en Salud. EIA- Universidad CES.

³ Estudiante programa Ingeniería Biomédica, EIA- Universidad CES.

⁴ Investigadora Laboratorio de Biotecnología en Salud, EIA- Universidad CES.

⁵ Investigadora Laboratorio de Biotecnología en Salud, EIA- Universidad CES.

⁶ Docente Programa de Ingeniería Biomédica EIA- Universidad CES.

⁷ Docente Programa de Ingeniería Biomédica. Coordinadora Laboratorio de Biotecnología en Salud EIA – Universidad CES.

SUMMARY

*This study evaluated the influence of sodium alginate in the chondrogenic differentiation processes of adult stem cells, and its possible role as a non-penetrating cryopreservation agent for long periods of cell storage. In order to achieve this goal, stem cells from adipose tissue were isolated and cultured in an alginate three-dimensional matrix and subsequently cryopreserved during different time periods. The influence of alginate was evaluated on the morphology of the encapsulated cells and, it was found that cells went from having a fibroblastoid morphology to a rounded morphology. Additionally, after staining with Safranin O, proteoglycans were found in the encapsulated cells, suggesting that this cell culture material provides the generation of a typical extracellular matrix of chondrocyte tissue. The viability of cells after being cryopreserved in the alginate matrixes during different time periods had a lower viability in most of the cases in comparison with the cells normally cryopreserved. Results suggest that sodium alginate is a good chondrogenic differentiation inducer, but not so useful for the cryopreservation process of adult stem cells. **Rev.cienc.biomed. 2011; 2 (2): 201-209***

KEYWORDS

Stem cells. Biomaterials. Adipose tissue. Cell differentiation

INTRODUCCIÓN

Las células madre (*Stem cells*, SCs) han cubierto una de las principales debilidades de la ingeniería de tejidos, y es la de elección de una fuente de células con buena capacidad de proliferación. Diversos estudios han demostrado que estas células son indiferenciadas, que se encuentran en tejidos específicos en el humano adulto y que poseen un alto potencial de proliferación y diferenciación hacia linajes celulares especializados. Asimismo, el uso de las SCs representa una opción prometedora para resolver diversos problemas clínicos (1) tales como enfermedades osteodegenerativas, fallas renales, enfermedades pulmonares y alteraciones cardíacas o neuronales, asegurando un suficiente número de células específicas del tejido, eliminando la morbilidad del sitio donante y los problemas de rechazo inmunológico (2-4).

El tejido adiposo es fácil de obtener y de allí es posible extraer células madre con alta capacidad de proliferación en cultivo, lo que permite obtener un alto porcentaje de viabilidad después de que son criopreservadas. Previamente se ha reportado que estas células presentan capacidad de diferenciación hacia los linajes adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico y neurogénico (5-10). Particularmente, en el Laboratorio de Biotecnología en Salud, se han realizado estudios de diferenciación de estas células

hacia el linaje osteogénico, evaluando la presencia de calcio extracelular característico del proceso de mineralización de los huesos (11).

Diferentes biomateriales se han utilizado para el cultivo de SCs y se ha comprobado que estos pueden tener una alta influencia en el crecimiento y en la diferenciación celular. Kilian et al. han comprobado la gran influencia que tiene la superficie de cultivo en la diferenciación celular en SC adultas (ASCs) y han establecido cómo pequeños cambios en el ambiente de cultivo son capaces de dirigir el proceso de diferenciación hacia un linaje específico sin necesidad de agregar factores de diferenciación (12).

