



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA,  
INMUNOFENOTIPO Y CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN  
DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES  
PROVENIENTES DE MÉDULA ÓSEA Y SANGRE DE  
CORDÓN UMBILICAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

GUADALUPE ROSARIO FAJARDO ORDUÑA

DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS



MÉXICO D. F.

SEPTIEMBRE 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Me siento fuera de mi y sin embargo estoy más unida y conciente de mi como ser de luz

No se como he llegado a donde estoy y sin embargo se qué es lo que estoy haciendo y que aquí debo hacerlo

No se que va a pasar con migo en un futuro tanto cercano como lejano y sin embargo se exactamente qué  
es lo que voy a hacer y cómo lo voy a realizar

No se nada de mi y sin embrago estoy conciente de todo el potencial que presento

Tal vez me confunda y me sea difícil realizarlo, sólo deseo seguir teniendo guías para que me ayuden a  
lograrlo

*PAX*

Uno nunca sabe quien es hasta que se da cuenta de que no es lo que cree ser

Como es arriba es abajo, pero sólo el que llega arriba sabe lo que es abajo

*Sat Arthat José Marchelli Noli*

## Índice

	Lista de abreviaturas.....	1
I.	Resumen.....	2
II.	Marco Teórico.....	4
	1. Biología de la Médula Ósea.....	4
	2. Sistema Estromal.....	6
	3. Células Troncales Mesenquimales (CTMs).....	9
	4. Potencial Biológico y Aplicación Clínica de las CTMs.....	13
	5. Fuentes Alternativas de CTMs.....	15
	6. Sangre de Cordón Umbilical y Presencia de CTMs.....	16
III.	Planteamiento del Problema y Justificación.....	22
IV.	Hipótesis.....	24
V.	Objetivos.....	25
	1. Objetivo General.....	25
	2. Objetivos Particulares.....	25
VI.	Metodología.....	26
	1. Obtención de Muestras de médula ósea (MO) y sangre de cordón umbilical (SCU).....	26
	2. Obtención y Cultivo de las CTMs.....	29
	3. Morfología de las CTMs.....	27
	4. Inmunofenotipo de las CTMs.....	28
	5. Capacidad de Diferenciación de las CTMs.....	28
	5.1 Inducción Osteogénica.....	28
	5.2 Inducción Adipogénica.....	29
	5.3 Inducción Condrogénica.....	30
	6. Inducción Neural y Expresión de proteínas neurales.....	30

7. Análisis Estadístico.....	31
VII. Resultados.....	32
1. Obtención de CTMs provenientes de MO y SC.....	32
2. Porcentaje de Obtención y Frecuencia de CTMs en MO y SCU.....	32
3. Morfología de CTMs de MO y SCU.....	33
4. Inmunofenotipo de CTMs de MO y SCU.....	36
5. Capacidad de Diferenciación de CTMs de MO y SCU.....	39
5.1 Capacidad de Diferenciación Osteogénica.....	39
5.2 Capacidad de Diferenciación Adipogénica.....	41
5.3 Capacidad de Diferenciación Condrogénica.....	46
6. Capacidad de Diferenciación Neural y Expresión de Proteínas Neurales.....	45
VIII. Discusión.....	48
IX. Conclusiones.....	56
X. Perspectivas.....	57
XI. Bibliografía.....	59

## I. RESUMEN

La principal fuente de células troncales mesenquimales (CTMs) es la médula ósea (MO), sin embargo, actualmente sangre de cordón umbilical (SCU) se ha propuesto como una fuente alternativa para la obtención de estas células, y aunque varios grupos de investigación han logrado obtener CTMs de SCU, muchas de sus características biológicas aún no se conocen. En el presente estudio se obtuvieron CTMs de MO y SCU, y se caracterizaron de manera comparativa analizando su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos, condroblastos y células neurales. Las CTMs se obtuvieron en el 100% de las muestras de MO y en un 10.5% de las muestras de SCU. Se detectaron en menor frecuencia en SCU en comparación con MO, observándose 1 CTM en  $200.5 \times 10^6$  células mononucleares y 1 CTM en  $0.031 \times 10^6$  células mononucleares en SCU y MO, respectivamente. Al analizar la morfología de las CTMs se observaron 4 diferentes tipos morfológicos (células grandes, fibroblastoides, neurales y pequeñas) en cultivos provenientes de ambas fuentes. Las CTMs tanto de MO como de SCU fueron negativas para la expresión de marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34, CD45 así como para CD62L, y HLA-DR, y positivos para marcadores característicos de células mesenquimales como CD73, CD90 y CD105, sin embargo la expresión de CD90 por CTMs de SCU fue variable ( $61 \pm 30\%$ ) en comparación con MO ( $85 \pm 15\%$ ), en donde todas las muestras presentaron una alta expresión de este marcador. Contrario a esto, la expresión de CD44 fue alta en todas las muestras de ambas fuentes, por lo que proponemos a este marcador como característico, al menos para las CTMs de SCU y no así CD90. Por otra parte, las CTMs de SCU presentaron mayor capacidad de diferenciación hacia osteoblastos en comparación con MO. Tanto las CTMs de MO y SCU, tuvieron la capacidad de diferenciarse hacia condroblastos, sin embargo se observó mayor formación de cartílago hialino por parte de las CTMs de MO y mayor formación de cartílago fibroso por aquellas CTMs de SCU. Únicamente las CTMs de MO se pudieron diferenciar morfológicamente hacia adipocitos, los cuales fueron positivos a la tinción con Rojo Oleoso, y aunque las CTMs de SCU no formaron vacuolas lipídicas, estas formaron montículos celulares positivos a la tinción con Rojo Oleoso. Debido a que en el análisis morfológico se observaron células con características neurales, se analizó la expresión de

proteínas neurales (Nestina, NF200, MAP2, NeunN) y de astrocitos (GFAP) en las CTMs de MO y SCU, en ausencia y presencia de medio inductor neural, encontrando la expresión de estas proteínas en las CTMs de ambas fuentes antes de ser inducidas, e incrementando significativamente su expresión después de haber sido estimuladas, lo cual indica la existencia de una subpoblación de CTMs que podría poseer un potencial intrínseco, el cual se incrementa en presencia de inductores neurales. Nuestros resultados sugieren que SCU se puede considerar como una fuente alternativa de CTMs, a pesar de presentar diferencias en algunas características biológicas con aquellas provenientes de MO.

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. BIOLOGÍA DE LA MÉDULA ÓSEA

En el ser humano la médula ósea (MO) es el órgano donde se producen todas las células de la sangre a partir de una célula llamada célula troncal hematopoyética (CTH; Panoskaltis et al, 2005). Las CTHs son pluripotentes, esto es, capaces de generar los diferentes linajes hematopoyéticos: eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, basófilos/mastocitos, eosinófilos, neutrófilos/granulocitos, monocitos/macrófagos, linfocitos B y T (Szilvassy, 2003). En conjunto las diferentes células sanguíneas a distintos estadios de maduración constituyen el sistema hematopoyético (Figura 1).

Dentro del sistema hematopoyético podemos encontrar cuatro compartimentos. El primero es el de CTHs que son capaces de autorrenovarse y generan a todos los linajes hematoyéticos in vivo, así como sostienen la producción de estas células durante el resto de la vida de un individuo (Szilvassy, 2003; Wognum et al, 2003). En el segundo compartimiento se encuentran las células progenitoras hematopoyéticas (CPHs) o unidades formadoras de colonias (CFU por sus siglas en inglés) originadas por las CTHs (Mayani et al, 1993). Tanto las CTHs como las CPHs presentan una morfología linfoblastoide y expresan el antígeno CD34 (Healy et al, 1995). Las CPHs presentan un alto potencial proliferativo y a diferencia de las CTHs su potencial de diferenciación se restringe, expresando sólo algunos antígenos de linaje dependiendo del tipo de progenitor (Mayani et al, 1993). Las CPHs originan células comprometidas hacia un linaje determinado, llamadas células precursoras, con una capacidad de proliferación limitada y pueden ser reconocidas por su morfología (tercer compartimiento; Mayani, 1992). Por último, en el cuarto compartimiento se encuentran las células maduras circulantes. Al proceso por el cual las CTHs originan CPH que producen células precursoras y estas últimas a las células maduras de la sangre se le denomina hematopoyesis (Figura 1).

## SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

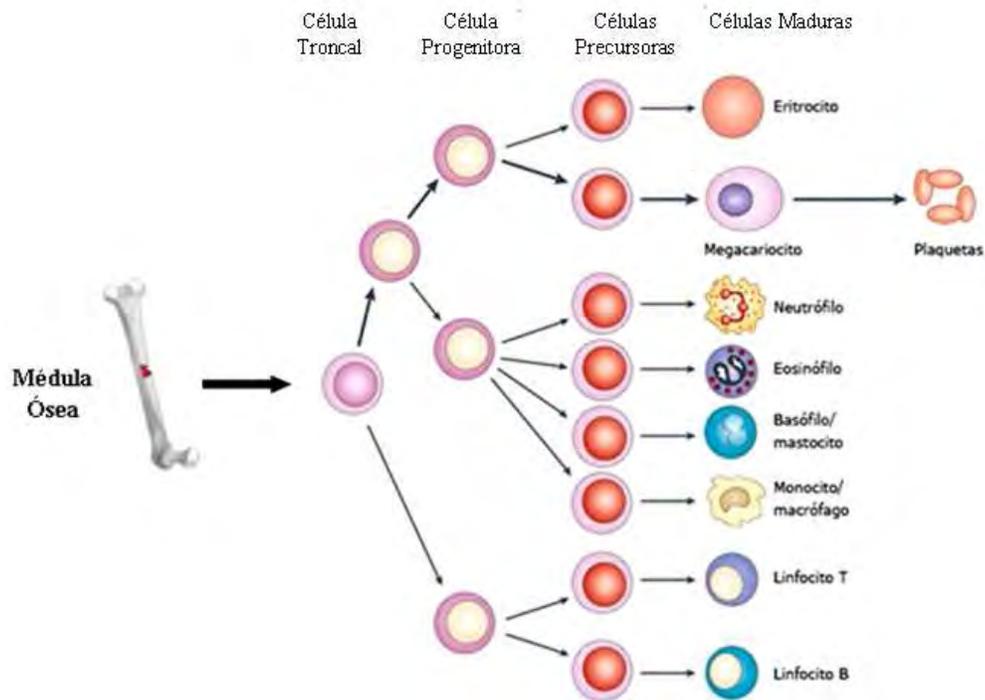


Figura 1. Esquema del sistema hematopoyético con los cuatro compartimentos celulares dentro de la jerarquía hematopoyética.

Las células hematopoyéticas tienen un tiempo de vida finito, por lo que mantener sus números en condiciones estándar o de amplificación en respuesta a estrés hematológico, requiere de una actividad hematopoyética constante y experimentar una serie de divisiones clonales a lo largo de la vida del individuo (Szilvassy, 2003). Las células hematopoyéticas residen en la MO en un microambiente especializado que modula la quiescencia, autorrenovación, proliferación y compromiso de las CTHs y la expansión, maduración y apoptosis de las CPHs. La regulación de estos mecanismos se realiza a través de interacciones físicas y bioquímicas que ocurren entre el estroma, las proteínas de la matriz extracelular y las citocinas producidas tanto por células estromales como por células hematopoyéticas. A este conjunto de componentes celulares y proteicos se le denomina microambiente hematopoyético (Mayani et al, 1992; Hubin et al, 2005; Panoskaltis et al, 2005; Adams y Scadden, 2006).

Por lo anterior podemos decir que la MO se compone de dos principales sistemas, el hematopoyético y el estromal, que no sólo coexisten, también colaboran funcionalmente (Bianco et al, 2001).

## 2. SISTEMA ESTROMAL

El estroma de la MO es una red tridimensional que soporta físicamente y mantiene fisiológicamente a las células hematopoyéticas. El estroma consiste de cinco tipos de células: macrófagos, células endoteliales, células reticulares, adipocitos y osteoblastos. A continuación se mencionan algunas características de las células que conforman el sistema estromal (Figura 2).

Los macrófagos son el segundo mayor componente celular del estroma y se encuentran en tres sitios diferentes dentro de la MO: como macrófagos centrales en islas eritroblásticas, sugiriendo que participan en la maduración eritroide; sobre la parte abluminal del sinusoides endotelial y dispersos entre las células hematopoyéticas (Mayani et al, 1992).

La red vascular medular está cubierta por una capa de células endoteliales, las cuales se encuentran en contacto estrecho con las células hematopoyéticas maduras que salen hacia la circulación (Bianco et al, 2001), lo que sugiere que las células endoteliales pueden modular los últimos estadios de maduración de las células hematopoyéticas y su liberación hacia torrente sanguíneo. Se ha publicado que las células endoteliales expresan moléculas que regulan la adhesión, homing (capacidad de dirigirse hacia diferentes tejidos), injerto después de trasplante y posiblemente la proliferación de las CTHs (Jung et al, 2007; Rafii et al, 1997), así como la secreción de proteínas como sE-selectina, sVCAM-1 y sICAM-1 durante la movilización de CTHs estimulada por GM-CSF (Sudhoff et al, 2002; Chen et al, 2003).

## CELULAS ESTROMALES DE LA MÉDULA ÓSEA

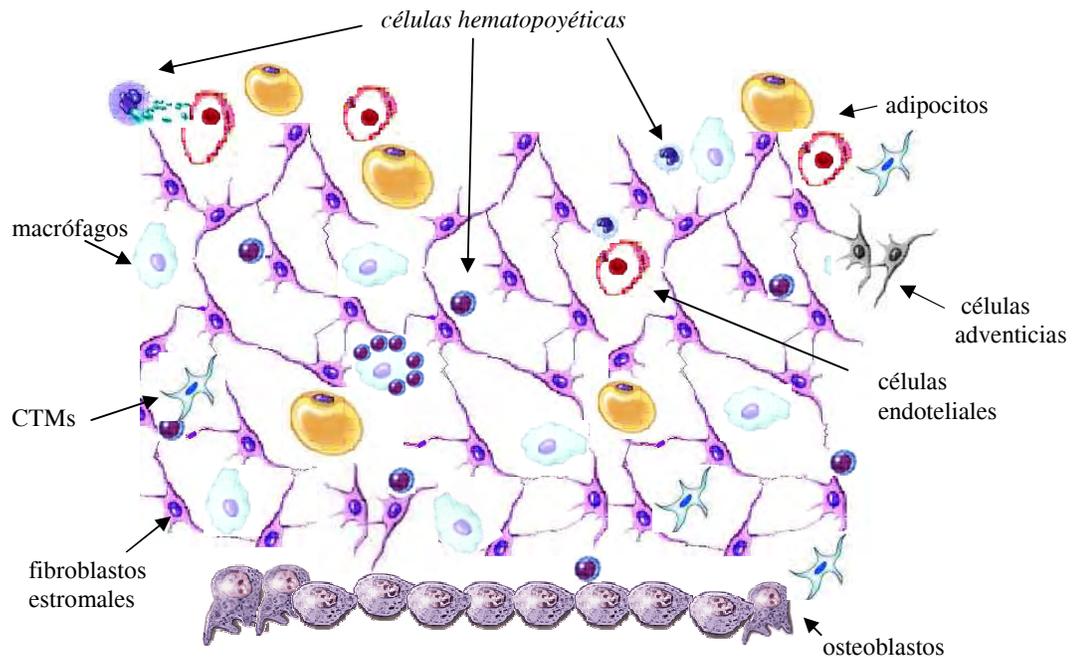


Figura 2. Células que conforman el sistema estromal de la médula ósea. Macrófagos, de origen hematopoyético; osteoblastos, adipocitos, fibroblastos estromales y células endoteliales, de origen mesenquimal.

Las células reticulares son el mayor componente celular del estroma de la MO. Estas células pueden ser de tipo adventicias o fibroblásticas. Las células adventicias se localizan alrededor de los sinusoides venosos formando una capa que cubre parcialmente el lado abluminal del endotelio y regulan la migración de las células maduras de la MO hacia la circulación (Mayani et al, 1992; Bianco y Boyde, 1993). Además pueden acumular lípidos y dar lugar a la formación de adipocitos, ello cuando hay espacio disponible o en caso de una hematopoyesis anormal (Bianco et al, 2001). Las células fibroblásticas se localizan en contacto con las CTHs, su citoplasma soporta células hematopoyéticas en maduración, y se encuentran usualmente en contacto con células granulocíticas inmaduras (Mayani et al, 1992; Bianco y Boyde, 1993). Los fibroblastos estromales son capaces de secretar y sintetizar citocinas como la IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, SCF, IFN $\beta$ , SDF-1, además de moléculas de la matriz extracelular (Flores-Figueroa, 2006).

Los adipocitos aumentan en la MO cuando se presenta una patología o cuando se reduce la actividad hematopoyética, debido al incremento en la edad del individuo (Bianco et al, 1999). Se ha publicado que una manera indirecta de regular la hematopoyesis por los adipocitos, se debe a la secreción de leptina, ya que sus niveles están relacionados con el número de células blancas (Wilson et al, 1997), al igual, la adiponectina, proteína secretada por estas células, incrementa la proliferación de las CTHs, mientras las mantiene en un estado funcionalmente inmaduro (DiMascio et al, 2007).

Los osteoblastos tienen una participación importante en la hematopoyesis, inducen la expansión y maduración de osteoclastos (derivados de CTHs), así como su reclutamiento en superficies mineralizadas para una activación en la reabsorción del hueso (Dazzi et al, 2006). Se ha observado que el número de CTHs se incrementa conforme aumenta el número de osteoblastos, incluso que CTHs se localizan adjuntas a células osteoblásticas sobre la superficie del hueso, sugiriendo que el tamaño del nicho osteoblástico, regula la producción hematopoyética (Zhang et al, 2003). In vitro, los osteoblastos suprimen la proliferación y mantienen el fenotipo inmaduro de CTHs, contrario al efecto que producen las células reticulares (Balduino et al, 2005). También se han descrito modelos en donde los osteoblastos sintetizan proteínas que mantienen en quiescencia a las CTHs, sin inhibir la diferenciación de CPHs (Haylock y Nilsson, 2005).

Por otra parte, uno de los productos de las células estromales es la matriz extracelular, la cual se compone de colágeno tipo I, III, y IV producidos por los fibroblastos y células endoteliales; además, también se compone de macromoléculas estructurales (proteoglicanos y glicosaminoglicanos) y proteínas de adhesión como fibronectina (producida por células reticulares y macrófagos) y laminina (producida por células endoteliales), que ayudan a las células hematopoyéticas a acoplarse con la red de colágeno (Campbell y Wicha, 1988; Panoskaltis et al, 2005).