Específicamente, se ha demostrado que la conservación del fenotipo condrogénico *in vitro*, que se evidencia en la síntesis de una matriz extracelular característica, es dependiente de la forma de cultivo; lo que sugiere que la diferenciación hacia dicho linaje también lo sea (13,14). El alginato, derivado del alga parda, ha sido usado con frecuencia como biomaterial en ingeniería de tejidos debido a que es un material inerte, cuyo procedimiento de implantación *in vivo* es mínimamente invasivo y mantiene el fenotipo condrocítico *in vitro* e *in vivo* (13,15,16). Jin et al. demostraron que cuando las células madre derivadas del tejido adiposo (Adipose-derived Stem cells, ADAS) son embebidas en esferas de alginato, estas son capaces

de formar cartílago, evidenciado una alta producción de las proteínas colágeno tipo II y agregan propias de la matriz extracelular cartilaginosa (17). Otros estudios han revelado que el alginato induce la re-diferenciación en condrocitos que han sufrido de-diferenciación celular recuperando la síntesis de la matriz extracelular condrocítica e inhibiendo la obtención de la proteína colágeno tipo I presente en los procesos de diferenciación (13,16-19). Por todo lo anterior, se plantea la posibilidad de usar el alginato como ambiente tridimensional de crecimiento y diferenciación de células ADAS hacia el linaje condrogénico sin adición de factores.

Por otro lado, diversas investigaciones han demostrado que la utilización del alginato, como agente criopreservante no penetrante, en conjunto con el Dimetil sulfóxido (DMSO), ha generado buenos resultados en ingeniería de tejidos para diversos fines; tales como la criopreservación de células hepáticas (20), germinales (21), pancreáticas y células madre de médula ósea (22). Sin embargo, en la literatura revisada no se ha reportado ningún caso hasta ahora de criopreservación de células ADAS en esferas de alginato. Con el presente artículo se hace un acercamiento a la ingeniería de tejido cartilaginosa, a través del cultivo de células ADAS en esferas de alginato, como factor inductor de condrogénesis, así como la posibilidad de su utilización como agente criopreservante no penetrante para su mantenimiento por largos periodos de tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Obtención y procesamiento del tejido adiposo

El tejido adiposo fue obtenido de 12 pacientes sometidos a liposucción, luego de suscribir un consentimiento informado.

El procesamiento del tejido adiposo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología en Salud del convenio EIA- Universidad CES, siguiendo el protocolo previamente establecido (11). Brevemente, el tejido fue disgregado enzimáticamente utilizando colagenasa tipo I (Gibco, EE.UU) para inducir lisis diferencial y digerir la matriz extracelular. El botón

celular de la fracción vascular del estroma fue obtenido mediante centrifugación.

B. Expansión de células

Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo T75 (75 cm², Falcon, EE.UU) con medio de proliferación *Dulbecco's modified eagle medium: Nutrient mixture F-12* (DMEM/ Ham's F12) (Sigma, Alemania) en una proporción 1:1, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, EE.UU) y 1% de solución de antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) (Gibco, EE.UU). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 70% (11).

C. Encapsulación de células en esferas de alginato

Las células en cultivo fueron encapsuladas en esferas de alginato cuando se encontraban en el pase número tres. Las células se diluyeron en solución estéril de alginato de sodio 1,2% (w/v), 20 mM de 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) y 0,15 M de cloruro de sodio (NaCl). Para obtener las esferas, la mezcla se dispensó por goteo sobre una solución de gelificación compuesta de 102 mM de CaCl₂ en agitación magnética moderada, continua hasta la polimerización y formación de las esferas (23).

Al día diez de la encapsulación se realizó la tinción con yoduro de propidio y Hoechst 33258 (Sigma, EE.UU).

D. Evaluación de la diferenciación condrogénica en células cultivadas y mantenidas en esferas de alginato

Se evaluó la influencia del alginato sobre la morfología de las células encapsuladas. Se realizó documentación fotográfica bajo microscopía de contraste de fase cada 8 días hasta alcanzar el día 30 de cultivo, buscando la morfología característica de las células condrogénicas. Adicionalmente, se evaluó la presencia de glucosaminoglicanos mediante tinción con Safranina 0 (ICMT, Colombia) (24).