### 3. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

Como se mencionó, la MO se compone de dos principales sistemas, el hematopoyético y el estromal los cuales colaboran funcionalmente (Bianco et al, 2001). Las células del estroma tales como reticulares, adipocitos, osteoblastos y endoteliales se originan a partir de una célula troncal mesenquimal (CTM; Dazzi et al, 2006), de la cual no se ha determinado su localización dentro de la MO. Algunos autores relacionan a las CTMs con pericitos subendoteliales, mostrando evidencias de la presencia de estas células en secciones arteriales y capilares de la red vascular de la MO (Bianco et al, 2001).

La presencia de las CTMs en la MO fue documentada por primera vez por Goujon, quien observó el potencial osteogénico de estas células en transplantes de médula ósea de ratón, confirmado un año después por Biakow (Goujon, 1869; Biakow, 1870). Posteriormente, Danis mostró que células de la propia MO, tienen un potencial osteogénico y no sólo factores quimioatrayentes a células osteogénicas (Danis, 1960). Estos resultados fueron confirmados por otros investigadores más tarde (Petrakova et al, 1963; Friedenstein et al, 1966; Bruder et al, 1997).

En estudios posteriores realizados por Friedenstein y cols. utilizando ratones y cobayos, observaron una población de células de MO, adherentes, clonogénicas, no fagocíticas y con morfología fibroblastoide que formaban parte del estroma medular y que daban origen a las células del microambiente hematopoyético (a excepción de macrófagos), dichas células fueron denominadas como mecanocitos estromales o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F; Friedenstein, 1973), las cuales, bajo condiciones apropiadas, pueden dar origen a tejido conectivo incluyendo cartílago, hueso, tejido adiposo, tejido fibroso, e incluso estroma capaz de mantener la mielopoyésis (Friedenstein et al, 1974).

Basado en las observaciones de Friedenstein, Owen desarrolló el concepto en el que células de tejido conectivo derivan de un antecesor común, al cual denominó célula troncal estromal (Owen, 1978) y más tarde propuso un modelo con tres compartimentos: el de una célula troncal, un progenitor comprometido y el

de células maduras que incluían células reticulares, fibroblastos, adipocitos y osteocitos (Owen, 1985). Caplan llamó a esta célula adulta multipotente, célula troncal mesenquimal (CTM; Caplan, 1991). La primera descripción detallada del potencial tri-linaje (adipocitos, condrocitos y osteoblastos) de las CTMs fue descrita por Pittenger y cols. (Pittenger et al, 1999) (Figura 3).

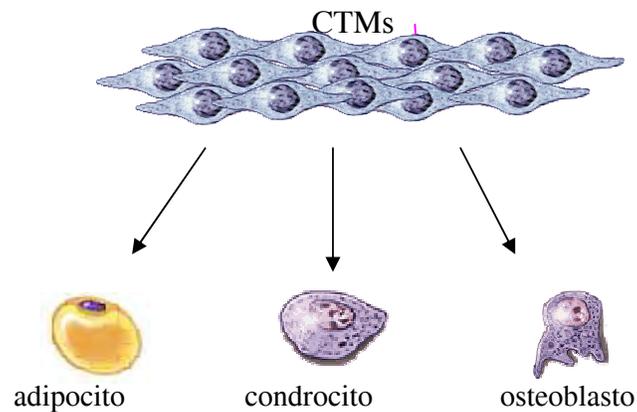


Figura 3. Potencial tri-linaje de las células troncales mesenquimales. Diferenciación hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos.

Existen protocolos que describen la obtención de las CTMs y pueden ser utilizados de manera independiente o combinados. El método tradicional utilizado por Friedenstein consiste en cultivar células provenientes de MO, en donde las CTMs se adhieren a la superficie plástica de la caja de cultivo y después de un lapso de tiempo se retiran las células no adherentes. Los cultivos de células adherentes son heterogéneos por la contaminación de células, sin embargo después de varias resiembras, predominan células que crecen en forma de CFU-F (Friedenstein et al, 1974).

Otro protocolo usado para la obtención de CTMs, incluye el uso del Percoll como gradiente de densidad que enriquece la fracción de células mononucleares (CMN) cultivándolas de la misma manera que Friedenstein; la frecuencia reportada de este método de obtención fue de 1 a 5 CFU-F en  $1 \times 10^5$  CMN de MO que fueron sembradas; las colonias se formaban entre 14 y 21 días y después de éste

periodo presentaban un crecimiento exponencial (Haynesworth et al, 1996). Actualmente otros grupos también usan ficoll para la obtención de CTMs (Flores-Figueroa et al, 2006). Otro método es la selección positiva, en donde se purifican las células por citometría de flujo reconociendo la expresión de antígenos como STRO-1 (Simons y Torok-Storb, 1991); HOP-26 (Zannettino et al, 2003) y el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento neural (alpha-LNGFR; Quirici et al, 2002). Sin embargo estos antígenos no son exclusivos de las CTMs, teniendo la desventaja de obtener una población contaminada, además que no todas las CTMs expresan estas moléculas. Otro método para la obtención de CTMs es la selección negativa, en donde se realiza una inmunodepleción de células que expresan antígenos hematopoyéticos (Lee et al, 2004).

Las CTMs expresan un gran número de moléculas de adhesión, proteínas de matriz extracelular y receptores a citocinas, asociadas con su función e interacciones celulares dentro del estroma de la MO (Devine et al, 2000). Además expresan una amplia variedad de antígenos característicos de otros tipos de células. Se ha publicado que las CTMs expresan CD44, CD105 (SH2, endoglina), CD106 (VCAM-1), CD166, CD29, CD73 (SH3 y SH4), CD90 (Thy-1), CD117 (c-kit), STRO-1, CD140 (PDGFr) y EGFr. Expresan moléculas de adhesión celular tales como integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ , ICAM-1, ICAM-2, LFA-3, L-selectina y no presentan marcadores típicos para linajes endotelial y hematopoyético (CD11b, CD14, CD31, CD33, CD34, CD133, y CD45), a excepción del CD90 (Bobis et al, 2006).

No hay un marcador antigénico exclusivo para las CTMs y de hecho diferentes grupos de investigación han establecido una variedad de combinaciones de marcadores para su detección, que aún es muy variable entre los diferentes grupos, en parte debido a que se han observado transformaciones espontáneas en cultivos a largo plazo respecto a su inmunofenotipo (Jackson et al, 2007).

Por otro lado, poco se sabe de los marcadores de superficie expresados antes de someter las CTMs a expansión in vitro, dado que la presencia de algunos antígenos puede cambiar ex vivo debido a las condiciones de cultivo específicas de cada grupo y el número de pasajes en el que se encuentran las células (Dazzi et al, 2006).

Debido a que los investigadores publican estudios de CTMs usando diferentes métodos para su obtención y expansión, recientemente la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés), ha propuesto a la comunidad científica adoptar medidas estándares para la identificación de CTMs. Así, la ISCT propone tres criterios: primero, las células deben ser adherentes al plástico cuando son mantenidas en cultivo; segundo, deben ser positivas para los antígenos CD105, CD73 y CD90, adicionalmente deben ser negativas para la expresión de antígenos hematopoyéticos tales como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 y HLA-DR, y tercero, deben ser capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos (Dominici et al, 2006).

Las CTMs proliferan rápidamente y mantienen mayor multipotencialidad al ser cultivadas a bajas densidades de  $1 \times 10^4$  a  $4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> (Sekiya et al, 2001; Friedenstein et al, 1976). La concentración inicial del cultivo también afecta su morfología, cuando éstas se cultivan a bajas densidades mantienen una forma de huso y cuando se siembran a altas densidades o están en confluencia se tornan anchas (Bobis et al, 2006). In vitro, el crecimiento de las CTMs ocurre en tres fases: 1<sup>a</sup>, el crecimiento es lento al inicio del cultivo que dura de 3 a 4 días; 2<sup>a</sup>, una rápida expansión durante varios días (fase larga) y 3<sup>a</sup>, una fase estacionaria después de haber llegado a confluencia. Algunos estudios sugieren que estas fases de crecimiento son reguladas por la expresión de Dickkopf-1 (Dkk-1) y Wnt5a, ya que la expresión de Dkk-1 aparece durante la fase larga, mientras la expresión de Wnt5a es mayor durante la fase estacionaria (Colter et al, 2001; Gregory et al, 2003). Bajo condiciones óptimas, las CTMs pueden ser capaces de dividirse y crecer hasta 50 resiembras. Al examinar el perfil de su ciclo celular se ha encontrado que cerca del 10% de las células se encuentran en fase S, G2 y M mientras que el resto permanecen en quiescencia (Conget y Minguell, 1999).

La proliferación de las CTMs también es influenciada por citocinas tales como PDGF, FGF-2, EGF y TGF $\beta$  que ejercen efectos mitógenos en las células, contrario a INF $\alpha$  e IL-4 que inhiben su crecimiento (Bruder et al, 1997). La interacción heparina/EGF con el receptor HER-1 (HB-EGF-1/HER-1) favorece la proliferación y previene la diferenciación de las CTMs (Krampera et al, 2005).

Como se ha mencionado, las CTMs y células estromales más diferenciadas, tienen la capacidad de producir citocinas que mantienen a las CTHs en quiescencia o promueven su autorenovación. Entre ellas podemos mencionar a SCF, LIF, SDF-1, OSM, BMP-4, Flt-3 y TGF- $\beta$ . Además, las CTMs producen una variedad de interleucinas como IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 e IL-15 y cultivadas en presencia de IL-1 $\alpha$  producen citocinas como G-CSF y GM-CSF (Haynesworth et al, 1996; Majumdar et al, 1998; Majumdar et al, 2000)

#### 4. POTENCIAL BIOLÓGICO Y APLICACIÓN CLÍNICA DE LAS CTMs

En los primeros estudios sobre las CTMs se creía que eran capaces de generar únicamente células de origen mesodérmico, sin embargo, recientemente esta idea ha cambiado ya que se ha publicado que son capaces de diferenciarse a una variedad de linajes celulares incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, mioblastos, cardiomiocitos, hepatocitos, tenocitos, epitelio, células de pulmón, intestino, riñón, bazo e incluso neuronas (Bobis et al, 2006; Baksh et al, 2004). Algunos científicos hipotetizan que la generación de células de origen diferente al mesodérmico es debido a un proceso de reprogramación en la expresión de genes denominado plasticidad celular (Sato et al, 2005; Bobis et al, 2006) (Figura 4) .

Por sus características, incluyendo su gran potencial de proliferación y su capacidad de diferenciarse hacia diferentes tipos celulares, las CTMs representan una herramienta promisoría para su uso en el campo de la terapia celular. Se ha publicado que las CTMs poseen la capacidad de injertar en varios tejidos y órganos cuando son infundidas sistémicamente y estos injertos se han mostrado estables a largo plazo (Bobis et al, 2006). Las CTMs infundidas en sangre periférica, han mostrado la habilidad de migrar hacia sitios u órganos específicos con daño, éste fenómeno ha sido publicado en modelos animales de fractura de hueso, isquemia cerebral e infarto al miocardio (Shake et al, 2002; Wang et al, 2002).

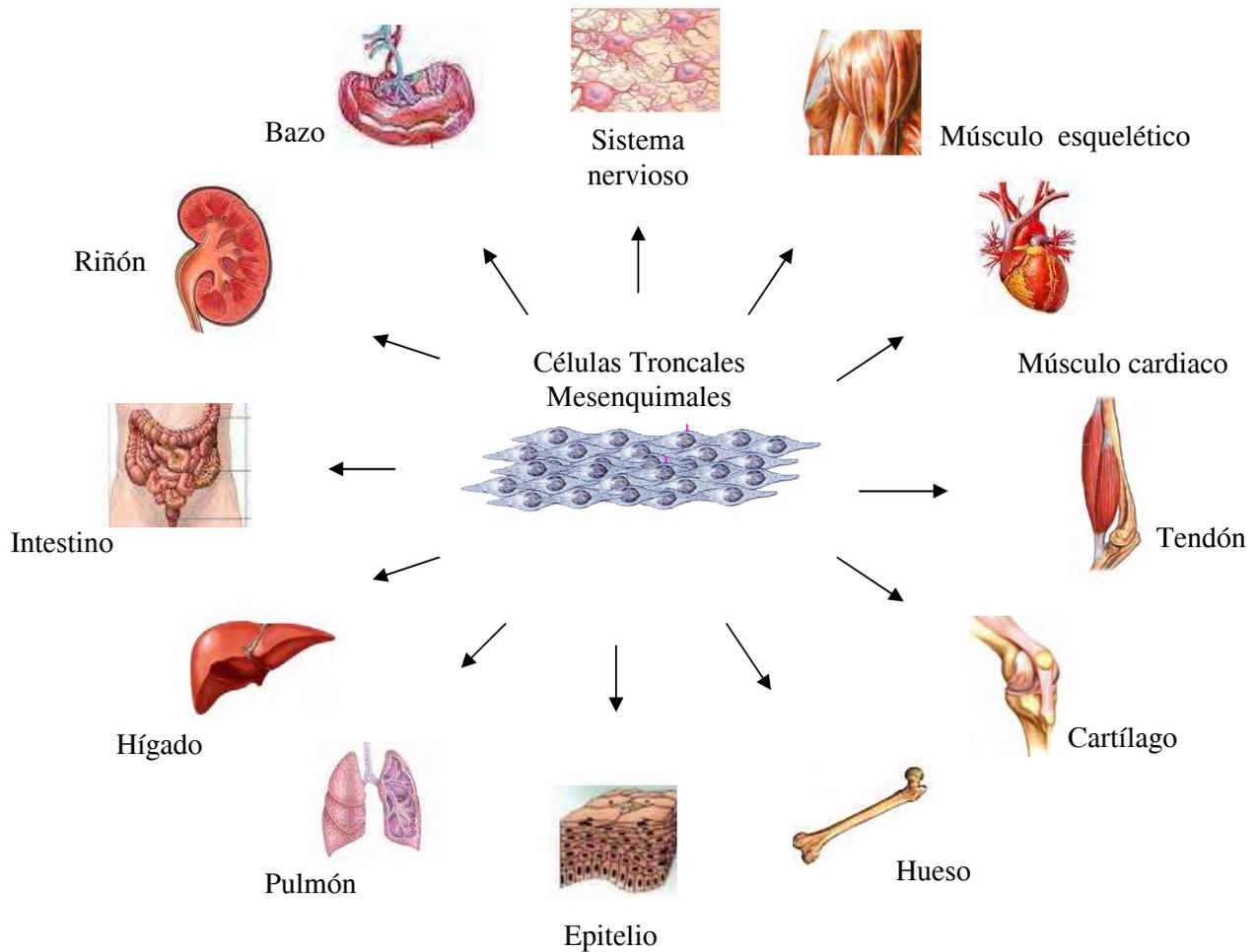


Figura 4. Esquema representativo de la multipotencialidad de las CTMs. Las CTMs presentan la capacidad de diferenciación hacia células de origen endodérmico: pulmón, hígado, intestino, riñón y bazo; mesodérmico: músculo esquelético, músculo cardíaco, tendón, cartílago, hueso; y ectodérmico: sistema nervioso.

Similar a lo que sucede en el sistema hematopoyético, las CTMs secretan citocinas que pueden actuar de manera autócrina y/o parácrina. Estas citocinas pueden suprimir reacciones inmunes locales, inhibir fibrosis y apoptosis e incrementar el proceso de angiogenesis en tejido en reparación, así como estimular la mitosis y diferenciación de las mismas CTMs hacia células del tejido dañado. Este fenómeno de las CTMs como mediadores tróficos se ha observado

en modelos de infarto al corazón, infarto al cerebro y regeneración de meniscos, sin que éstas se diferencien necesariamente a células del tejido dañado (Caplan y Dennis, 2006; Li et al 2005; Pak et al, 2003; Murphy et al, 2003).

Uno de los primeros estudios relacionados con el uso terapéutico de las CTMs, fue al ser transplantadas en pacientes con osteogénesis imperfecta (Horwitz et al, 1999). También se ha observado la capacidad de injerto en músculo de pacientes con distrofia muscular (Gussoni et al, 2002) y mejora en la funcionalidad y prevención de fibrosis en el área infartada del corazón en pacientes con infarto al miocardio (Pittenger y Martin, 2004). De igual manera, el co-transplante de CTMs con CTHs, mejora el injerto de estas últimas, acelera la reconstitución de la hematopoyesis y disminuye la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD, por sus siglas en ingles), al inhibir la activación de los linfocitos T (Maitra et al, 2004). De hecho, se ha publicado un caso de un paciente con leucemia linfoblástica aguda quien desarrolló una severa GvHD después de ser sometido a transplante alogénico de CTHs, y que mejoró considerablemente con el uso de CTMs haploidénticas (Le et al, 2004).

## 5. FUENTES ALTERNATIVAS DE CTMs

La principal fuente de las CTMs es la MO en donde constituyen un bajo porcentaje de todas las células de este órgano que fluctúa entre el 0.001% y hasta el 0.01% de las CMN obtenidas por gradiente de densidad (Pittenger et al, 1999). El número y calidad (potencial de proliferación y capacidad de diferenciación) de las CTMs obtenidas de MO, puede variar incluso cuando son obtenidas en más de una ocasión a partir del mismo donador (Phinney et al, 1999).

Las CTMs también han sido localizadas y obtenidas de otros tejidos y órganos del cuerpo humano tales como tejido adiposo (Gronthos et al, 2001), sangre de cordón umbilical (Erices et al, 2000), vellos coriónicos de la placenta (Igura et al 2004), fluido amniótico (Tsai et al, 2004), vena de cordón umbilical (Panepucci et al, 2004), Gelatina de Wharton (Wang et al, 2004a), sangre periférica de individuos adultos normales (Zvaifler et al, 2000), sangre periférica movilizada de pacientes con cáncer de mama (Fernández et al, 1997), pulmón (in

et Anker et al, 2003), músculo esquelético (Williams et al, 1999), hueso trabecular (Sottile et al, 2002), pulpa dental (Miura et al, 2003) y fuentes fetales como sangre, MO, hígado y bazo (Campagnoli et al, 2001; in et Anker et al, 2003).

A pesar de haber encontrado CTMs en muchos órganos y tejidos, aún es controversial usarlos como fuentes alternativas a la MO, ya que es necesario realizar más investigación sobre su biología y posibles aplicaciones clínicas. En el presente trabajo se utiliza sangre de cordón umbilical (SCU) para la obtención de CTMs como fuente alternativa a la MO, por lo que a continuación se describirán algunas características biológicas de la SCU.

## 6. SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y PRESENCIA DE CTMs

Para poder describir algunos aspectos biológicos de la SCU, primero mencionaremos algunos aspectos de su ontogenia, así como de la formación del cordón umbilical.

Al final de la segunda semana del desarrollo embrionario aparecen las vellosidades coriónicas primarias de la placenta. Al inicio de la tercer semana crece mesénquima hacia las vellosidades primarias y forman un núcleo de tejido conjuntivo laxo mesenquimatoso. En esta etapa las vellosidades (vellosidades secundarias), cubren toda la superficie del saco coriónico. Algunas células mesenquimatosas de las vellosidades, se diferencian poco después en capilares y células hematopoyéticas. Estas vellosidades se constituyen en coriónicas terciarias, cuando se ven vasos sanguíneos en ellas (More y Persaud, 1999).

Los capilares en las vellosidades coriónicas, se funden para formar redes arteriocapilares que se unen al corazón primitivo a través de las arterias y venas que se diferencian del tallo de conexión (primordio del cordón umbilical), quien se forma durante la segunda semana y se origina del mesodermo somático extraembrionario (More y Persaud, 1999).

Hacia finales de la tercera semana, el tallo de conexión se une con la superficie ventral del embrión, y el alantoides se extiende hacia el tallo de conexión, los vasos sanguíneos del alantoides se tornan en arterias y vena umbilicales. A medida que se expande el amnios, envuelve tallo de conexión, tallo vitelino y alantoides, lo que forma así un recubrimiento epitelial para el cordón umbilical. El componente fetal de la placenta está formado por el corion veloso. Las vellosidades tallo que surgen del mismo, se proyectan hacia el espacio veloso que contiene sangre materna. El componente materno de la placenta se forma a partir de la decidua basal (endometrio), que se relaciona con la parte fetal de la placenta (Figura 5; More y Persaud, 1999; Sadler, 1996).

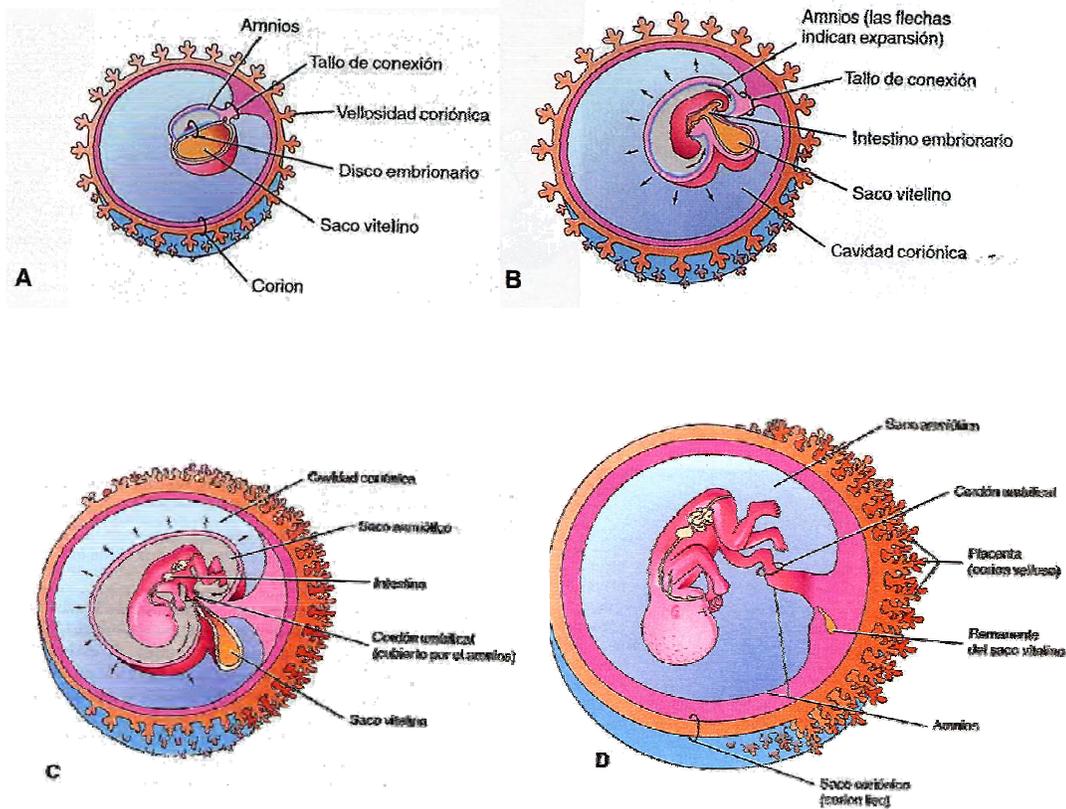


Figura 5. Formación de la placenta y del cordón umbilical. A) Formación de las vellosidades coriónicas primarias y secundarias al formar capilares que cubren el saco coriónico; B) Formación de las vellosidades coriónicas terciarias al formar vasos sanguíneos; C) Formación del primordio del cordón umbilical; D) Cordón umbilical y corion veloso (parte fetal de la placenta). Tomado de More y Persaud 1999.

Al final de la tercera semana comienza la circulación feto-materna a través del cordón umbilical. El  $O_2$ , agua, hormonas, aminoácidos, hierro, vitaminas, anticuerpos, nutrientes incluso drogas y virus de sangre materna, llegan al espacio intervelloso que se encuentra entre la unión de la placenta y el cordón umbilical, y se difunden por las paredes de las vellosidades y a través de la vena umbilical entran a la circulación fetal. El  $CO_2$  y los productos de desecho salen del feto y pasan a través de las arterias umbilicales hacia la placenta, en donde se difunden hacia el espacio intervelloso a través de las paredes de las vellosidades y hacia la sangre materna (More y Persaud, 1999; Sadler 1996) (Figura 6).

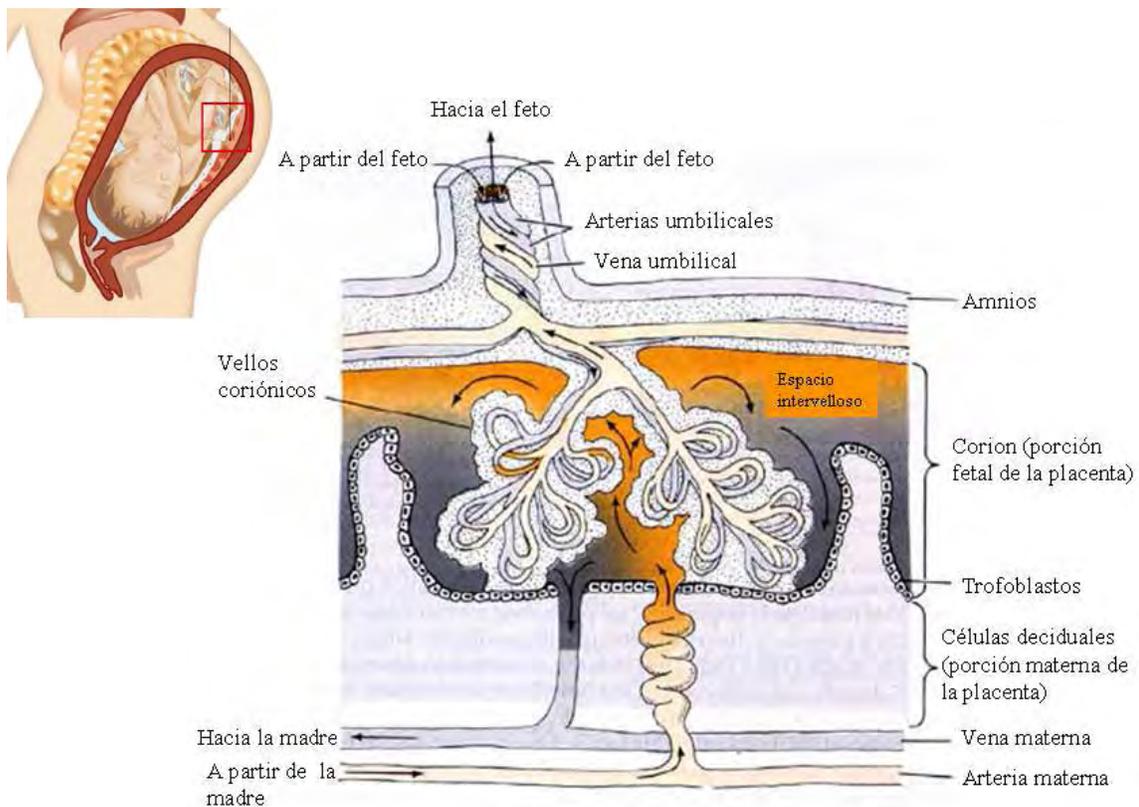


Figura 6. Circulación feto-materna a través de la placenta y cordón umbilical. Tomado de More y Persaud 1999.

En los mamíferos, las células hematopoyéticas se diferencian a partir del mesodermo durante la embriogénesis (Moreno et al, 2005); el primer sitio de la hematopoyesis son las islas sanguíneas del saco vitelino, éstas células hematopoyéticas son precursores eritroides y/o mieloides que no tienen la capacidad de reconstituir la hematopoyesis a largo plazo (Cumano et al, 2001; Palis et al, 2001).

Inmediatamente después que inicia la circulación entre el embrión y el saco vitelino, se originan las CTHs (con la capacidad de reconstitución hematopoyética a largo plazo) en la esplacnopleura intraembrionaria (Cumano et al, 2001) y la región aorta-gónada-mesonefros (AGM; Medvinsky y Dzierzak, 1999). Posteriormente las CTHs comienzan a migrar a otros órganos a través de la circulación, primero al hígado fetal y cuando disminuye la actividad hematopoyética en este órgano, comienza en el bazo fetal y finalmente se establece en la MO, en donde se mantiene la hematopoyesis durante el resto de la vida del individuo (Morrison et al, 1995). Además de la región AGM, las CTHs se originan en las arterias umbilicales y vitelinas (de Bruijn et al, 2000).

La obtención de CTMs provenientes de SCU, fue publicada por primera vez por Erices y cols., quienes encontraron que cultivos de CMN de SCU, dieron origen a células adherentes con morfología fibroblastoide y con la expresión de antígenos relacionados a CTMs provenientes de MO como SH2, SH3, SH4, CD13, CD29 y CD49e (Erices et al, 2000). Otros grupos han publicado que las CTMs de SCU expresan CD44 (receptor hialuronato) y no presentan los antígenos CD90, CD106 y CD146, además de no expresar los marcadores hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14, CD2, CD3, CD15, CD16, CD19, CD24, CD33, CD38 y glicoforina A (Goodwin et al, 2001). Más tarde Lee y cols., publicaron la obtención de CTMs de SCU con la expresión de CD29 ( $\beta$ -integrina), CD49b ( $\alpha$ 2-integrina), CD49d ( $\alpha$ 4-integrina) y CD51 ( $\alpha$ V-integrina) y también de receptores de matriz como CD58 (LFA-3) y CD105, así como la expresión de HLA-ABC, siendo negativa la expresión de CD7, CD90, CD117, CD133, CD135, HLA-DR y de los receptores de matriz CD31, CD62L y CD62p (Lee et al, 2004). Además se han detectado los marcadores CD54 y CD90, aunque la expresión de éste último es controversial, dado que algunos grupos de investigación la consideran negativa (Gang et al,

2004). Otros grupos han encontrado que las CTMs de SCU expresan un inmunofenotipo muy similar al que expresan las provenientes de MO (Bieback et al, 2004; Kern et al, 2006) (Tabla 1).

CD	Expresión	MO	SCU	Ref.
CD 13	Granulocitos, monocitos, endoteliales, epiteliales, fibroblastos osteoclastos, células del cerebro*		++	f
CD 14 (receptor LPS)	Monocitos, macrófagos, células de Langerhans, baja expresión en neutrófilos, células B*	-	-	b,d,f,g,c
CD 29 (VLA $\beta$ chain)	Todos los leucocitos*	++	++	a,b,d,g,h,i
CD 31 (PECAM-1)	Monocitos, plaquetas, granulocitos, células endoteliales*	-	-	a
CD 34	Células troncales hematopoyéticas $\blacklozenge$			a,b,c,d,e,g,h,i
CD 44 (HCAM)	Células hematopoyéticas, epiteliales, endoteliales, células del sistema nervioso	++	++	a,b,c,d,g,h,i
CD 45 (antígeno común leucocitario)	Células hematopoyéticas*	-	-	a,b,c,d,e,f,g,h,j,i
CD 49b (VLA- $\alpha$ 2)	Monocitos, plaquetas, células linfoides T y B, NK*	+		a
CD 54 (ICAM-1)	Células endoteliales*	+		g
CD 58 (LFA-3)	Células hematopoyéticas, epiteliales, endoteliales, fibroblastos*	+		a
CD 62L (L-selectina)	Células hematopoyéticas a diferentes estadios de diferenciación*	-		a
CD 73 (SH3 y SH4)	Linfocitos maduros, células epiteliales y epiteliales*	++	++	b,a,f,h,i
CD 90 (Thy-1)	Progenitores hematopoyéticos, Timocitos, células endoteliales y neuronas $\blacklozenge$	-	++	a,b,
CD 90 (Thy-1)	Timocitos, células endoteliales y neuronas	++	++	a,f,g,h,i
CD 105 (endoglina)	Células endoteliales*	++	++	d,e,
CD 133	Células troncales y progenitoras hematopoyéticas $\blacklozenge$	-	-	b,d
CD 140 (PDGFr)		++		k
CD 166 (ALCAM)	Células epiteliales del timo y células T activadas*	++		g
HLA-ABC	Células nucleadas*	+	+	b,d
HLA-DR	Células profesionales presentadoras de antígeno $\blacklozenge$	-	-	b,d

Tabla 2. Caracterización fenotípica de las CTMs de MO y SCU. Tomado de (\*) Niel et al, 1997 ( $\blacklozenge$ ) Tomado de Flores-Guzman 2006; a, Lee et al, 2004; b, Bieback et al, 2004; c, Tondreau et al, 2005; d, Kern et al, 2006; e, Yu-Jen et al, 2006a; f, Reinisch et al, 2007; g, Nishiyama et al, 2007; h, Marcov et al, 2007; i, Tsai et al, 2007; j, Bobis et al, 2006).

En relación al porcentaje de obtención y frecuencia de las CTMs en SCU, se ha publicado que hasta en un 63% de las unidades procesadas se han obtenido CTMs (Kern et al, 2006), mientras que su frecuencia se ha observado de entre 0 a 2.3 CTMs en  $1 \times 10^8$  CMN de SCU (Bieback et al, 2004; Wang et al, 2004b), a diferencia de MO en donde se ha publicado de 1 a 5 CTMs en  $1 \times 10^5$  CMN (Caplan y Dennis, 2006). Debido a su baja frecuencia y un menor nivel en la expresión de fosfatasa alcalina y en la formación de nódulos de hidroxiapatita, característicos de la diferenciación osteogénica, así como una disminuida expresión de proteínas neurales ( $\beta$ -tubulina III y GFAP) después de haber sido estimuladas con EGF/FGF, en comparación con CTMs de MO, algunos autores sugieren que CTMs de SCU es una población más primitiva que aquellas provenientes de MO (Goodwin et al, 2001).

Se ha observado que las CTMs de SCU tienen una gran capacidad de proliferación (Gang et al, 2004) y un mayor periodo de cultivo que las CTMs de MO con al menos 20 doblajes en 8 pasajes y sin cambio en la morfología ni disminución en la proliferación, mientras que en cultivos de CTMs de MO, se observó disminución en la proliferación y cambio en la morfología después de 5 doblajes durante 3 a 4 pasajes (Bieback et al, 2004; Kern et al, 2006).

Respecto a la capacidad de diferenciación hacia células de distintos linajes, bajo condiciones adecuadas de cultivo, las CTMs de SCU tienen la capacidad de formar adipocitos, osteoblastos (Goodwin et al, 2001), cardiomiocitos (Cheng et al, 2003), condrocitos, hepatocitos y células neurales, por lo que no solo se diferencian a células de origen mesodérmico, sino tienen la capacidad de generar células de las tres capas germinales al igual que las provenientes de MO (Lee, et al., 2004). De manera interesante se ha publicado una capacidad reducida de diferenciación adipogénica (Bieback et al, 2004; Yu-Jen et al, 2006a) e incluso ausencia de dicha capacidad de diferenciación hacia este linaje por parte de las CTMs de SCU (Kern et al, 2006).

Las CTMs de SCU son capaces de producir SCF, IL-6 y TNF- $\alpha$ , además de tener el potencial de soporte, expansión y diferenciación ex vivo de CTHs y CPHs (Wang et al, 2004b; Nagwa et al, 2006) y soportar la sobrevivencia de células neurales NT2N, bajo condiciones de estrés y en estado de baja síntesis de

proteínas (Nagwa et al, 2006). En un estudio publicado por Erices y cols., se demostró que las CTMs de SCU de humano fueron capaces de injertar en la MO de ratones, después de ser transplantadas por infusión sistémica y fueron detectadas en otros órganos como músculo cardíaco, dientes y bazo, demostrando la capacidad de homing y sobrevivencia después del trasplante (Erices et al, 2003).

En otro estudio, además de promover el injerto de células CD34<sup>+</sup>, las CTMs influyeron en la reconstitución de la hematopoyesis y en la diferenciación de las células CD34<sup>+</sup> hacia linfocitos B, granulocitos y megacariocitos in vivo, al ser co-transplantadas en ratones NOD/SCID (Zhou et al, 2005).

A pesar de los datos reportados, aún se considera controversial la presencia de CTMs en SCU ya que no en todos los grupos de investigación ha sido posible su obtención (Mareschi et al, 2001; Wexler et al, 2003; Yu et al, 2004).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe un gran número de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso, óseo, cardiovascular y hematopoyético entre otros, las cuales se originan por daños celulares en cada sistema. En la mayoría de estas enfermedades no se cuenta con un tratamiento exitoso para su curación, por lo que es necesario buscar tratamientos alternativos que permitan mejorar el estado celular de los tejidos dañados.

A través de diferentes investigaciones se ha demostrado que las CTMs tienen la capacidad de diferenciarse hacia células de las distintas capas embrionarias, originando así células como adipocitos, osteocitos, condrocitos, cardiomiocitos, miocitos, hepatocitos y células neurales. Además, se ha demostrado en modelos animales e incluso en humanos que las CTMs tienen la capacidad de homing hacia tejidos dañados y de regenerarlos después de su inyección sistémica.

Por lo anterior, se puede considerar que las CTMs podrían representar una excelente opción de terapia celular. Actualmente la MO es la principal fuente de CTMs, sin embargo, presenta algunos inconvenientes dado que en sí, la toma de muestras de MO representa un método doloroso y agresivo para el donador e incluso conseguir donadores histocompatibles para los pacientes, resulta una tarea difícil de llevar a cabo y en algunos casos no se tiene éxito. Aunado a ello, se ha demostrado que el número y la capacidad de proliferación y diferenciación de las CTMs, disminuye conforme aumenta la edad del donador (D'ippolitto et al, 1999; Romanov et al, 2003). Debido a ello se hace necesaria la obtención de las CTMs de fuentes alternativas a la MO.