E. Criopreservación de células en esferas de alginato

Las esferas construidas con las células fueron congeladas con medio de crecimiento y 5%

DMSO. Como control, se congelaron células con medio de crecimiento y 5% DMSO. Para ambos casos, los crioviales fueron mantenidos a -85°C durante el tiempo de criopreservación.

F. Recuperación de células criopreservadas en esferas de alginato. La viabilidad celular se evaluó a los 8, 30, 45, 60, 90 y 180 días de criopreservación. Los tubos con las esferas de alginato se descongelaron a 37°C en baño María. Se agregó solución de solubilización preparada a 50 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma, EE.UU) y 10 mM de HEPES para diluir las esferas (25). Luego se realizó incubación de 15 minutos a 37°C antes de centrifugar a 400 g durante 10 minutos a 37°C. Las células se resuspendieron en medio de crecimiento para evaluar la viabilidad.

G. Cultivo celular post-descongelamiento
Adicional a la evaluación de viabilidad celular, para el experimento 1 se realizaron cultivos de las células descongeladas (45, 60, 90 y 180 días de criopreservación), y para los experimentos 2 y 3 en los 8, 30 y 45 días de criopreservación. A partir de estos cultivos celulares se verificó la viabilidad celular estimada, se determinó la morfología celular y la capacidad de recuperación de las células.

H. Evaluación de viabilidad en células criopreservadas en esferas de alginato
Se realizó el recuento de células viables mediante exclusión del azul de tripano (proporción 1:1) en una cámara de Neubauer, bajo microscopía de luz invertida (25). Se calculó el número de células con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{\# \text{células}}{4} * \text{factor de dilución} * 10^4$$

Posteriormente se halló el porcentaje de viabilidad celular así:

$$\% \text{viabilidad} = \frac{\# \text{células viables}}{\# \text{células totales}} * 100$$

Para hacer un análisis semicuantitativo de la viabilidad celular, se definió un calificativo para cada uno de los rangos de porcentaje de viabilidad celular (Tabla N° 1).

TABLA N° 1 RELACIÓN SEMICUANTITATIVA DE RANGOS DE PORCENTAJES DE VIABILIDAD CELULAR.	
Rango de viabilidad celular	Calificativo
90%-100%	Muy buena
70%-89%	Buena
50%-69%	Aceptable
<49%	Mala

Se analizó de forma semicuantitativa, la influencia del tiempo de congelación y la densidad al momento de la criopreservación en la viabilidad de las células ADAS en las matrices de alginato. Los rangos calificativos establecidos permitieron comparar la viabilidad a diferentes períodos de tiempo de congelación realizando una relación entre las células sembradas al inicio de los experimentos y las células al momento de la descongelación.

RESULTADOS

A. Expansión celular

Las células expandidas a partir del procesado de tejido adiposo presentan morfología fibroblastoide (Figura N° 1), característica de las ADAS. Las células alcanzaron confluencia celular cada tres días, lo que aseguraba una adecuada tasa de crecimiento.

B. Encapsulación de las células en esferas de alginato

Las células, al finalizar el proceso de polimerización, evidenciaron un cambio inmediato desde una morfología fibroblastoide (Figura N° 1) a una morfología redondeada (Figura N° 2). A partir de la tinción con yoduro de propidio y Hoechst, se observa el citoplasma redondeado que adoptaron las células después de la encapsulación (Figura N° 2D).

C. Diferenciación condrogénica

Después de la coloración con Safranina O se encontró presencia de proteoglicanos en los cultivos celulares en las esferas de alginato; lo que sugiere que el cultivo en este material es capaz de promover la generación de una matriz extracelular típica del tejido condrocítico (Figura N° 3).