Se ha reportado la obtención de las CTMs de distintas fuentes, entre las cuales la SCU puede ser una interesante opción ya que tiene algunas ventajas sobre MO, debido a que se considera prácticamente un desecho biológico y además se pueden obtener las unidades que se deseen, las cuales pueden ser criopreservadas para utilizarlas en el momento que se requiera.

No obstante de representar una buena opción, en muchos grupos de investigación no ha sido posible la obtención de CTMs a partir de la SCU, además muchas de sus características biológicas no se han determinado y por lo tanto es incierta su posible aplicación clínica.

Debido a lo anterior en este trabajo se pretende obtener CTMs de SCU como fuente alternativa a la MO, determinar algunas de sus características biológicas y realizar un estudio comparativo con aquellas provenientes de MO.

#### **IV. HIPÓTESIS**

A pesar que se considera controversial la presencia de CTMs en SCU, algunos grupos de investigación han publicado su obtención, aunque muchas de sus características biológicas no se han determinado. Debido a lo anterior se propone la posible obtención de CTMs a partir de SCU con características similares a las reportadas para aquellas provenientes de MO respecto a su morfología, inmunofenotipo y potencial de diferenciación hacia los linajes adipogénico, osteogénico, condrogénico y neural, lo cual propondría a la SCU como una fuente alternativa a la MO para la obtención de CTMs y su posible uso en aplicación clínica.

## **V. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

Obtener células troncales mesenquimales de sangre de cordón umbilical como fuente alternativa a la médula ósea, determinar su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación, y realizar un estudio comparativo con aquellas provenientes de médula ósea.

### **2. Objetivos particulares**

- Obtención de células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea y sangre de cordón umbilical
- Determinar el porcentaje de obtención y la frecuencia de células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea y sangre de cordón umbilical
- Evaluar la morfología de las células troncales mesenquimales obtenidas de médula ósea y sangre de cordón umbilical
- Evaluar el inmunofenotipo de las células troncales mesenquimales obtenidas de médula ósea y sangre de cordón umbilical
- Determinar la capacidad de diferenciación de las células troncales mesenquimales obtenidas de médula ósea y sangre de cordón umbilical hacia osteoblastos, adipocitos, condroblastos y células neurales

## VI. MÉTODO

### 1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE MO Y SCU

Las muestras de MO de sujetos sanos fueron obtenidas de donadores para trasplantes alogénicos, a través de un aspirado de MO en la cresta ilíaca postero – superior con previa anestesia local, en el Hospital de Especialidades del CMN SXXI, IMSS.

Las muestras de SCU fueron obtenidas de partos a término ó cesáreas. Una vez liberada la placenta con el cordón umbilical, la sangre se colectó en una bolsa de colección con anticoagulante, pinchando la vena umbilical con una aguja, todas las muestras se obtuvieron del Hospital Regional de Zona 2A, Troncoso del IMSS, bajo los estándares éticos de los hospitales correspondientes.

### 2. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CTMs

Tanto los aspirados de MO como la SCU colectadas se procesaron en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. Las CTMs provenientes de MO y de SCU se obtuvieron mediante selección negativa, para la cual se utilizó un kit comercial (Rosette Sep<sup>TM</sup> System; Stem Cell Technologies Inc. [STI], Vancouver, BC, Canada) basado en la eliminación de células hematopoyéticas, el cual ha sido reportado como superior a métodos como usar únicamente Ficoll para la obtención de CTMs de MO (Flores-Figueroa et al, 2005).

Para obtener CTMs de MO, se adicionó 50 µl del coctel de enriquecimiento para células mesenquimales (Rosette Sep) que incluye anticuerpos monoclonales contra los siguientes antígenos: CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b y Glicoforina A, por 1 ml de aspirado de MO. Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se diluyó con PBS al 2% de SFB (STI) y EDTA 1nM, sometiendo después a una separación con ficoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) durante 25 min a 300 gravedades. El anillo obtenido se lavó con PBS al 2% SFB y se centrifugó durante 7 min a

1200rpm. El número de células nucleadas y la viabilidad celular se determinó con un hemocitómetro usando solución de Turck y azul de tripano (Gibco BRL, New York, USA) respectivamente. Las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (lg-Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco BRL, Rockville, MD) suplementado con 10% de SFB, 10µl/ml de penicilina-estreptomicina, 10µl/ml de gentamicina y 10µl/ml de L-glutamina, y se sembraron a una densidad de  $0.2 \times 10^6$  cél/cm<sup>2</sup> en una caja para cultivo T25 (Corning, Inc. Costar, New York, USA). Cuatro días después se eliminaron las células no adherentes y se adicionó medio fresco. Cada 5 días se realizaron cambios de medio. Una vez que se llegó al 100% de confluencia, la capa celular se colectó adicionando tripsina (0.05% Trypsin-0.53 mM EDTA; Gibco BRL, New York, USA) e incubando durante 5 min a 37°C. Las células obtenidas se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 7 min a 1200rpm y se sembraron a una densidad de  $0.1 \times 10^6$  células en una caja de cultivo T75 (Corning, Inc. Costar, New York, USA) en las mismas condiciones, repitiendo este procedimiento una vez que el cultivo volvió a llegar al 100% de confluencia. La población de células obtenida de esta última resiembra (2ª resiembra) fue utilizada en los distintos experimentos.

Para la obtención de CTMs de SCU, se realizó el mismo procedimiento que en MO, sin embargo, previo a la incubación con el coctel de enriquecimiento para células mesenquimales, la unidad de SCU se sometió a una separación en gradiente de ficoll. Posteriormente, el anillo de CMN se resuspendió en PBS y se centrifugó durante 7 min a 1200rpm. Las células obtenidas fueron mezcladas con eritrocitos en una relación 1:50 en una densidad de  $1 \times 10^6$  CMN/ml e incubadas durante 20 min con un anticuerpo que reconoce a estos últimos. Se adicionó inmediatamente después el cóctel de anticuerpos y se continuó con el proceso de la muestra como se mencionó para el aspirado de MO.

### 3. MORFOLOGÍA DE LAS CTMs

Para determinar la morfología de las CTMs, se sembraron  $6 \times 10^4$  células en una caja petri de 100 mm (Cell Culture Dish, Corning) y cuando las

células llegaron a una confluencia del 70% se desechó el medio, se adicionó PBS por 10 min y se tiñó con Azul de Toluidina durante 40 min. La caja se lavó con agua destilada y se dejó secar. Posteriormente se observó bajo el microscopio y se contaron los diferentes tipos celulares de acuerdo a su morfología, en 20 campos al azar por caja.

#### 4. INMUNOFENOTIPO DE LAS CTMs

Para determinar el inmunofenotipo de las CTMs obtenidas, se analizó la expresión de algunos antígenos de superficie mediante citometría de flujo en un equipo Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA). Se incubaron  $2 \times 10^5$  células en 50 $\mu$ l de PBS al 2% de SFB durante 30 minutos en hielo y en oscuridad con uno de los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD13-PE, anti-CD14-PE, anti-CD29-FITC, anti-CD31-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD44-PE, anti-CD45-FITC, anti-CD54-PE, anti-CD62-L-FITC anti-CD105-PE, anti-HLA-DR-PE, anti-CD117 (todos de Caltag Laboratories, Burlingame, CA); anti-CD49b-PE, anti-CD58-PE, anti-CD73-PE, anti-CD166-PE, anti-HLA-ABC-FITC, anti-CD10-FITC, anti-CD140 (todos de Beckton Dickinson/PharMingen, San Jose, CA, USA), anti-CD90-FITC (Immunotech, Marseille, France) y anti-CD133 (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Se incluyeron los controles incubando a las células con el correspondiente isotipo de acuerdo al anticuerpo primario IgG2a-PE (Caltag Laboratories), IgG1-FITC (Caltag Laboratories). Las células marcadas se analizaron contando un mínimo de 10,000 eventos en el citómetro.

#### 5. CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN

##### 5.1 INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA

$1 \times 10^4$  CTMs se cultivaron en cámaras Lab-Tek II (Chamber Slide System, Nalge Nunc Inter, USA) con medio DMEM bajo en glucosa (DMEMbg) suplementado con 10% de SFB o en presencia de medio de diferenciación osteogénica (Stem Cell Kit™, STI) durante 4 semanas y se realizaron cambios de medio cada 3 días. El medio osteogénico consiste de medio DMEMbg

suplementado con dexametasona  $10^{-8}$  M, ácido ascórbico 0.2 mM,  $\beta$ -glycerol fosfato 10 mM y 15% de suplemento osteogénico. La detección de la diferenciación se realizó mediante la técnica de Von Kossa (Kern et al, 2006). Al terminar las 4 semanas de cultivo con el medio de diferenciación osteogénica, éste se retiró de la caja y se adicionó PBS durante 10 min. Se desechó el PBS y se colocó nitrato de plata dejando reposar durante 3 horas expuesta a la luz. La capa celular se lavó con agua destilada y se adicionó hiposulfito de sodio al 5% durante 2 min. Se lavó con agua destilada y se contrastó con azul de toluidina al 1% por 2 min. Se deshidrató con diferentes concentraciones de etanol (al 80%, 90% y absoluto) y xilol grado histológico y se montaron las laminillas con resina. Los depósitos de calcio se tiñeron de color café a negro. Se determinó el porcentaje de positividad después de analizar la cámara de cultivo al observarla bajo el microscopio.

## 5.2 INDUCCIÓN ADIPOGÉNICA

$1 \times 10^4$  CTMs se cultivaron en cámaras Lab-Tek II (Chamber Slide System, Nalge Nunc Inter USA) con medio DMEMbg suplementado con 10% de SFB o en presencia de medio de diferenciación adipogénica (AM, STI) durante 4 semanas y se realizaron cambios de medio cada 3 días. El medio adipogénico consiste de DMEMbg al 10% de suplemento adipogénico. La detección de la diferenciación adipogénica se realizó con la tinción de Rojo Oleoso (Sigma –Aldrich) (Kern et al, 2006). Al terminar las 4 semanas de cultivo con el medio de diferenciación adipogénico, éste se desechó de la caja y se adicionó PBS durante 10 min. Se desechó el PBS y la capa celular se fijó con formalina buffer al 10% durante 1 hora. Se adicionó isopropanol al 60% durante 5 min, y posteriormente se adicionó Rojo Oleoso durante 20 min. Se lavó con agua destilada y se contrastó con hematoxilina de Harris por 1 min. Las laminillas se montaron con propilenglicol. Los lípidos se tiñeron de color rojo. Se determinó el porcentaje de positividad después de analizar la cámara de cultivo al observarla bajo el microscopio.

### 5.3 INDUCCIÓN CONDROGÉNICA

$2.5 \times 10^5$  CTMs en 500  $\mu$ l de medio de diferenciación condrogénico (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, Maryland, USA) y en presencia de 10ng/ml de TGF- $\beta$  (Cambrex), se colocaron en un tubo de 15 ml de polipropileno. Las células se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm, para formar una micromasa al fondo del tubo. Se cultivaron por 4 semanas y se realizaron cambios de medio cada 4 días. El medio condrogénico consiste de medio basal de diferenciación condrogénica suplementado con dexametasona, piruvato de sodio, prolina, suplemento ITS<sup>+</sup>, ascorbato, penicilina/streptavidina y L-glutamina. Al terminar las 4 semanas de cultivo con medio de diferenciación condrogénica, se desechó el medio, se fijó la micromasa con formaldehído y se deshidrató en diluciones de etanol (al 80%, 90% y absoluto) y xilol grado histológico durante 30 min con dos repeticiones cada una. La micromasa se embebió en parafina y se hicieron cortes histológicos con ayuda de un microtomo. La detección de la diferenciación condrogénica se realizó con las tinciones de Azul Alciano para observar la positividad a mucopolisacaridos y con Tricrómico de Masson para determinar la presencia de colágeno. Se determinó el porcentaje de producción de cartílago hialino y fibroso después de analizar los cortes histológicos al observarlos bajo el microscopio.

### 6. INDUCCIÓN NEURAL Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS NEURALES

$1 \times 10^4$  CTMs se cultivaron en cámaras Lab-Tek II (Chamber Slide System, Nalge Nunc Inter, USA) y en medio DMEMbg suplementado con 10% de SFB o en presencia de medio de diferenciación neural Neurocult (NS-A basal medium with NS-A differentiation supplements; STI; StemCells Technologies) durante 10 días, con dos cambios de medio, retirando la mitad del medio por cada cambio. Posteriormente las células fueron fijadas con acetona y lavadas en PBS con 1% de Triton X-100. Las cámaras se incubaron con PBS-Triton suplementado con 10% de suero de caballo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se incubaron toda la noche con uno de los siguientes anticuerpos mono- o policlonales (Mo Abs ó Po Abs,

respectivamente): anti-Nestina, anti-NF-200, anti-Map2, anti-NeuN (todas Mo Ab, Chemicon, Int. CA, USA) y anti-GFAP (Po Abs, DAKO, Carpinteria, CA). Se lavaron las cámaras con PBS-Triton y se incubaron por dos horas con uno de los siguientes anticuerpos secundarios: cabra anti-conejo IgG-FITC (Chemicon) y cabra anti-ratón IgG-Alexa 450 (Molecular Probes). Para teñir los núcleos se utilizó yoduro de propidio. Las cámaras se montaron con medio para montar Vectashield (H-1000; Vector Laboratory, Burlingame, CA). Los análisis se realizaron usando un microscopio Axiovert 100 M y un sistema de análisis confocal LSM 510 Zeiss. Los fluoróforos fueron excitados con láser de ion argón de 488 nm y láser de ion HeNe de 543 nm. La emisión de fluorescencia fue monitoreada con el paso a bandas de 505-530 nm ó el paso a filtros de 650 nm de longitud.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron en el programa computacional SPSS (versión 9.0.0, SPSS Inc., 1989-1999). Se emplearon pruebas de T y análisis de varianza multivariada para determinar diferencias significativas entre los datos. La significancia estadística se determinó cuando los valores de P fueron inferiores a 0.05.

## VII. RESULTADOS

### 1. Obtención de CTMs provenientes de MO y SCU

En el presente estudio se pudieron obtener CTMs a partir de aspirados de MO, y a pesar que se considera controversial la presencia de CTMs en SCU, ya que algunos grupos de investigación no han podido obtenerlas, en este estudio fue posible su obtención a partir de esta fuente.

### 2. Porcentaje de Obtención y Frecuencia de las CTMs en MO y SCU

Se procesaron 9 muestras de aspirados de MO y 104 muestras de SCU de partos a término y cesáreas, de las cuales, se obtuvieron CTMs en 9 y 11 casos respectivamente, resultando así en un 100% de obtención en muestras de MO y un 10.5% en las correspondientes a SCU. La frecuencia de las CTMs en MO fue de 1 CTM en  $0.031 \times 10^6$  CMN y en SCU de 1 CTM en  $200.5 \times 10^6$  CMN (Tabla 1). Estos resultados nos indican que las CTMs se encuentran y se obtienen de manera más frecuente en MO que en SCU.

Tipo de muestra	No. de muestras procesadas	No. de muestras positivas	% de Obtención	No. de CMN X $10^6$	Frecuencia de CTMs / CMN
MO	9	9	<b>100</b>	22.7 – 200 <sup>a</sup>	<b>1/ <math>0.03 \times 10^6</math></b> <sup>b</sup>
SCU	104	11	<b>10.5</b>	17.8 - 664.4 <sup>a</sup>	<b>1/ <math>200.5 \times 10^6</math></b> <sup>b</sup>

Tabla 1. Porcentaje de obtención y frecuencia de CTMs en muestras de MO y SCU. (a) Rango de CMN obtenido de las muestras positivas para CTMs, (b) Promedio de los valores obtenidos de CMN de las muestras positivas para CTMs

### 3. Morfología de CTMs de MO y SCU

Cultivos de CTMs de MO y SCU fueron teñidos con Azul de Toluidina al llegar a una confluencia del 70% para analizar la morfología celular (Figura 1A).

Dentro de los cultivos de CTMs de MO se pudieron identificar cuatro tipos celulares morfológicamente distintos (Figura 1B), a los cuales los nombramos como sigue de acuerdo a su tamaño y características: *grande*, células con el citoplasma muy extendido; *fibroblastoide*, células alargadas; *neural*, células con extensiones citoplasmáticas parecidas a dendritas y *pequeña*, células con el citoplasma muy reducido.

Las células *grandes* correspondieron al 8.3% de las células de MO. El tipo celular más común fue con morfología *fibroblastoide*, el cual correspondió a un 69.9% de todas las células presentes en el cultivo. Dentro de la población fibroblastoide, se identificaron cinco tipos celulares morfológicamente distintos y sin diferencias significativas en los porcentajes obtenidos entre ellos: romboide, célula con el citoplasma extendido en forma de rombo; lamelopodia-lamelopodia, célula alargada con los dos extremos anchos; lamelopodia-filopodia, célula alargada con un extremo ancho y un extremo en punta; filopodia-filopodia, célula alargada con dos extremos en punta; y triangular, célula con el citoplasma extendido en forma de triángulo (Figura 1C). Las células con morfología *neural* conformaron el 6.2% de las CTMs de MO. Y las células *pequeñas* correspondieron al 15.5% de las células presentes en el cultivo. Se encontraron diferencias significativas entre las células que presentan morfología *fibroblastoide* con células de morfología *neural*, *pequeña* y *grande* y sin diferencias significativas entre las tres últimas.

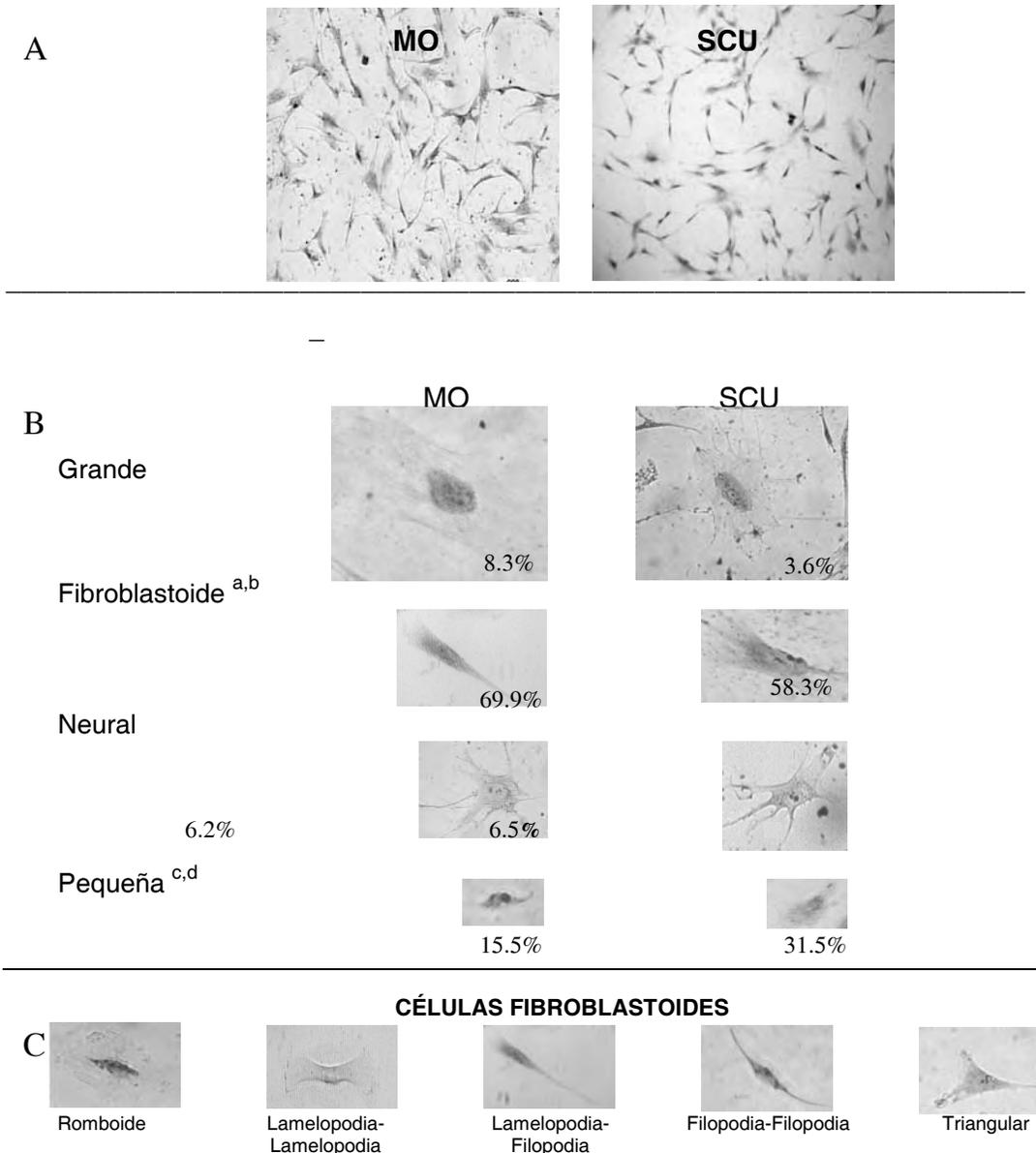


Figura 1. Morfología de CTMs de MO y SCU. Se observaron diferentes tipos morfológicos en los cultivos celulares a partir de ambas fuentes. Cada tipo celular fue nombrado dependiendo de las características morfológicas observadas, los resultados se presentan en porcentajes de cada tipo celular y corresponde a la media de los valores a partir de experimentos separados (MO n=9; SCU n=11). (A) Cultivo de CTMs de MO y SCU teñidos con Azul de Toluidina, 10X. (B) Tipos celulares morfológicamente distintos; grande ( $93\pm 21\mu$  de longitud); fibroblastoide ( $45\pm 25\mu$  de longitud); Neural ( $73\pm 5.2\mu$  de longitud) y células pequeñas ( $12\pm 2.7\mu$  de longitud), 20X. (C) Tipos celulares morfológicamente distintos, encontrados dentro de la morfología fibroblastoide, 20X. (a) Significativamente mayor a todos los demás tipos celulares dentro de los cultivos de MO. (b) Significativamente mayor a todos los demás tipos celulares dentro de los cultivos de SCU. (c) Significativamente mayor a células con morfología neural y grande dentro de los cultivos de SCU. (d) Significativamente mayor que las células pequeñas dentro de los cultivos de MO; ( $p < 0.05$ ).

Respecto a la morfología de las CTMs provenientes de SCU, también se encontraron los mismos 4 tipos morfológicos celulares (Figura 1B).

Las células *grandes* conformaron el 3.6% de las células del cultivo. Y de manera similar que en MO, dentro de la morfología *fibroblastoide* que fue la más frecuente, con el 58.3%, se observaron los cinco tipos celulares morfológicamente distintos y sin diferencias significativas en los porcentajes obtenidos entre ellos (Figura 1C). El tipo celular con morfología *neural* correspondió a un 6.5% de las CTMs de SCU. Las células *pequeñas* correspondieron al 31.5% de las células presentes en el cultivo. Las células *pequeñas* fueron significativamente menores que las células con morfología *fibroblastoide* y significativamente mayores que las células con morfología *neural* y *grande*, sin encontrar diferencias significativas entre las dos últimas (Figura 1B). Entre los tipos morfológicos de CTMs de MO y de SCU, se encontraron diferencias significativas entre las células pequeñas, siendo significativamente mayor en cultivos de CTMs de SCU que en cultivos de CTMs de MO (Figura 1B).

Estos resultados nos indican que dentro de los cultivos de CTMs de MO se encuentran subpoblaciones celulares con diferente morfología, y que en cultivos de CTMs de SCU, se presentan las mismas subpoblaciones celulares. Además, de manera interesante, se observó un mayor porcentaje de células con morfología pequeña en cultivos de SCU respecto a aquellos provenientes de MO.

#### 4. Inmunofenotipo de CTMs de MO y SCU

Para conocer el inmunofenotipo de las CTMs obtenidas a partir de MO y SCU se analizó la expresión de diferentes marcadores de superficie a través de citometría de flujo (Figura 2; Tabla 2). Las células de ambas fuentes fueron negativas para la expresión de marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34 y CD45 así como para CD62L y HLA-DR. Otros marcadores como CD133 y CD10 fueron encontrados en baja expresión. Asimismo, células de ambas fuentes presentaron una expresión media para algunas moléculas de adhesión como CD29, CD49b y CD58, también presentaron una expresión alta para CD44, CD166 y otras moléculas de superficie celular tales como CD13, CD73 y CD105, así como la expresión de HLA-ABC.

La expresión de algunos marcadores se encontraron significativamente diferentes entre las CTMs de ambas fuentes, tales como CD54 expresado en un  $23\pm 11\%$  de las células provenientes de MO y un  $69\pm 27\%$  de SCU. De manera similar ocurrió con la expresión de CD140 en un  $97\pm 11\%$  y un  $70\pm 19\%$  de las CTMs de MO y SCU, respectivamente.

Respecto a CD117, observamos heterogeneidad en su expresión entre las muestras de SCU, así, en algunas muestras se observaron valores del 48%, mientras que en muestras de MO el valor más alto fue del 19%. Por su parte, se observó una alta expresión de CD90 en CTMs de MO siendo del  $85\pm 15\%$  comparado con SCU en donde fue del  $61\pm 30\%$ , observando además, la expresión de este marcador de manera muy variable entre las muestras de SCU.

Estos resultados nos indican que las CTMs de SCU presentan un patrón similar a las CTMs de MO en la expresión de antígenos de superficie, sin embargo, la expresión diferencial entre algunos marcadores podría indicarnos algunas diferencias entre células de ambas fuentes.

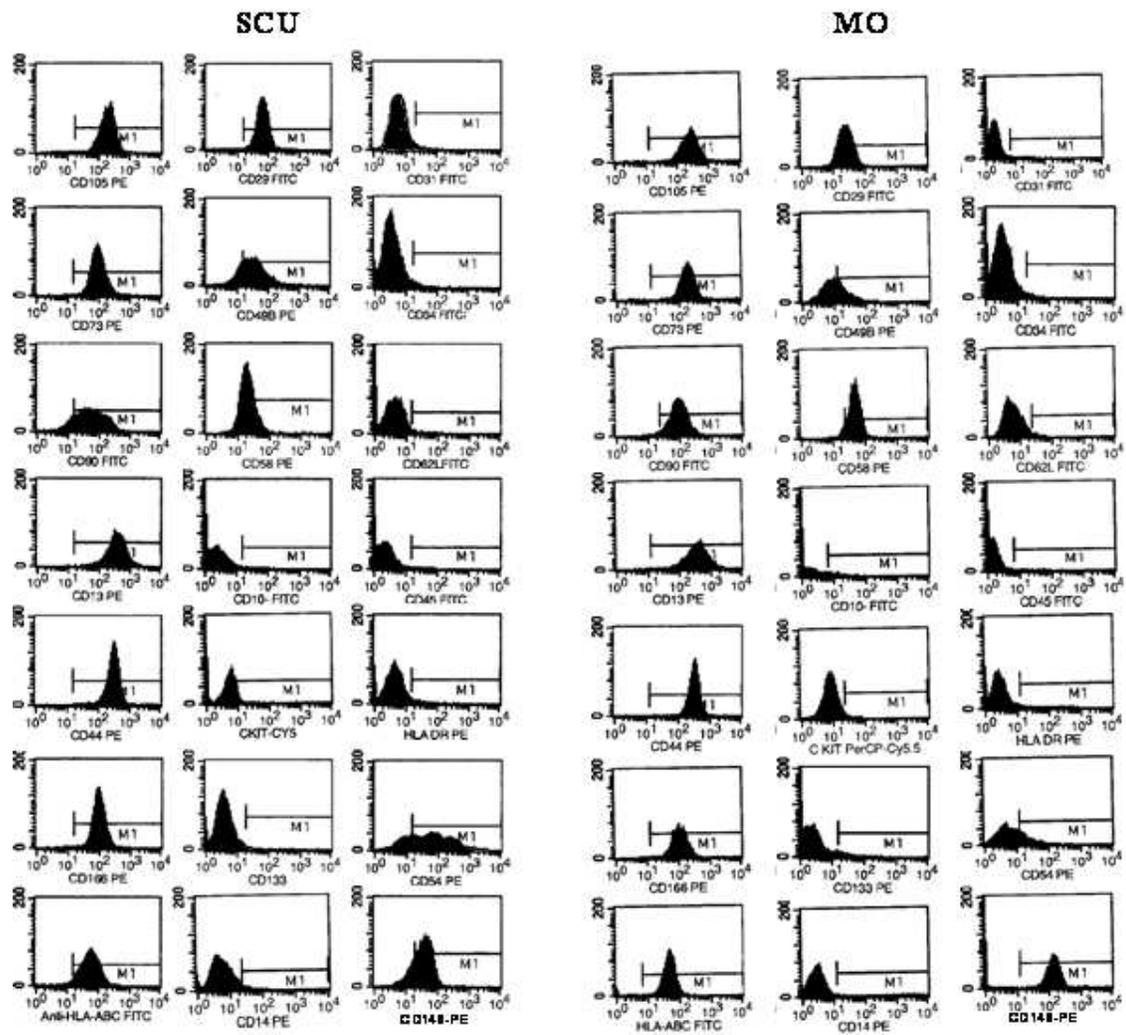


Figura 2. Citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie de las CTMs de MO y SCU.

Marcador	MO	SCU
CD105	90±13	92±10
CD73	97±3	93±8
CD90 <sup>a</sup>	85±15	61±30
CD13	98±1	98±5
CD44	90±13	92±11
CD166	92±12	94±7
HLA-ABC	94±9	78±28
CD29	46±32	67±32
CD49b	58±14	49±32
CD58	75±32	76±12
CD10	32±53	7±8
CD117 <sup>a</sup>	8±11	29±19
CD133	2±1	2±0
CD14	2±2	1±0
CD31	1±1	1±1
CD34	0	1±2
CD62L	0	1±2
CD45	1±1	1±1
HLA-DR	3±3	1±1
CD54 <sup>b</sup>	23±11	69±27
CD140 <sup>b</sup>	97±11	70±19

Tabla 2. Expresión de marcadores de superficie de las CTMs de MO y SCU determinado por citometría de flujo. Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para los diferentes marcadores y corresponde a la media de los valores a partir de experimentos separados (MO n=9; SCU n=11). (a) No hay diferencias significativas, sin embargo, su expresión fue distinta entre las muestras de SCU; (b) Significativamente diferentes, P<0.05.

## **5. Capacidad de Diferenciación de CTMs de MO y SCU**

La capacidad de diferenciación de las CTMs de MO (n=5) y SCU (n=11), fue analizada después de haberlas cultivado bajo condiciones particulares que favorecían la diferenciación osteogénica, adipogénica, condrogénica y neural, así como, con sus respectivos controles cultivándolas en ausencia de medio de inductor.

### **5.1 Capacidad de Diferenciación Osteogénica**

Se determinó la capacidad de diferenciación osteogénica de las CTMs de MO y SCU, después de haber inducido los cultivos celulares con medio de diferenciación durante 4 semanas. En todas las muestras de MO se observaron depósitos de calcio (mineralización), los cuales fueron comprobados por la positividad a la tinción con Von Kossa en un 56% de la capa celular al ser observadas bajo el microscopio, interesantemente, las células que fueron cultivadas en ausencia de medio inductor también presentaron positividad a la tinción con von Kossa en un 36% (Figura 3).

Respecto a los cultivos de SCU, también se observaron depósitos de calcio y positividad a la tinción con von Kossa, en un 65% de la capa celular cultivada en presencia de medio inductor, y al igual que en MO, las células que fueron cultivadas en ausencia de medio inductor, fueron positivas a la tinción con von Kossa en un 40% (Figura 3).

Estos resultados nos indican que las CTMs de SCU tienen la capacidad de diferenciarse hacia el linaje osteogénico al igual que las CTMs de MO, tanto en ausencia como en presencia de medio inductor.

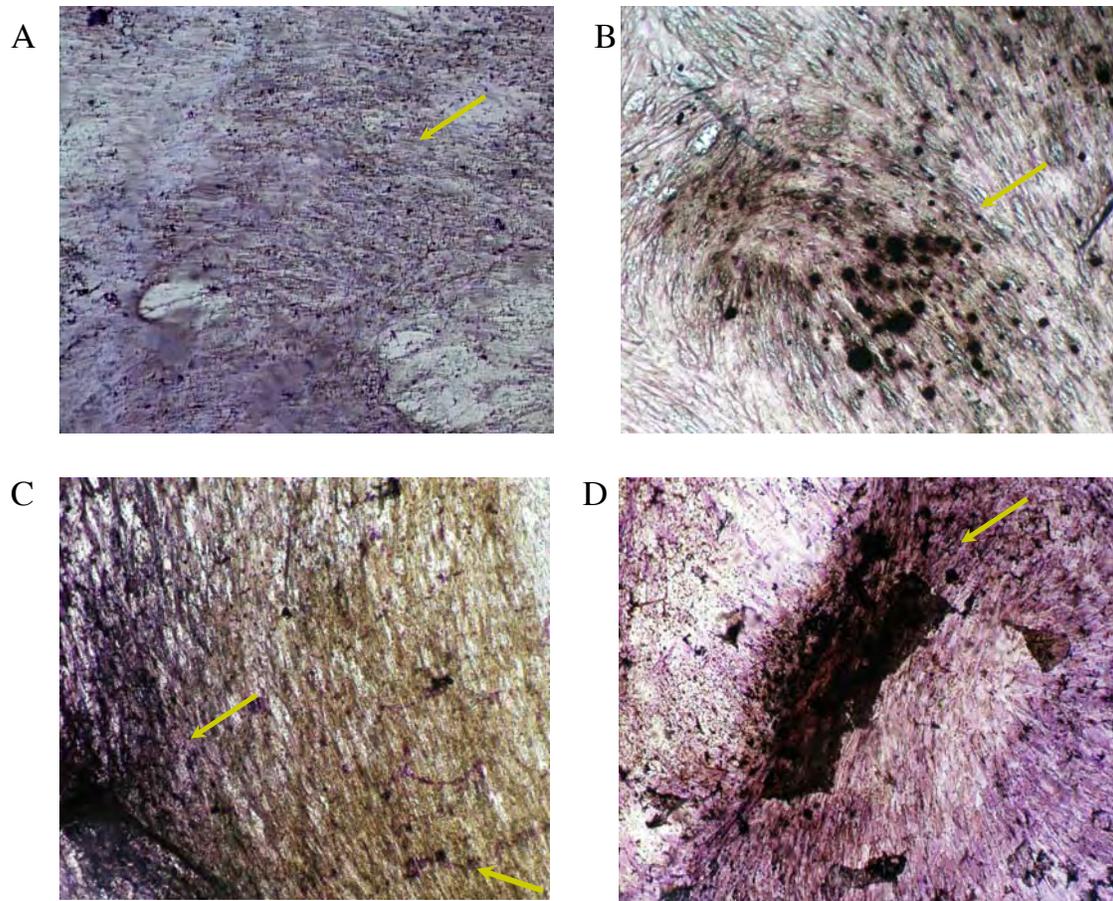


Figura 3. Diferenciación osteogénica de CTMs de MO y SCU. La diferenciación osteogénica está indicada por la presencia de depósitos de calcio positivos a la tinción con von Kossa, la positividad se observa de color café y negro. (A) Diferenciación hacia osteoblastos de CTMs de MO sin inducción osteogénica (20X). (B) Diferenciación hacia osteoblastos de CTMs de SCU sin inducción osteogénica (20X). (C) Diferenciación hacia osteoblastos de CTMs de MO con inducción osteogénica (20X). (D) Diferenciación hacia osteoblastos de CTMs de SCU con inducción osteogénica (20X).

## 5.2 Capacidad de Diferenciación Adipogénica

Se determinó la capacidad de diferenciación adipogénica de las CTMs de MO y SCU, después de haber inducido los cultivos celulares con medio de diferenciación durante 4 semanas. En los cultivos de CTMs de MO se encontró la formación de adipocitos con vacuolas lipídicas al ser observadas bajo el microscopio, en un 25% de las células que fueron cultivadas con el medio de inducción, las cuales fueron positivas para la tinción con Rojo Oleoso. Las CTMs de MO cultivadas en ausencia de medio inductor, no presentaron la formación de células con vacuolas lipídicas ni positividad a la tinción con Rojo Oleoso (Figura 4).

Respecto a los cultivos de CTMs de SCU en presencia de medio inductor, no se observó la formación de células con las mismas características a las de MO, sin embargo, se pudo apreciar la formación de acumulaciones celulares positivas a la tinción con Rojo Oleoso, a excepción de una muestra en donde se formó un número reducido de adipocitos (aproximadamente 1% de las células en cultivo). En los cultivos de CTMs de SCU en ausencia de medio inductor, también se observó la formación de acumulaciones celulares positivas a la tinción con Rojo Oleoso (Figura 4).