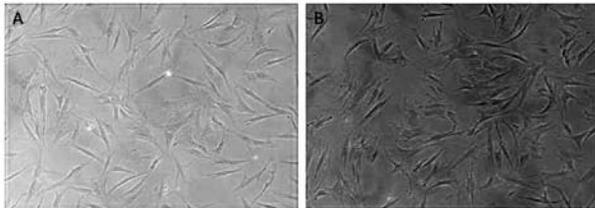


Figura N° 1. Morfología fibroblastoide típica de las células ADAS (20X). A) Día cuarto de cultivo (20X). B) Día séptimo de cultivo (20X).

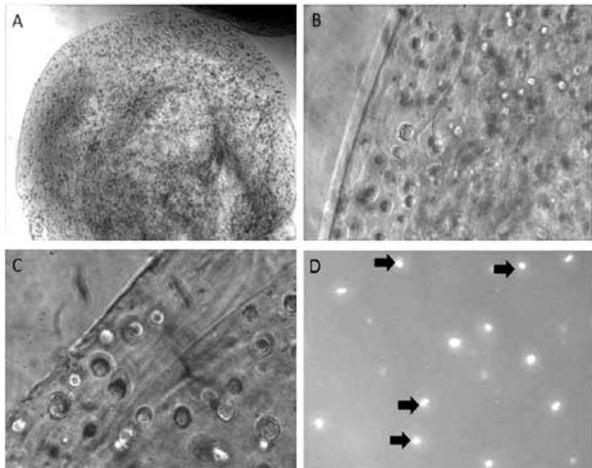


Figura N° 2. Cambio morfológico de las células después del primer día de encapsulación en esferas de alginato de sodio. A) Células encapsuladas (10X). B) Células encapsuladas (20X). C) Células encapsuladas (40X). D) Tinción de yoduro de propidio y Hoechst, las flechas indican las células ADAS que cambiaron de morfología, citoplasma y núcleos redondeados.

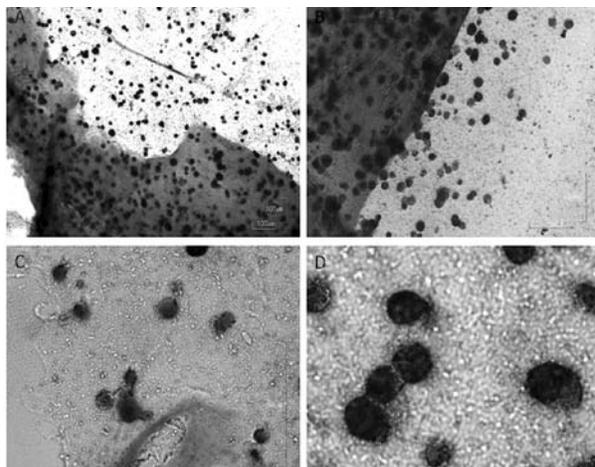


Figura N° 3. Coloración positiva con Safranina O que evidencia la síntesis de proteoglicanos por células ADAS encapsuladas en esferas de alginato.

D. Descongelamiento y evaluación de viabilidad celular

Para todos los experimentos realizados y

para los controles, la cantidad de células recuperadas (en promedio: $6,5 \cdot 10^3$ células para el experimento 1; $1,4 \cdot 10^5$ células para el experimento 2; $9,3 \cdot 10^4$ células para el control 2; $2,4 \cdot 10^5$ células para el experimento 3 y $1,4 \cdot 10^5$ células para el control 3) fue inferior al valor de células criopreservadas ($9,5 \cdot 10^3$ células para el experimento 1; $3,3 \cdot 10^5$ células para el experimento 2 y $3,5 \cdot 10^5$ para el control; $4,4 \cdot 10^5$ células para el experimento 3 y $4,8 \cdot 10^5$ células para el control).