Estos resultados nos indican que las CTMs de MO tienen la capacidad de formar adipocitos después de haber sido estimuladas con medio de diferenciación adipogénica, mientras que CTMs de SCU no tuvieron la capacidad de formar células con morfología adipocítica, aunque los cultivos hayan sido positivos para la tinción con Rojo Oleoso.

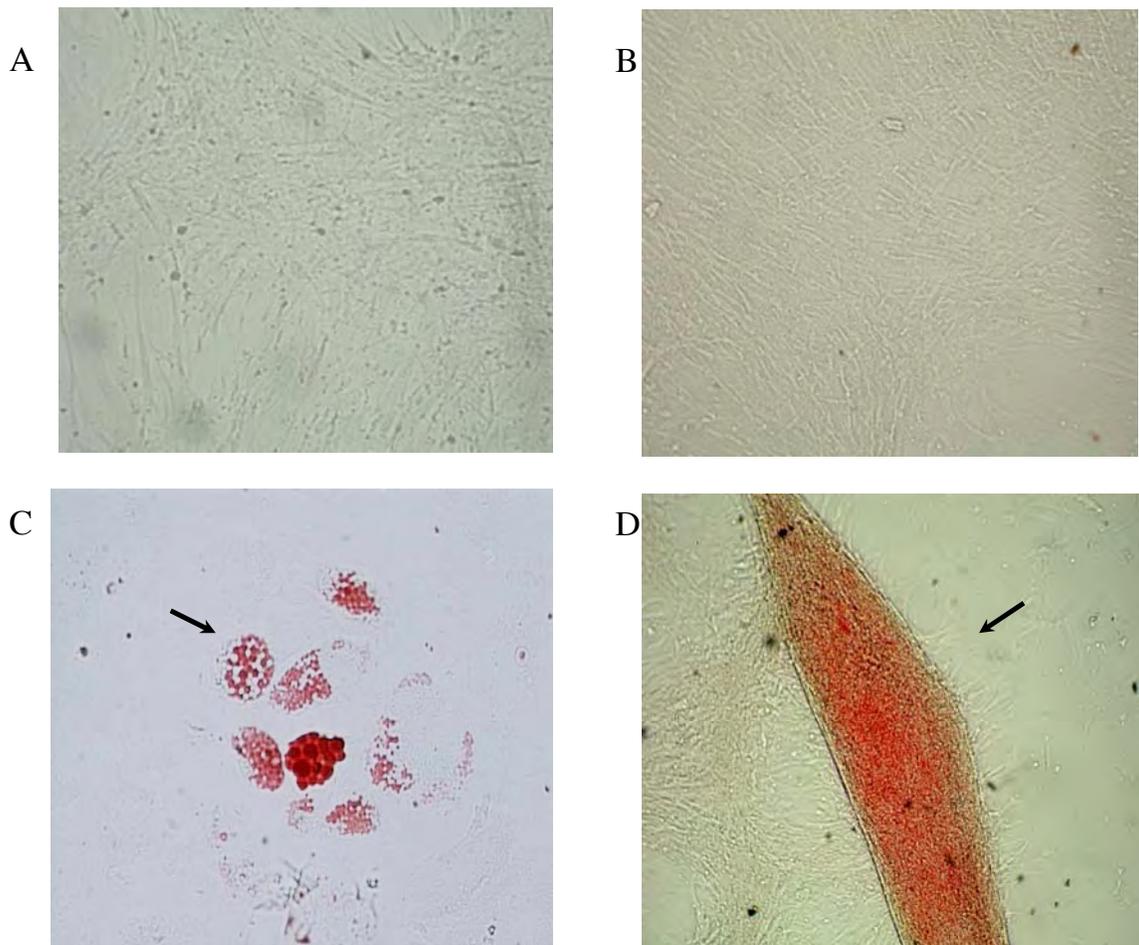


Figura 4. Diferenciación adipogénica de CTMs de MO y SCU. La diferenciación adipogénica es indicada por la positividad a la tinción con Rojo Oleoso. (A) Cultivo celular de MO sin inducción adipogénica, negativo a la tinción con Rojo Oleoso (20X). (B) Cultivo celular de SCU sin inducción adipogénica, negativo a la tinción con Rojo Oleoso (20X). (C) Formación de adipocitos con vacuolas lipídicas en cultivos de MO con inducción adipogénica positivos a la tinción con Rojo Oleoso(20X). (D) Formación de montículos celulares en cultivos de SCU positivos a la Tinción con Rojo Oleoso (20X).

### 5.3 Capacidad de Diferenciación Condrogénica

Se determinó la capacidad de diferenciación condrogénica de las CTMs de MO y SCU, después de haberlas inducido con medio de diferenciación durante 4 semanas en un sistema de micromasa. Las CTMs de MO se diferenciaron hacia condrocitos, produciendo mucopolisacaridos (proteoglicanos sulfatados) que se pudieron identificar con la tinción de Azul Alciano (Figura 5A). Al observar bajo el microscopio los cortes de las micromasas formadas por las CTMs de MO, también se pudo identificar la diferenciación hacia cartílago hialino en un 90%, el cual se caracterizó por crecer en pequeños grupos localizados en una misma área y rodeados por una matriz extracelular, mostrando una coloración grisácea con la tinción de Tricrómico de Masón. También se pudo observar la diferenciación hacia cartílago fibroso en un 10%, el cual se caracterizó por la formación de fibras de colágeno, que mostraron una coloración azul con la tinción con Tricrómico de Mason (Figura 5B). Al cultivar las CTMs de MO en ausencia de medio inductor, no pudieron crecer en sistema de micromasa, siendo incapaces de diferenciarse hacia el linaje condrogénico.

Respecto a CTMs de SCU, al igual que en MO, se diferenciaron hacia condrocitos, produciendo mucopolisacaridos identificados con la tinción de Azul Alciano (Figura 5C; sin embargo, la formación de cartílago hialino fue significativamente menor que en MO, siendo del 60% y la formación de cartílago fibroso fue significativamente mayor que en MO, siendo del 40% (Figura 5D). Y de manera similar que en MO, al cultivar CTMs de SCU en ausencia de medio inductor, no pudieron crecer en sistema de micromasa, siendo incapaces de diferenciarse hacia el linaje condrogénico.

Estos resultados nos indican que las CTMs de SCU tienen la capacidad de diferenciarse hacia condrocitos al ser cultivadas con medio inductor y crecer en un sistema de micromasa al igual que las CTMs de MO, aunque la producción del tipo de cartílago es diferente entre las CTMs a partir de ambas fuentes.

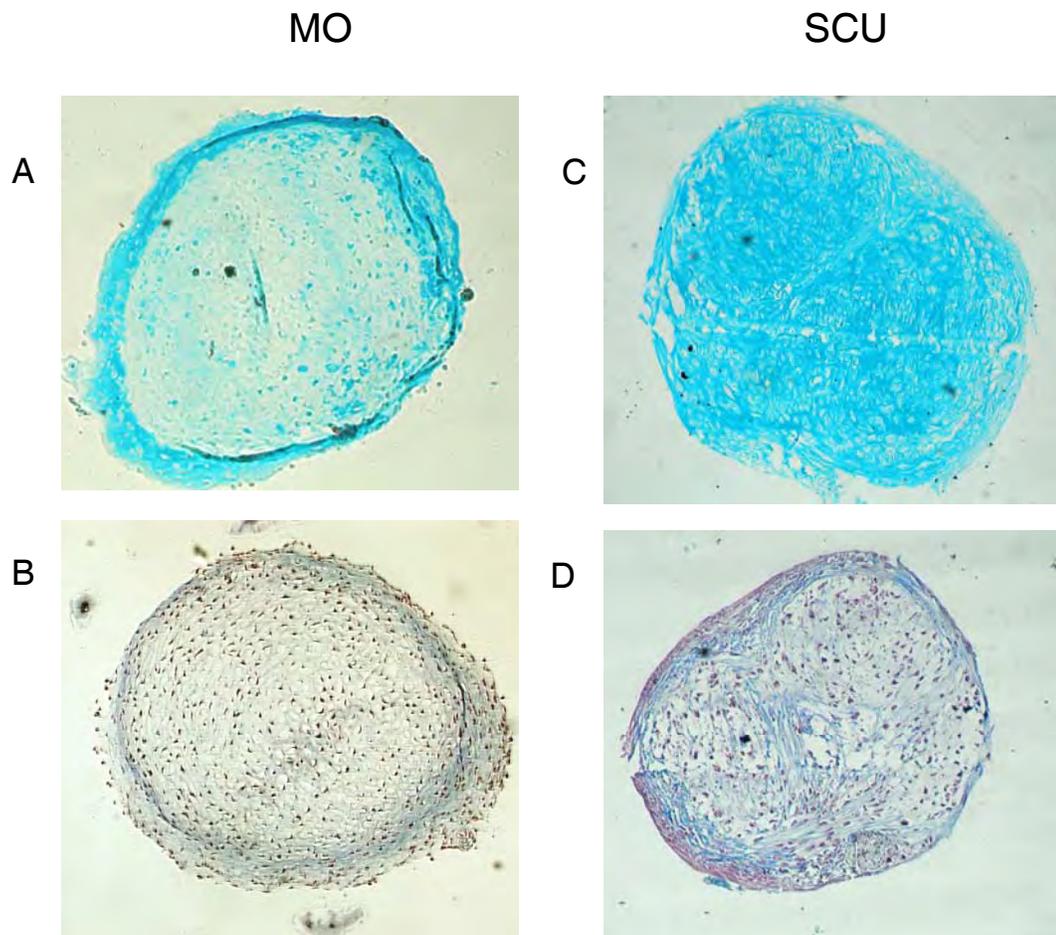


Figura 5. Diferenciación condrogénica de las CTMs de MO y SCU. (A y C) La diferenciación condrogénica es indicada por la presencia de mucopolisacáridos, confirmados por la positividad a la tinción con Azul Alciano (20X). (B y D) El tipo de cartílago fue analizado por la morfología celular y el colágeno producido en las micromasas de CTMs a partir de ambas fuentes. Hialocartílago: caracterizado por la presencia de grupos celulares rodeados por matriz condensada localizada dentro de la misma área y teñida de color gris por la tinción con Tricrómico de Masón. Fibrocartílago: caracterizado por la presencia de fibras de colágeno teñidas de color azul por la tinción con Tricrómico de Masón (20X).

## **6. Capacidad de Diferenciación Neural y Expresión de Proteínas Neurales en CTMs de MO y SCU**

Se determinó la capacidad de expresión de proteínas neurales de las CTMs de MO y SCU, después de haberlas cultivado en ausencia o presencia de medio de diferenciación Neurocult (Battula et al, 2007) durante 10 días. La expresión de proteínas neurales se evaluó por inmunofluorescencia y microscopia confocal, las proteínas analizadas fueron las siguientes: Nestina, la cual se expresa en células neurales inmaduras; Neurofilamento-200 (NF-200), Proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2) y Proteína de núcleo neuronal (NeuN), todas expresadas en células neurales maduras; así como la Proteína ácida glial fibrilar (GFAP), que es una proteína expresada por astrocitos.

Las CTMs de MO expresaron las 5 proteínas neurales en un rango del 2% al 4% de las células cultivadas en ausencia de medio inductor. Al estimular los cultivos celulares con el medio de inducción neural, el porcentaje de células que expresaron las proteínas incrementó significativamente, siendo del 24% para Nestina, 58% para NF, 35% para MAP2 y 24% para NeuN, con excepción de GFAP, que fue expresado en un 3% de las células (Figura 6).

Al igual que las CTMs de MO, las CTMs de SCU expresaron las 5 proteínas neurales sin haber sido inducidas con el medio de diferenciación en un rango del 1% al 6% de las células cultivadas. El porcentaje de las células que expresaron las proteínas neurales al ser cultivadas con medio de diferenciación Neurocult, de manera similar que en MO, incrementó significativamente, siendo del 25% para Nestina, 43% para NF, 45% para MAP2 y 26% para NeuN, a excepción de GFAP, que fue expresado en un 5% de las células (Figura 6). Al comparar la expresión de NF entre las CTMs a partir de ambas fuentes cultivadas en presencia de medio inductor, fue significativamente mayor en MO que en SCU; y la expresión de MAP2 fue significativamente mayor en SCU que en MO. Los porcentajes de expresión de las proteínas neurales por las CTMs cultivadas en ausencia de medio inductor, no fueron significativamente diferentes entre las CTMs a partir de ambas fuentes.

Estos resultados nos indican que CTMs de SCU, al igual que CTMs de MO tienen la capacidad de expresar proteínas neurales después de haber sido inducidas con medio de diferenciación neural, e incluso sin haber sido estimuladas.

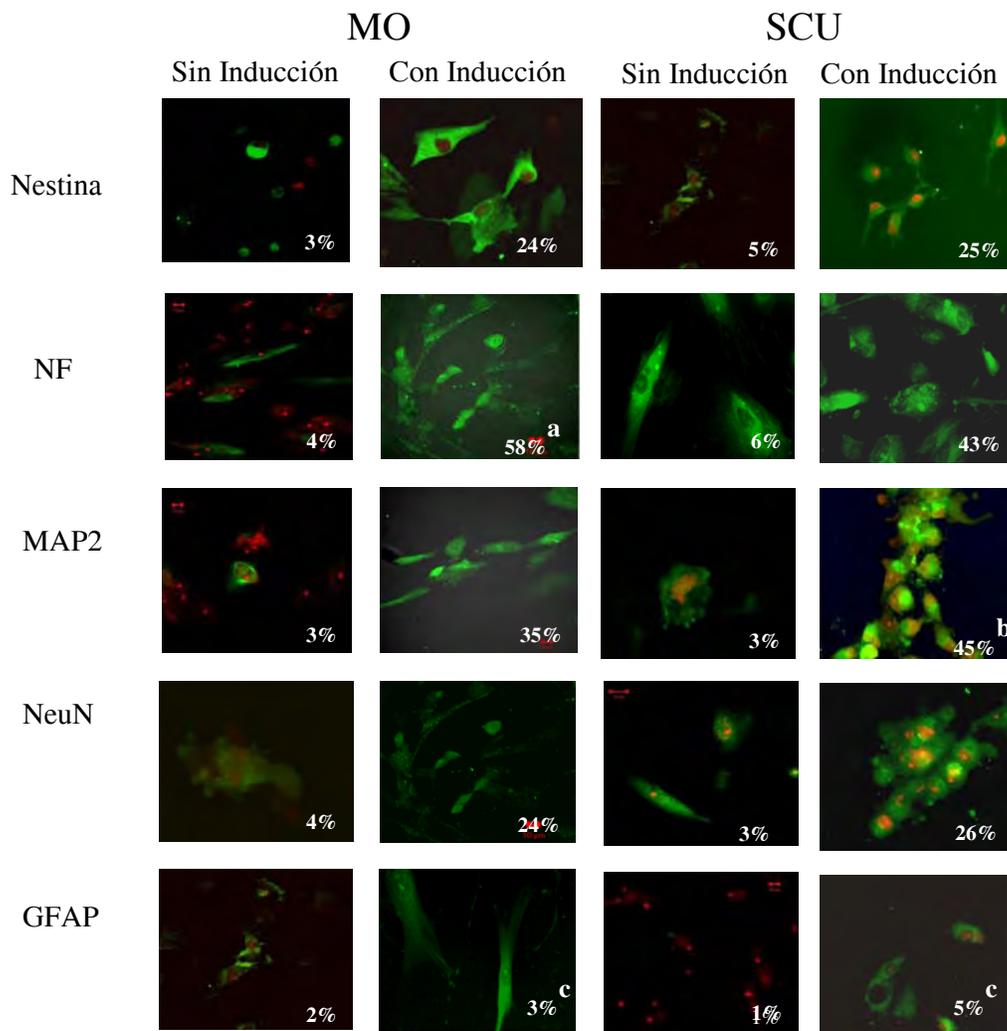


Figura 6. Expresión de proteínas neurales en CTMs de MO y SCU. Las CTMs fueron teñidas con anti-Nestina, anti-NF-200, anti-NeuN y anti-MAP2 (todas para células neurales) y como anticuerpo secundario se usó un IgG-Alexa 450 cabra anti-ratón. La expresión de GFAP (marcador de astrocitos) se realizó con anticuerpo anti-GFAP y como anticuerpo secundario se usó un IgG-FITC cabra anti-conejo. Para analizar las células se contratiñó con yoduro de propidio y se analizó con un filtro de rodamina (rojo). Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para las proteínas correspondientes en ausencia o presencia de medio inductor (20X). (a) Significativamente mayor que SCU (b) Significativamente mayor que MO (c) Significativamente menor que el resto de los valores, dentro de la misma fuente de CTMs, ( $p < 0.05$ ).

## VIII. DISCUSIÓN

Por sus características, incluyendo un gran potencial de proliferación y capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos celulares, las CTMs representan una herramienta promisorio para su uso en la clínica dentro del campo de la terapia celular, así como en la investigación, para el estudio de mecanismos moleculares involucrados en la proliferación y diferenciación celular. Actualmente la MO es la principal fuente de CTMs, sin embargo, presenta algunos inconvenientes, entre ellos la toma de muestras representa un método doloroso y agresivo para el donador, además se ha demostrado que el número y la capacidad de proliferación y diferenciación de las CTMs, disminuyen conforme aumenta la edad del mismo (D'ippolitto et al, 1999; Romanov et al, 2003). Debido a lo anterior, ha sido necesaria la obtención de CTMs a partir de fuentes alternativas a la MO, respecto a esto, existen algunas evidencias de la presencia de CTMs en SCU, lo que representa una interesante opción por las ventajas que tiene sobre la MO, ya que se considera prácticamente un desecho biológico y se pueden obtener las unidades que se deseen. La mayor parte de información acerca de las CTMs ha sido obtenida de experimentos realizados con aquellas provenientes de MO, sin embargo, aun no se han determinado las características funcionales y biológicas de las CTMs de SCU y hasta qué punto en términos biológicos, difieren de las provenientes de MO, por lo que es incierta su posible aplicación clínica. Para contribuir al conocimiento de la biología de las CTMs, en el presente estudio se obtuvieron CTMs de SCU como fuente alternativa a MO, y se realizó su caracterización de una manera comparativa respecto a su morfología, inmunofenotipo y potencial de diferenciación.

En este estudio se logró la obtención de CTMs a partir de MO y SCU, usando un sistema de selección negativa (RosetteSep<sup>TM</sup>; STI), un método que como se había publicado anteriormente, fue superior a métodos como usar únicamente Ficoll para la obtención de CTMs de MO (Flores-Figueroa et al, 2005), y que no había sido publicado para la obtención de CTMs de SCU, además, nuestros resultados son contrarios a los de otros grupos de investigación que no obtuvieron CTMs a partir de esta fuente (Mareschi et al, 2001; Wexler et al, 2003; Yu et al, 2004).

Las CTMs se obtuvieron en todas las muestras de MO (n=9). El porcentaje de obtención fue menor en SCU en comparación con MO, dado que sólo en el 11% de las muestras se pudieron obtener CTMs (n=104). Nuestros resultados coinciden con estudios previos en donde también obtuvieron CTMs de SCU en un bajo porcentaje (Erices et al, 2000; Goodwin et al, 2001; Lee et al, 2004; Kern et al, 2006). Sin embargo, algunos grupos han publicado protocolos para la obtención de CTMs de SCU, llegando a recuperarlas hasta en un 63% de las unidades procesadas, en donde emplean parámetros de restricción para la inclusión de muestras, entre ellos, que la muestra no tenga más de 15 horas de haber sido tomada, un volumen neto mayor de 33ml, un conteo de CMN mayor a  $1 \times 10^8$ , que la muestra no presente coágulos ó hemólisis y un método para evitar la adhesión de monocitos, el cual consiste en un pre-tratamiento a las placas de cultivo con suero fetal de ternera durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, sembrando inmediatamente después las CMN de SCU y retirando las células no adherentes después de una noche de incubación (Bieback et al, 2004). Respecto a esto, en nuestro estudio, se aplicaron los parámetros antes mencionados a excepción del pre-tratamiento de las placas de cultivo con suero fetal de ternera, sin embargo, nosotros eliminamos los monocitos con el sistema de selección negativa RosetteSep, por lo que creemos que el pre-tratamiento a las placas de cultivo favoreció la adhesión de las CTMs. Debido a lo anterior, sería adecuado tomar en cuenta este último parámetro para posteriores obtenciones de CTMs a partir de SCU.

La frecuencia de las CTMs también fue menor en SCU que en MO, siendo de 1 CTM/ $200.5 \times 10^6$  CMN en SCU en comparación con MO, donde se detectó 1 CTM/ $0.031 \times 10^6$  CMN. Con estos resultados se puede decir que las CTMs también se encuentran presentes en circulación, aunque en mucho menor frecuencia que las presentes en MO, estos datos coinciden con estudios en donde también se obtuvieron CTMs de SCU a una baja frecuencia, siendo de 0 a 2.3 CTMs en  $100 \times 10^6$  CMN de SCU (Bieback et al, 2004; Lee et al, 2004; Kern et al, 2006).

Al analizar la morfología de las CTMs de MO y SCU, se pudo identificar la presencia de cuatro tipos celulares, los cuales los nombramos de acuerdo a su tamaño y características morfológicas: células grandes, fibroblastoides, neurales y pequeñas. Dentro de la morfología fibroblastoide, que fue la más frecuente a partir de ambas fuentes, se encontraron 5 tipos celulares morfológicamente distintos (romboide, lamelopodia-lamelopodia, lamelopodia-filopodia, filopodia-filopodia y triangular), lo que nos podría indicar la presencia de subpoblaciones celulares dentro de los cultivos de CTMs, de las cuales, no sabemos si su morfología tiene relación con alguna característica biológica de las células.

El tipo celular con morfología neural se presentó en un 5.9% de los cultivos de CTMs de MO y un 6.2% de los cultivos de CTMs de SCU, este tipo morfológico en particular, fue de gran interés para nosotros, ya que podría indicar la presencia de una subpoblación de células con potencial neural dentro de los cultivos de CTMs a partir de ambas fuentes, lo cual no ha sido publicado anteriormente. Así, nuestros resultados han sido más detallados respecto a la morfología de las CTMs de MO y SCU. En trabajos anteriores, se había publicado alguna heterogeneidad en los cultivos de CTMs de MO, en donde se encontraron dos tipos celulares: el tipo I, en el que las células eran pequeñas y fusiformes, y el tipo II, las cuales eran células más grandes, aplanadas y que proliferaban más lentamente (Mets y Verdonk, 1981). Nuestro grupo también ha publicado sobre la presencia de dos subpoblaciones celulares en los cultivos de CTMs de MO: células muy delgadas de forma alargada y células gruesas y granulares (Flores-Figueroa et al, 2005). Respecto a las CTMs de SCU, también se ha publicado una heterogeneidad morfológica, con la presencia de células fibroblastoides grandes y extendidas, que representaron la mayor parte de la población celular y en menor proporción, células muy delgadas en forma de huso (Yu-Jen et al, 2006b; Marcov et al, 2007).

Basados en nuestros resultados, sería interesante clonar células de los diferentes tipos morfológicos a partir de ambas fuentes y analizar sus características biológicas por separado, para encontrar alguna posible relación entre la morfología y el potencial biológico de las CTMs.

Por otro lado, en los cultivos de CTMs a partir de ambas fuentes, también se observaron células de tamaño pequeño con citoplasma reducido,

probablemente una forma de las células próximas a realizar división celular, las cuales correspondieron al 15.5% de las células de MO y un 31.5% de las células de SCU. Al respecto, algunos autores han sugerido que estas diferencias en el tamaño celular, están relacionadas con el potencial de autorrenovación y estado de maduración de estas células, en donde células pequeñas y alargadas tienen un mayor potencial de proliferación en comparación con células grandes y extendidas (Colter et al, 2000; Colter et al 2001; Smith et al, 2004; Lee et al, 2006; Marcov et al, 2007).

Tomando en cuenta estas referencias y de acuerdo a nuestros resultados, sería interesante realizar cinéticas de proliferación de las células pequeñas y de las células con morfología fibroblastoide y grande, y analizarlas de manera comparativa. En dicho análisis sería interesante incluir células de ambas fuentes, ya que algunos autores han publicado que CTMs de SCU presentan un mayor potencial de proliferación que las CTMs de MO (Goodwin et al, 2001; Bieback et al, 2004; Kern et al, 2006). Incluso, se ha reportado que la longitud del telomero de las CTMs de SCU son significativamente más largos que en CTMs de MO, lo que podría indicar que CTMs de SCU son más jóvenes o inmaduras (Yu-Jen et al, 2006a).

Respecto a los resultados obtenidos en relación al inmunofenotipo de las CTMs de MO y SCU, no se detectó la expresión de marcadores hematopoyéticos a excepción de CD90 y CD117. Las CTMs de ambas fuentes expresaron antígenos descritos para CTMs de MO, entre ellos CD13, CD29, CD44, CD49b, CD73, CD90, CD105 y CD166, (Pittenger et al, 1999; Colter et al, 2000; Minguell et al, 2001; Dominici et al, 2006). A pesar que CD90, CD73 y CD105, son marcadores característicos de CTMs de MO propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici et al, 2006), en este trabajo no se observó una expresión alta y homogénea de CD90 en CTMs de SCU, lo cual esta de acuerdo con lo reportado en otros estudios (Lee et al 2004; Bieback et al, 2004; Yu-Jen et al, 2006b), debido a ello, no consideramos a este marcador como característico, por lo menos para CTMs provenientes de SCU. Contrariamente, la expresión de CD13, CD44 y CD166 fue alta y homogénea en todas las muestras de ambas fuentes, además, resultados similares han sido publicados por otros grupos de investigación respecto a la expresión de CD44 (Lee et al, 2004; Bieback et al,

2004; Tondreau et al, 2005; Kern et al, 2006; Marcov et al, 2007), por lo que se podría proponer como un marcador característico para CTMs de SCU.

También se observó una mayor expresión de c-kit en algunas muestras de SCU (hasta 48%), en comparación con muestras de MO (hasta 19%). Aunque no se sabe la funcionalidad de CD117 en las CTMs, cabe mencionar que es un marcador característico de células primitivas, lo que podría apoyar la idea de que CTMs de SCU son más inmaduras que aquellas de MO. Diferencias significativas en la expresión de otros marcadores como CD140 (receptor para PDGF), fueron observadas en CTMs de MO y SCU (97% y 70% respectivamente), es importante mencionar que este marcador está involucrado con la proliferación celular. Otro marcador con diferencias significativas en su expresión fue CD54, (marcador altamente expresado en células endoteliales y pericitos) siendo expresado en un 23% de CTMs de MO y 69% en SCU. A la fecha no se sabe la relevancia biológica de las diferencias significativas observadas en la expresión de estos dos marcadores, así, para analizar estas diferencias, sería interesante cultivar CTMs de ambas fuentes en presencia de PDGF y analizar de manera comparativa su potencial de proliferación. Respecto a la expresión diferencial de CD54, se podría comparar la capacidad de diferenciación hacia células endoteliales entre CTMs de MO y de SCU.

Por otra parte, se determinó la capacidad de diferenciación de las CTMs hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico después de haberlas cultivado bajo condiciones de inducción hacia cada linaje. Los resultados obtenidos muestran que las CTMs de MO y de SCU tienen la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, ya que se observaron depósitos de calcio en todos los cultivos celulares, incluso en ausencia de medio inductor. Al observar bajo el microscopio, dentro de los cultivos de CTMs de SCU, se observó un mayor porcentaje de diferenciación hacia este linaje en comparación con CTMs de MO, estos resultados coinciden con algunas publicaciones en donde las CTMs de SCU, presentaron mayor capacidad de diferenciación hacia este linaje que aquellas de MO, lo cual fue comprobado midiendo a través de espectrofotometría la actividad de fosfatasa alcalina y la tinción con Alizarin Red para detectar los depósitos de calcio en los cultivos diferenciados (Yu-Jen et al, 2006a), sin embargo, nuestros resultados son cualitativos, por lo que, se tendría que buscar un método para determinar el

potencial de diferenciación de las CTMs hacia osteoblastos que nos permita comparar de manera más precisa entre células de ambas fuentes.

Respecto a la capacidad de diferenciación adipogénica, las CTMs de MO formaron adipocitos con vacuolas lipídicas, las cuales fueron positivas a la tinción con Rojo Oleoso, sin embargo, las CTMs de SCU no fueron capaces de formar células con morfología adipocítica, no obstante, es importante señalar que se formaron acumulaciones celulares, las cuales se tiñeron de manera positiva con Rojo Oleoso. De manera similar, algunos grupos de investigación han publicado que las CTMs de SCU tienen una reducida o no tienen capacidad de diferenciación adipogénica (Bieback et al, 2004; Kern et al, 2006; Yu-Jen et al, 2006a). Otros grupos han relacionado esta capacidad con características inmunofenotípicas de las células, por ejemplo, en un estudio se encontró la presencia de una subpoblación de CTMs de SCU positivas para CD90 y con capacidad de formar adipocitos, mientras que CTMs que no expresaban este antígeno carecían de esta capacidad (Yu-Jen et al, 2006b). Sin embargo, en el presente estudio, las muestras de CTMs de SCU que expresaron un alto porcentaje de CD90, no fueron capaces de formar células con morfología adipocítica, lo cual se contrapone a lo publicado. Nuestros resultados podrían apoyar la idea que las CTMs de SCU son más primitivas que las CTMs de MO, ya que en la MO, el número de adipocitos incrementa conforme aumenta la edad del donador, y así, también la capacidad de las CTMs de diferenciarse hacia este linaje; ello a diferencia de la capacidad de las CTMs de SCU, cuya edad ontogénica es menor. No obstante, otros grupos de investigación han reportado capacidad de diferenciación adipogénica en CTMs de SCU (Goodwin et al, 2001; Tondreau et al, 2005), por lo que aun existe controversia acerca de este tema. Sería interesante aumentar el tiempo de cultivo de las CTMs de SCU con el medio de diferenciación, esperando que las células se diferencien morfológicamente hacia adipocitos después de un tiempo más prolongado de inducción.

Por otra parte, las CTMs de MO y SCU tuvieron la capacidad de crecer en micromasa y diferenciarse hacia condrocitos, interesantemente, en las micromasas de MO se observó mayor formación de hialocartílago, mientras que en SCU se observó mayor formación de fibrocartílago, este es el primer estudio que muestra diferencias respecto al tipo de cartílago producido por CTMs de ambas fuentes. La

diferencia en la producción del tipo de cartílago puede determinar el uso de CTMs a partir de una u otra fuente, dependiendo del tipo de cartílago que se requiera en la aplicación clínica, ya que el cartílago hialino proporciona flexibilidad y sostén cubriendo las articulaciones, mientras que el cartílago fibroso proporciona resistencia y rigidez en los discos intervertebrales y discos articulares (More y Persaud, 1999).

Las diferencias funcionales entre estas células tales como, una mayor capacidad de diferenciación adipogénica de las CTMs de MO y mayor capacidad de diferenciación osteogénica de las CTMs de SCU, así como la diferencia en la producción del tipo de cartílago, podría sugerir distintas capacidades funcionales entre las CTMs de MO y SCU; esto último concuerda con otros estudios publicados (Wagner et al, 2005; Kern et al, 2006).

Al evaluar la morfología de las CTMs de MO y SCU, se observó una subpoblación con características neurales (células con varias extensiones citoplasmáticas parecidas a neuritas). Debido a ello, pensamos en la presencia de una subpoblación de células con potencial neural en la población total de CTMs. Respecto a esto, en este estudio se creyó pertinente analizar la capacidad de diferenciación hacia células neurales con la expresión de diferentes proteínas neurales (Nestina, NF, MAP2, NeuN y GFAP) en las CTMs de MO y SCU, en ausencia y presencia de medio inductor neural. Aunque en un porcentaje bajo, las CTMs de MO y SCU expresaron proteínas neurales sin haber sido inducidas con el medio de diferenciación. Al cultivar las CTMs con medio inductor, el porcentaje de células que expresaron las proteínas neurales incrementó significativamente, observando además, un cambio en su morfología al desarrollar extensiones citoplasmáticas o neuritas. Estudios previos han publicado la expresión de genes y proteínas neurales por CTMs de MO en ausencia y presencia de inductores neurales, sin embargo, para las CTMs de SCU únicamente se había reportado la expresión de genes y proteínas neurales después de haber sido cultivadas en presencia de medio inductor (Godwin et al, 2001; Tondreau et al, 2004; Lee et al, 2004; Minguell et al, 2005; Blondheim et al, 2006; Park et al, 2006; Wang et al, 2007). Así, nuestro estudio confirma estas observaciones respecto a la expresión de proteínas neurales, aportando además, que las CTMs de SCU expresan proteínas neurales antes de ser estimuladas con medio de inducción neural, y que

el porcentaje de estas células puede corresponder al porcentaje de células con características neurales que observamos al analizar la morfología de las CTMs de MO y de SCU.

Una posible explicación para estas observaciones, podría ser la presencia de varias subpoblaciones de CTMs, algunas de ellas comprometidas a un linaje particular, incluyendo el neural, y algunas otras con capacidad multipotente pero sin evidente expresión de proteínas neurales en ausencia de inducción, expresándolas después de estimular a las células para su diferenciación, sin embargo, para analizar su funcionalidad, sería interesante purificarlas e injertarlas en un modelo in vivo, comprobando posteriormente su diferenciación hacia algún tipo de célula neural, esto de manera comparativa entre las CTMs de MO y SCU.

## IX. PERSPECTIVAS

En este estudio se obtuvieron CTMs de MO y SCU, sin embargo, el porcentaje de obtención de CTMs en SCU fue mucho menor que en MO, por lo que sería adecuado aplicar un pre-tratamiento con suero fetal de ternera a las placas de cultivo para posteriores obtenciones de CTMs a partir de SCU e incrementar así el porcentaje de obtención de CTMs a partir de esta fuente, como ya se ha publicado en otros estudios (Bieback et al, 2004)

Por otra parte, se encontraron subpoblaciones celulares morfológicamente diferentes en los cultivos de CTMs de MO y SCU, basados en estos resultados, sería interesante clonar células de los diferentes tipos morfológicos a partir de ambas fuentes y analizar sus características biológicas por separado, para encontrar alguna posible relación entre la morfología y el potencial biológico de las CTMs. En los cultivos de CTMs también se encontraron células de tamaño pequeño con el citoplasma reducido, respecto a esto, en algunos trabajos se ha publicado que CTMs de tamaño pequeño presentan un alto potencial de proliferación (Colter et al, 2000; Colter et al 2001; Smith et al, 2004; Lee et al, 2006; Marcov et al, 2007). Tomando en cuenta estas referencias y de acuerdo a nuestros resultados, sería interesante realizar cinéticas de proliferación de las células pequeñas y de las células con morfología fibroblastoide y grande, y analizarlas de manera comparativa entre ellas. Analizando también el potencial de proliferación entre las células a partir de ambas fuentes, ya que en este estudio se encontró un mayor porcentaje de células pequeñas en los cultivos de CTMs de SCU comparado con MO, y al respecto, algunos autores han publicado que CTMs de SCU presentan un mayor potencial de proliferación que las CTMs de MO (Godwin et al, 2001; Bieback et al, 2004; Kern et al, 2006).

Al analizar la expresión de los antígenos de superficie de las CTMs, se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD140 (receptor de PDGF; marcador involucrado con la proliferación celular) y de CD54 (marcador altamente expresado en células endoteliales). Sin embargo, no se sabe la relevancia biológica de las diferencias significativas observadas en la expresión de estos dos marcadores, así, para analizar estas diferencias, sería interesante cultivar CTMs de ambas fuentes en presencia de PDGF y analizar de manera

comparativa su potencial de proliferación. Respecto a la expresión diferencial de CD54, se podría analizar, también de manera comparativa, la capacidad de diferenciación hacia células endoteliales entre CTMs de MO y de SCU.

En este estudio también se encontró una mayor capacidad de diferenciación osteogénica de las CTMs de SCU comparado con MO, lo cual ya había sido publicado de manera semicuantitativa por otros grupos (Yu-Jen et al, 2006a), sin embargo, nuestros resultados fueron presentados en porcentaje de diferenciación a partir de observaciones bajo el microscopio, por lo que, es necesario la búsqueda de un método que nos permita comparar de manera precisa el potencial de diferenciación de las CTMs hacia el linaje osteogénico.

Por otro lado, sería interesante aumentar el tiempo de cultivo de las CTMs de SCU con el medio de diferenciación adipogénica, esperando que las células se diferencien morfológicamente hacia adipocitos después de un tiempo más prolongado de inducción.

En este estudio se encontró la presencia de una subpoblación celular con la capacidad de expresar proteínas neurales en ausencia de medio inductor neural dentro de la población total de CTMs de MO y SCU, así como un incremento significativo en el porcentaje de células que expresan estas proteínas neurales después de ser estimuladas con medio de diferenciación, sin embargo, para analizar la capacidad funcional de las CTMs con potencial neural antes y después de estimularlas con medio inductor, sería interesante purificar dichas subpoblaciones con base en su morfología neural o mediante la expresión de antígenos relacionados con células neurales como el CD133 ([Padovan et al, 2003](#)), y posteriormente injertarlas en un modelo in vivo, tal como el modelo de lesión medular en rata, en donde se han empleado CTMs de MO para revertir el daño medular (Kim et al, 2006; Deng et al, 2006), comprobando de esta forma su capacidad de diferenciación hacia algún tipo de célula neural in vivo, esto de manera comparativa entre las CTMs de MO y SCU.