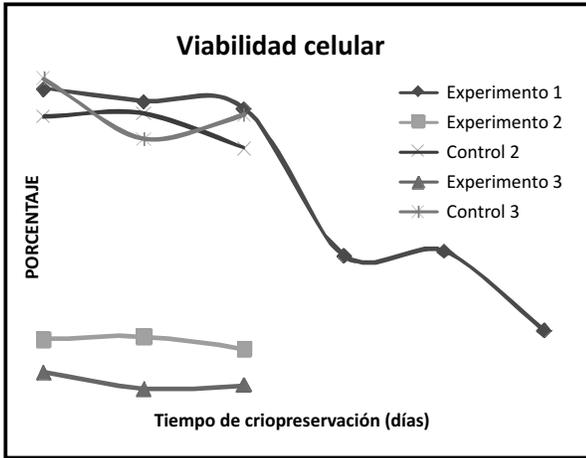
En la gráfica N° 1 se muestra la tendencia de viabilidad durante los tiempos de criopreservación para cada uno de los experimentos y para los controles. A partir de esta, se observa una alta variabilidad entre los datos obtenidos para cada día de descongelamiento, a partir de los tres experimentos, tal como se puede ver, por ejemplo, en el día 8: El experimento 1 arrojó una viabilidad promedio de $79,06\% \pm 13,90$, asignándole una clasificación semicuantitativa de "Buena", mientras que los experimentos 2 y 3, tuvieron una viabilidad promedio de $12,95\% \pm 0,36$ y $4,33\% \pm 2$, respectivamente, quedando en la categoría de "Mala" viabilidad.

Por el contrario, los promedios de viabilidad de las células control (control 8 días: $76,74\%$; control 30 días: $69,23\%$; control 45 días: $67,82\%$), criopreservadas con DMSO, se encuentran dentro de los rangos de clasificación de "Buena" y "Aceptable", con una disminución discreta de la viabilidad a medida que se incrementa el tiempo de criopreservación. Para todos los casos, el porcentaje de viabilidad disminuyó con relación al que tenían las células antes del congelamiento (datos no mostrados).

E. Cultivo celular post-descongelamiento

Debido a que en el ensayo 1 se encapsuló una menor cantidad de células ($9,5 \cdot 10^3$ células por día de criopreservación), sumado a la pérdida de viabilidad, las células cultivadas no fueron capaces de establecer adherencia al sustrato ni proliferar.

Para los ensayos 2 y 3, las características de los cultivos fueron similares para todos los periodos de congelamiento, representadas



Gráfica N° 1. Porcentaje de viabilidad celular. Para el experimento 1 se evaluó la viabilidad de las células criopreservadas durante 8, 30, 45, 60, 90 y 180 días. Para los experimentos 2 y 3, la viabilidad de las células fue evaluada luego de 8, 30 y 45 días de criopreservación.

por un menor número de células adherentes (Figuras 4A y 4B) luego de criopreservación en esferas de alginato, en comparación con los controles (Figuras 4C y 4D).

En general, las células recuperadas de las esferas de alginato y cultivadas en cajas multipozo presentaron una baja capacidad proliferativa, alcanzando confluencia celular en 20 días aproximadamente, en comparación con los controles que llegaban a confluencia luego de 5 días de cultivo. Adicionalmente, las células liberadas de las esferas de alginato presentaron cambios morfológicos y aumento de tamaño a medida que se incrementaban los días de cultivo (Figura N° 4E).

En esta investigación se muestra de forma preliminar, el análisis de los resultados de forma semicuantitativa, por lo que no se realizaron análisis estadísticos

DISCUSIÓN

La ingeniería de tejidos debe enfrentar dos grandes retos para llevar a la práctica clínica los resultados de sus investigaciones: la criopreservación celular y la estandarización de procedimientos eficaces de diferenciación de dichas células hacia los linajes de interés.

Las células ADAS se utilizan actualmente

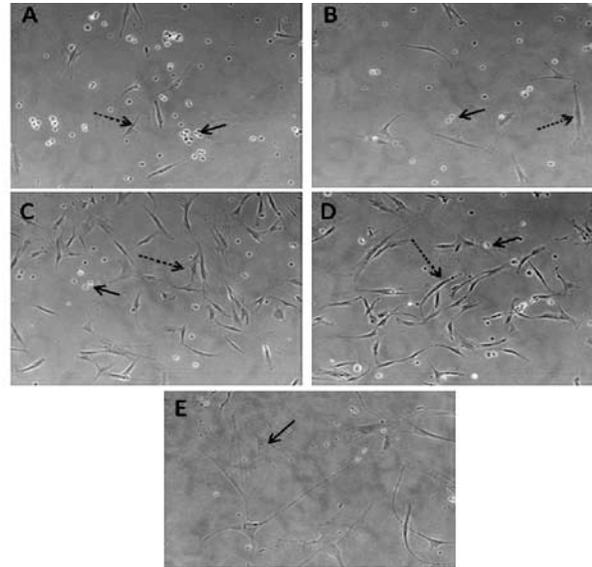


Figura N° 4. Cultivo de células ADAS descongeladas. Las células viables con capacidad de adherencia al sustrato se presentan con morfología alargada (flechas punteadas). Las células no viables se muestran con morfología redondeada (flechas negras). A y B) Células recuperadas de esferas de alginato, ensayo 2, 30 días de criopreservación, 24 horas post-descongelación (10X). C y D) Células control, ensayo 2, 30 días de criopreservación, 24 horas post-descongelación, (10X). E) Células recuperadas de esferas de alginato, ensayo 2, 8 días de criopreservación, 20 días post-descongelación (10X).

como terapia en diversas disciplinas médicas, especialmente en la ortopedia; ya que se ha demostrado su capacidad de diferenciación hacia los linajes óseo, cartilaginoso, adiposo, muscular, endotelial, entre otros (26).

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron comprobar la presencia de proteoglicanos, proteínas propias del tejido cartilaginoso, en las células ADAS encapsuladas en esferas de alginato sin necesidad de agregar citoquinas al medio de cultivo que la mayoría de las veces son citotóxicas y costosas lo que disminuyen el número de células viables y aptas para futuras implantaciones (27). Esto coincide con trabajos realizados por otro grupo donde se asegura que las señales físicas durante el cultivo de células madre mesenquimales como las ADAS, promueven la diferenciación hacia diferentes linajes, entre ellos el condrogénico (12). Estos resultados eran esperados debido a que numerosos grupos han reportado la capacidad que tiene el cultivo tridimensional

en alginato para re-diferenciar condrocitos de-diferenciados después de su cultivo en monocapa (13,16-19,28). A pesar de que no se realizó una la evaluación de la expresión de marcadores genéticos (Colágeno tipo II, Agrecán, Sox19), la presencia de la proteína es suficiente para asegurar que dichos marcadores se están expresando. Por otro lado, aunque es muy importante la presencia de proteoglicanos en el tejido cartilaginoso, también lo es el colágeno tipo II ya que su interacción con los proteoglicanos conforma la matriz con las propiedades mecánicas características de este tejido (29). En estudios posteriores se deberá evaluar la presencia conjunta de colágeno tipo II y proteoglicanos.

En la evaluación con yoduro de propidio se encontraron células bi-nucleadas aunque se ha reportado que los cambios a nivel del cariotipo aparecen después de que las células son subcultivadas más de 5 veces y que las ADAS para estudios no deben ser usadas después de haber pasado este nivel; lo cual debe tenerse en cuenta para estudios posteriores (30).