## **X. CONCLUSIONES**

Se obtuvieron CTMs de SCU como fuente alternativa a la MO, contribuyendo así, a la caracterización biológica de estas células de una manera comparativa a partir de ambas fuentes.

Las CTMs de SCU presentaron un menor porcentaje de obtención y se encontraron en menor frecuencia que en MO.

Se encontró la presencia de subpoblaciones celulares morfológicamente diferentes dentro de la población total de CTMs a partir de ambas fuentes.

La expresión de CD90 en CTMs de SCU no fue alta y homogénea, contrario a esto, los antígenos CD13 y CD44 presentaron una alta y homogénea expresión en CTMs de ambas fuentes, por lo que, proponemos a estos dos marcadores como característicos de CTMs, al menos para SCU, y no así CD90.

CTMs de SCU presentaron algunas diferencias en la capacidad de diferenciación respecto a aquellas de MO, como una mayor capacidad de formación de osteoblastos, la capacidad disminuida o nula de diferenciación hacia células con morfología adipocítica y una mayor formación de cartílago fibroso al diferenciarse hacia condroblastos.

Las CTMs de SCU y MO fueron capaces de expresar proteínas neurales en ausencia y presencia de medio inductor neural, lo que sugiere la existencia de una subpoblación con potencial neural antes de ser inducidas hacia este linaje.

Por todo lo anterior, podemos considerar que SCU puede ser una adecuada fuente alternativa a MO de CTMs, a pesar de haber encontrado algunas diferencias biológicas entre las células de ambas fuentes, dado que incluso ello, permitiría escoger la fuente que más convenga a un determinado tipo de terapia celular.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BMP-4:	proteína morfogénica de hueso
CPH:	célula progenitora hematopoyética
CTH:	célula troncal hematopoyética
EGF:	factor de crecimiento epidermal
EGFr:	receptor de factor de crecimiento epidermal
FGF:	factor de crecimiento de fibroblastos
Flt-3:	receptor tirosina cinasa parecido a c-fms
G-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos
GFAP	proteína ácida glial fibrilar
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
GvHD:	enfermedad de injerto contra huésped
HER-1:	factor de heparina uno
HGF:	factor de crecimiento de hepatocitos
ICAM-1:	molécula intercelular de adhesión uno
ICAM-2:	molécula intercelular de adhesión dos
IL:	interleucina
IFN $\alpha$ :	interferón alfa
ISCT:	sociedad internacional de terapia celular
LFA-3:	antígeno asociado a la función leucocitaria
LIF:	factor inhibidor de leucemia
MAP2	proteína 2 asociada a microtúbulos
MO:	médula ósea
NeuN	proteína de núcleo neuronal
NF:	neurofilamento-200
OSM:	oncostantina m
PDGF-:	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFr:	receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
SCF:	factor de célula troncal, ligando de c-kit
SDF-1:	factor derivado del estroma uno
TGF $\beta$ :	factor de crecimiento transformante beta
VCAM-1:	molécula de adhesión celular vascular

## **XI. BIBLIOGRAFÍA**

Adams G and Scadden D. The hematopoietic stem cells in its place. *Nat Immunol* 2006; 7: 333-337

Balduino A, Hurtado S, Frazao P, Takiya C, Alves L, Nasciutti L, El-Cheikh M, Borojevic R. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. *Cell Tissue Res* 2005; 319: 255-266

Baksh D, Song L, Tuan R. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 301-316

Battula V, Bareiss P, Tremel S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T, B Bühring H. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 2007; 75: 279-291

Biakow A. Über transplantation von knochenmark. *Centralbl F D Med Wiss* 1870; 8: 371-373

Bianco P and Boyde A. Confocal images of marrow stromal (Westen- Bainton) cells. *Histochem* 1993; 100: 93-99

Bianco P, Riminucci M, Kuznesov S, Robey P. Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context in organ physiology. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999; 9: 159-173

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-192

Biebak K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22: 625-634

Blondheim NR, Levy YS, Ben-Zur T, Burshtein A, Cherlow T, Kan I, Barzilai R, Bahat-Stromza M, Barhum Y, Bulvik S, Melamed E, Offen D. Human mesenchymal stem cells express neural genes suggesting a neural predisposition. *Stem Cells and Dev* 2006; 15: 141-164

- Bobis S, Jarocho D, Makja M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 215-230
- Bruder S, Jaiswal N, Haynesworth S. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following and cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-294
- Campbell A and Wicha M. Extracellular matrix and the hematopoietic microenvironment. *J Lab Clin Med* 1988; 112: 140-146
- Campagnoli C, Roberts I, Kumar C, Bennet P, Bellantuono I, Fisk N. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 2001; 98: 2396-2402
- Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650
- Caplan A and Dennis J. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1076-1084
- Chen D, Wang S, Wang Y. Experimental study on expression of GM-CSF from human endothelial cells and monocytes induced by total saponins of panax ginseng. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He ZaZhi* 2003; 23: 845-847
- Cheng F, Zou P, Yang H, Yu Z, Zhong Z. Induced differentiation of human cord blood mesenchymal stem/progenitor cells into cardiomyocyte-like cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003; 23: 154-157
- Colter D, Class R, DiGiralomo C, Prockop D. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3213-3218
- Colter D, Sekiya I, Prockop D. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7841-7845
- Conget P and Minguell J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999; 181: 67-73

Cumano A, Ferraz J, Klaine M, Di Santo J, Godin I. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 2001; 15: 477-485

Danis A. Apres une greffe de tissue squelettique osteogene, est a partir des cellules transplantees que se constitue l os denouvelle formation. *Bull Soc Int Chirurgie* 1960; 6: 647-652

Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones S, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in hemopoiesis. *Blood Rev* 2006; 20: 161-171

de Bruijn M, Peeters M, Speck N, Dzierzak E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J* 2000; 19: 2465-2474

Deng J, Petersen B, Steindler D, Jorgensen M, Laywell E. Mesenchymal Stem Cells Spontaneously Express Neural Proteins in Culture and Are Neurogenic after Transplantation. *Stem Cells* 2006; 24: 1054-1064

Devine S y Hoffman R. Role of Mesenchymal stem cell in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 358-363

D l'ppolito G, Sciller P, Roos B, Howard G. Age-relatod osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral boe marrow. *J Bobe Miner Res* 1999; 14: 1115-1122

DiMascio L, Voermans C, Ugoezwa M, Duncan A, Lu D, Wu J, Sankar U, Reya T. Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell grow factor. *J Immunol* 2007; 17: 3511-3520

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317

Erices A, Conget P, Minguell J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-242

- Erices A, Allers C, Conget P, Rojas C, Minguell J. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant* 2003; 12: 555-561
- Fernández M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell J. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 265-271
- Flores-Figueroa E, Arana-Trejo R, Gutierrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res* 2005; 29: 215-224
- Flores-Figueroa E. Estudio in vitro de las células mesenquimales presentes en la médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico. Tesis de doctorado 2006
- Flores-Figueroa E, Montesinos J, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Invest Clin* 2006; 58: 498-511
- Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryo Exp Morph* 1966; 16: 381-390
- Friedenstein A. Determined and inducible osteogenic precursor cells, 1973. In: *Hrd tissue Growth, repair and remineralization* (Elliott K, Fitzsimons D, eds.) Elsevier-Experta Medic, North Holland, Amsterdam pp 169-185
- Friedenstein A, Deriglasova U, Kulagina N, Panasuk A, Rudakowa S, Luria E, Rudakowa I. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92
- Friedenstein A, Gorskaja U, Kaluguna N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-274
- Gang E, Hong S, Jeong J, Hwang S, Kim S, Yang S, Ahn C, Han H, Kim H. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321:102-108
- Goodwin H, Bicknese A, Chien S, Bogucki B, Quinn C, Wall D. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 581-588

Goujon E. Recherches experimentales sur les proprietes physiologiques de la molle des os. *J L'Anat Physiol* 1869; 6: 399-412

Gregory C, Singh H, Perry A, Prockop D. The Wnt signalling inhibitor Dkk-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 2003; 278: 28067-28078

Gronthos S, Franklin D, Leddy H, Robey G, Storms R, Gimble J. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189: 54-63

Gronthos S, Zannettino AC, Hay DJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stems derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003; 116: 1827-1835

Gussoni E, Bennett R, Muskiewickz K, Meyerrose T, Nolte J, Gilgoff I, Stein J, Chan Y, Lidov H, Bonnemann C, Von M, Morris G, Dunnen J, Chamberlain J, Kunkel L, Weinberg K. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2002; 110: 807-814

Haynesworth S, Baber M, Caplan A. Cytokine expression by human marrow derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996; 166: 585-592

Haylock D and Nilsson S. Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. *Cell Cycle* 2005; 4: 1353-1355

Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12240-12244

Horwitz E, Prockop D, Flitzpatrick A, Koo W, Gordon P, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx J, Pyeritz R, Brenner M. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in children with osteogenesis imperfect. *Nat Med* 1999; 5: 309-313

Hubin F, Humblet Ch, Belaid Z, Lambert CH, Boniver J, Thiry A, Defrense M-P. Murine bone marrow stromal cells sustain in vivo the survival of hematopoietic stem cells and

the granulopoietic differentiation of more mature progenitors. *Stem Cells* 2005; 23:1626-1633

Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi T. Isolation and characterization of mesenchymal progenitors cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004; 6: 543-553

van't Anker P, Noort W, Scerjon S, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink A, van Bezooijen R, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai H, Fibbe W. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematol* 2003; 88: 845-852

Jackson L, Jones D, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007; 53: 121-126

Jung Y, Wang J, Song J, Shiozawa Y, Havens A, Wang Z, Sun Y, Emerson S, Krebsback P, Taichman R. Annexin II expressed by osteoblasts and endothelial cells regulates stem cell adhesion, homing, and engraftment following transplantation. *Blood* 2007; 110: 82-90

Kern Susanne, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or tissue adipose. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-1301

Kim K, Oh S, Lee K, Yoon D. Effect of human mesenchymal stem cell transplantation combined with growth factor infusion in the repair of injured spinal cord. [Acta Neurochir Suppl](#) 2006; 99: 133-6

Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli M, Tecchio C, Malpeli G, Scarpa A, Dazzi F, Pizzolo G, Vinante F. HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood* 2005; 10: 59-66

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 263: 1439-1441

- Lee O, Kuo T, Chen W, Lee K, Hsieh S, Chen T. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669-1675
- Lee R, Hsu Sh, Munoz J, Jung J, Lee R, Pochampally R, Prockop D. A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice. *Blood* 2006; 107: 2153-2161
- Li Y, Chen J, Zhang C, Wang L, Lu D, Katakouski M, Gao Q, Shen L, Zhang J, Lu M, Chopp M. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 2005; 49: 407-417
- Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin M, Dennis J, Haynesworth S, Koc O. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 597-604
- Majumdar M, Thiede M, Mosca J, Moorman M, Gerson S. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal progenitors (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66
- Majumdar M, Thiede M, Haynesworth S, Bruder S, Gerson S. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiate toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematol Stem Cells Res* 2000; 9: 841-848
- Marcov V, Kusumi K, Tadesse M, William D, Hall D, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen R, Rappaport E, Saitta B. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials and gene expression profiles. *Stem Cells and Develop* 2007; 16: 53-73
- Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematol* 2001; 86: 1099-1100
- Mayani H, Guilbert L, Janowska-W A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Hematol* 1992; 49: 225-233
- Mayani H. La producción de las células sanguíneas. A treinta años del primer encuentro con las CFU-S. *Ciencia y Desarrollo* 1992; 104: 54-59

Mayani H, Dragowska W, Landsport P. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitor from purified cord blood precursor cells. *Blood* 1993; 81: 3252-3258

Medvinsky A and Dizierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1999; 86: 897-906

Mets T and Verdonk G. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech Ageing Dev* 1981; 16: 81-89

Minguell J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226(6): 507-520

Minguell J, Fierro F, Epanan M, Erices A, Sierralta W. Nonstimulated human uncommitted mesenchymal stem cells express cell markers of mesenchymal and neural lineages. *Stem Cells Dev* 2005; 14: 408-414

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher L, Robey P, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5807-5812

More K y Persaud T. *Embriología Clínica*, 6a. Edición. McGraw-Hill Interamericana, México 1999, 599 pp totales

Moreno A, Espinoza L, de la Pompa J, Bigas A. RBPjk-dependent Notch function regulates Gata 2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Develop* 2005; 132: 1117-1126

Morrison S, Hemmati H, Wandycz A, Weissman I. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10302-10306

Murphy J, Fink D, Hunziker E, Barry F. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3464-3474

Nagwa S, Amal H, Samuel S, Xiaomei L, Sriram M, Alison E, Cyndy D, Paul R. Perspective cord blood mesenchymal stem cells: potential use in neurological disorders. *Stem Cells and Develop* 2006; 15: 497-506

[Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A.](#) The significant cardiomyogenic

potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2007; 25(8): 2017-2024

Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res* 1978; 25: 205-207

Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system; 1985. In: *Bone Min Res* Elsevier, Amsterdam, pp 1-25

[Padovan C](#), [Jahn K](#), [Birnbaum T](#), [Reich P](#), [Sostak P](#), [Strupp M](#), [Straube A](#). Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells. *Cell Transplant*. 2003; 12(8): 839-48

Palis J, Chan R, Koniski A, Patel R, Starr M, Yoder M. Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4528-4533

Panepucci R, Siufi J, Silva W, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas D, Zago M. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived Mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 1263-1278

Panoskaltzis N, Mantalaris A, Wu J. Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo. *J Biosci Bioeng* 2005; 1: 28-35

Pak H-N, Qayyum M, kim D, Hamabe A, Miyauchi Y, Lill M, Frantzen M, Takizahua K, Chen L, Fishbein M, Sharifi B, Chen P, Makkar R. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increase tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; 14: 841-848

Park K, lee Y, Kang K. In vitro neuronal and osteogénica differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *J. Vet. Sci.* 2006; 7(4): 343-348

Petrakova K, Tolmacheva A, Friedenstein A. Bone formation occurring in bone marrow transplantation in diffusion chambers. *Bull Exp Biol Med* 1963; 56: 87-91

Phinney D, Kopen G, Isaacson R, Prockop D. Plastic adherent stromal cells form the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth and differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 72: 570-585

Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147

Pittenger M and Martin B. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; 95: 9-20

Quirici N, Soligo D, Bossalasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers G. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by-antineurite growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002; 30: 783-791

Rafii S, Mohle R, Shapiro F, Frey B, Moore M. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leuk Lymphoma* 1997; 27: 375-386

[Reinisch A, Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Bjelic-Radacic V, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D.](#) Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med.* 2007; 2(4): 371-382

Romanov Y, Svintsitskaya V, Smirnov V. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21: 105-110

Sato N, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005; 106: 756-763

Sadler T. W. *Langman Embriología Médica con orientación* 7ª Edición, Editorial Médica Panamericana, México D.F. 1996, 424pg totales

Sekiya I, Colter D, Prockop D. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 411-418

Shake J, Gruber P, Baumgartner W, Senechal G, Meyers J, Redmond J, Pittenger M, Martin B. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model; engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1919-1926

Simmons P and Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody STRO-1. *Blood* 1991; 78: 55-62

Smith J, Pochampally R, Perry A, Hsu Sh, Prockop D. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells* 2004; 22: 823-831

Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Sweeney K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 2002; 30: 699-704

Sudhoff T and Sohngen D. Circulating endothelial adhesion molecules (sE-selectin, sVCAM-1 and sICAM-1) during rHuG-CSF stimulated stem cell mobilization. *J Hematol Stem Cell Res* 2002; 11: 147-151

Szilvassy S. The biology of hematopoietic stem cells. *Arch of Med Res* 2003; 34: 446-460

Tsai M, Lee J, Chang Y, Hwang S. Isolation of human multipotent Mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004; 19: 1450-1456

Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004; 72: 319-326

[Tondreau T](#), [Meuleman N](#), [Delforge A](#), [Dejeneffe M](#), [Leroy R](#), [Massy M](#), [Mortier C](#), [Bron D](#), [Lagneaux L](#). Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. [Stem Cells](#). 2005; 23(8): 1105-12

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33: 1402-1416

Wang L, Li Y, Chen J, Gautman S, Xu Y, Chopp M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematol* 2002; 7: 113-117

- Wang H, Hung S, Peng S, Huang C, Wei H, Guo Y, Fu Y, Lai M, Chen C. Mesenchymal stem cells in the Wharton`s jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004a; 22: 1330-1337
- Wang J, Wang L, Wu Y, Xiang Y, Xie C, Jia B, Harrington J, McNiece I. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Hematol* 2004b; 89: 837-844
- Wang T, Tio M, Lee W, Beerheide W, Udolph G. neural differentiation of mesenchymal-like cells from cord blood is mediated by PKA. [Biochem Biophys Res Commun](#) 2007; 357(4): 10212-1027
- Wexler S, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows J. Adult bone marrow is rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121: 368-374
- Williams J, Southerland S, Souza J, Calcutt A, Cartledge R. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 1999; 65: 22-26
- Wilson C, Bekele G, Nicolson M, Ravussin E, Pratley R E. Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin. *Br J Hematol* 1997; 99: 447-451
- Wognum A, Eaves A, Thomas T. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch of Med Res* 2003; 34: 461-475
- Yu M, Xiao Z, Shen L, Li L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. *Br J Haematol* 2004; 124: 666-675
- Yu-Jen Ch, Daniel T, Ching-Ping T, Tzu-Buo H, Don-Ching L, Shiao-Min H. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem Cells* 2006a; 24: 679-685
- Yu-Jen Ch, Ching-Ping T, Lee-Feng H, Tzu-Bou H, Shiao-Min H. Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cell in umbilical cord blood. *Cell Biol. Inter.* 2006b; 495-499

Zannettino A, Harrison K, Joyner C, Triffitt J, Simmons P. Molecular cloning of the cell surface antigen identified by the osteoprogenitor-specific monoclonal antibody, HOP-26. *J Cell Biochem* 2003; 89: 56-66

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng J, Harris S, Wiedemann L, Mishina Y, Li L. Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836-841

Zhou D, Huang S, Huang K, Wu Y, Bao R, Wei J, Zhang X, Li Y. Mesenchymal stem cells from human cord blood promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2005; 26: 732-735

Zvaifler N, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards C, Moss J, Burger J, Maini R. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2: 477-488