En estudios preliminares, Goh *et al.* (31) evaluaron las características de las células ADAS criopreservadas en DMSO, y encontraron que la viabilidad celular está en función de la concentración de almacenamiento celular, indicando que a mayor concentración las células cuentan con un menor espacio y, por lo tanto, tienen más prevalencia a formar cristales de agua durante el congelamiento, por lo tanto se reduce el porcentaje de viabilidad celular. Según esta afirmación, se puede plantear que ocurre la misma variación con las células encapsuladas en esferas de alginato, y que se representa por la alta variabilidad en los resultados de viabilidad celular del experimento 1 en relación con los experimentos 2 y 3. Demostrado igualmente con reportes de encapsulación de hepatocitos, en los que se criopreservaba un número aproximado de 1000 células por esfera de alginato, y se mantiene el promedio de viabilidad celular entre el 85% y el 77,5% (32,33).

Finalmente, con relación a los cultivos de las células descongeladas y su capacidad de

recuperación, Malpique *et al.* (34) reportaron que a pesar de encontrar una alta viabilidad celular luego del descongelamiento, en las células cultivadas se observa una disminución en la actividad metabólica, que se recupera sólo diez días luego de cultivar. Freshney (25), indica además que la técnica de exclusión con azul de tripano tiende a sobreestimar la viabilidad celular, y del total de células viables descongeladas solo un porcentaje es capaz de adherirse al sustrato dentro de las 24 horas de cultivo. Reportes que van de acuerdo con los resultados hallados. Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de buscar el número adecuado de células que, en primer lugar, deban ser encapsuladas en las esferas de alginato y, en segundo lugar, puedan soportar el proceso de criopreservación y logren activar su metabolismo nuevamente en cultivo al momento de descongelarlas.

CONCLUSIÓN

A la luz de la metodología planteada y los resultados encontrados en la Investigación, el alginato de sodio puede ser utilizado como factor inductor de diferenciación condrogénica de las células ADAS, con propósitos de regeneración de tejido cartilaginoso. La utilización del alginato de sodio como crioprotector no permeable, en conjunto con el DMSO, no permite conservar la viabilidad de las células ADAS encapsuladas y criopreservadas por cortos periodos de tiempo.

Se recomiendan evaluaciones posteriores en las que por un lado, se determine la presencia de colágeno tipo II característico del tejido cartilaginoso, y por otro, permitan determinar la concentración adecuada de células ADAS que se deben encapsular en cada esfera de alginato, y la cantidad de esferas que deben ser criopreservadas por vial para que se conserve la viabilidad celular.

CONFLICTOS DE INTERÉS: ninguno que declarar.

FINANCIACIÓN: Dirección de investigación Universidad CES (Proyecto baja cuantía código 200907CII04); Programa de Ingeniería Biomédica EIA-CES.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pu LLQ, Cui X, Fink BF, Gao D, Vasconez HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;117(6):1845-1850.
2. Ringe J, Kaps C, Burmester G-R, Sittinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften.* 2002;89(8):338-351.
3. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 2002;13(12):4279-4295.
4. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 2007;25(4):818-827.
5. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.
6. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002;109(1):199-209; discussion 210-211.
7. Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002;109(3):1033-1041; discussion 1042-1043.
8. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004;113(2):585-594.
9. Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006;34(8):466-471.
10. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, et al. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003;111(6):1922-1931.
11. Pineda Molina C, Londoño Peláez C. Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. *Revista Ingeniería Biomédica.* 2009;3(5):58-65.
12. Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(11):4872-4877.
13. Awad HA, Halvorsen Y-DC, Gimble JM, Guilak F. Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 2003;9(6):1301-1312.
14. Betre H, Ong SR, Guilak F, Chilkoti A, Fermor B, Setton LA. Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials.* 2006;27(1):91-99.
15. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;290(2):763-769.
16. Zapata NM, Zuluaga NJ, Betancur SN, López LE. Cultivo de tejido cartilaginoso articular: acercamiento conceptual. *Revista EIA.* 2007;8:117-129.
17. Jin X bing, Sun Y sheng, Zhang K, Wang J, Shi T ping, Ju X dong, et al. Ectopic neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells induced by adenoviral-mediated transfer of hTGF beta2. *Biomaterials.* 2007;28(19):2994-3003.
18. Lee JW, Kim YH, Kim S-H, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med. J.* 2004 30;45 Suppl:41-47.
19. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp. Cell Res.* 1994;212(1):97-104.
20. Stensvaag V, Furmanek T, Lønning K, Terzis AJA, Bjerkvig R, Visted T. Cryopreservation of alginate-encapsulated recombinant cells for antiangiogenic therapy. *Cell Transplant.* 2004;13(1):35-44.
21. Herrler A, Eisner S, Bach V, Weissenborn U, Beier HM. Cryopreservation of spermatozoa in alginic acid capsules. *Fertil. Steril.* 2006;85(1):208-213.
22. Bhakta G, Lee KH, Magalhães R, Wen F, Gouk SS, Hutmacher DW, et al. Cryopreservation of alginate-fibrin beads involving bone marrow derived mesenchymal stromal cells by vitrification. *Biomaterials.* 2009;30(3):336-343.
23. García F, Zapata NM, López LE, Londoño Peláez C. Caracterización de una fuente celular bovina multipotente y su potencial aplicación como modelo para la evaluación de biomateriales. 2008;
24. Fuentes Lacouture MF. Optimización del sistema de cultivo y caracterización de células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea humana [Trabajo de grado]. Colombia (BOG): Pontificia Universidad Javeriana; 2008. 83 p.
25. Freshney I. *Culture of Animal Cells: A manual of basic technique fifth edition.* 5th ed. New York: Wiley & Liss; 2005.
26. Wilson A, Butler PE, Seifalian AM. Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review. *Cell Prolif.* 2011;44(1):86-98.
27. Takata A, Otsuka M, Kogiso T, Kojima K, Yoshikawa T, Tateishi R, et al. Direct differentiation of

- hepatic cells from human induced pluripotent stem cells using a limited number of cytokines. *Hepato Int* [Internet]. 2011 [cited 2011]; Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12072-011-9251-5>
28. Hsieh-Bonassera ND, Wu I, Lin JK, Schumacher BL, Chen AC, Masuda K, et al. Expansion and redifferentiation of chondrocytes from osteoarthritic cartilage: cells for human cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(11):3513-3523.
 29. Little CJ, Bawolin NK, Chen D. Mechanical Properties of Natural Cartilage and Tissue Engineered Constructs. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2011;110316043918076.
 30. Sugii S, Kida Y, Berggren WT, Evans RM. Feeder-dependent and feeder-independent iPS cell derivation from human and mouse adipose stem cells. *Nat Protoc*. 2011;6(3):346-358.
 31. Goh BC, Thirumala S, Kilroy G, Devireddy RV, Gimble JM. Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(4):322-324.
 32. Guyomard C, Rialland L, Fremond B, Chesne C, Guillouzo A. Influence of alginate gel entrapment and cryopreservation on survival and xenobiotic metabolism capacity of rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1996;141(2):349-356.
 33. Rialland L, Guyomard C, Scotte M, Chesné C, Guillouzo A. Viability and drug metabolism capacity of alginate-entrapped hepatocytes after cryopreservation. *Cell Biol. Toxicol*. 2000;16(2):105-116.
 34. Malpique R, Ehrhart F, Katsen-Globa A, Zimmermann H, Alves PM. Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(3):373-386.



GRUPO DE INVESTIGACIÓN: NIÑOS HERÓICOS

LÍNEAS: Infectología Pediátrica. Neurología pediátrica

Email: mirbar2001@yahoo.com



GRUPO DE INVESTIGACIÓN: UNIMOL

LÍNEAS: Alteraciones metabólicas y patologías relacionadas con obesidad. Biología Molecular en Enfermedades Genéticas e infecciosas. Estrategias y Gestión Educativa en Medicina. Farmacología Molecular y Bioquímica. Mecanismos de regulación de la expresión génica. Medicina Tropical. STEM Cell

Email: degomez@hotmail.com