



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN
DE CÉLULAS MADRE CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ A PARTIR DE
MEMBRANA AMNIÓTICA DE HUMANO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)**

P R E S E N T A

MARGARITA LEYVA LEYVA

TUTORA PRINCIPAL: DRA. LIZETH ALICIA FUENTES MERA

COMITÉ TUTOR: DR. JESÚS CHIMAL MONROY
DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

MÉXICO, D. F.

Octubre, 2011.



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **LEYVA LEYVA MARGARITA** con número de cuenta **77000581** con la tesis titulada: **"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS MADRE CD73+/CD44+/CD105+ A PARTIR DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE HUMANO."** realizada bajo la dirección de: **DRA. LIZETH ALICIA FUENTES MERA**

Presidente:	DR.	FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
Vocal:	DR.	JESÚS CHIMAL MONROY
Secretario:	DR.	FELIPE VADILLO ORTEGA
Suplente:	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente:	DR.	RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de septiembre de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi enorme agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser la plataforma que permitió realizar este proyecto personal de formación académica, además de ser parte fundamental para que, a nivel de grupo de investigación, fuera posible formalizar nuestra contribución al conocimiento científico.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado para la realización del proyecto “Participación del complejo de adhesión vía beta-1 integrina de osteoblastos humanos diferenciados a partir de células madre de membrana amniótica en el proceso de adhesión a una matriz. Potencial aplicación en Ingeniería de Tejidos óseos” (CONACYT-87537/SALUD-2008), del cual forma parte este trabajo.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez y al Dr. Jesús Chimal Monroy, miembros del Comité tutor, por sus valiosas aportaciones para el progreso de este trabajo, así como por sus siempre pertinentes comentarios en favor de mi desarrollo académico.

Mi agradecimiento al Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por las facilidades que esta institución me otorgó para llevar a cabo el presente proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Lizeth Fuentes Mera, mi agradecimiento por su guía, entusiasmo y fortaleza para la realización de este proyecto y, como un beneficio adicional, gracias por su amistad.

A la Dra. Lourdes Arriaga Pizano y la Dra. Lourdes María Barrera por su valioso apoyo y dirección en los ensayos de citometría de flujo.

Al Biól. Gabriel Orozco Hoyuela por su colaboración en los ensayos de microscopía de fluorescencia y análisis confocal.

Al Dr. Jaime Calderón Pérez por su contribución para la obtención de las placentas.

A los miembros del Jurado por sus comentarios para la elaboración del escrito de esta tesis.

A mis compañeros y amigos de la Dirección de Investigación del Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

DEDICATORIA

A

Andrea y Angélica

Con mi eterno agradecimiento porque, entre otras muchas razones, han venido a este mundo a reeducarme y reestructurar mis prioridades

Porque han hecho mi vida en verdad interesante

Porque han enriquecido en gran manera mi existencia

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABLAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	4
RESUMEN	7
ABSTRACT	9

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES	11
1.1.1. CÉLULAS MADRE Y SU CLASIFICACIÓN	11
1.1.1.1. <i>Células madre embrionarias</i>	11
1.1.1.2. <i>Células madre germinales</i>	14
1.1.1.3. <i>Células madre fetales</i>	14
1.1.1.4. <i>Células madre somáticas o adultas</i>	15
1.1.2. CÉLULAS MADRE Y SU POTENCIALIDAD	16
1.1.2.1. <i>Células madre totipotenciales</i>	16
1.1.2.2. <i>Células madre pluripotenciales</i>	17
1.1.2.3. <i>Células madre multipotenciales</i>	17
1.1.2.4. <i>Células madre unipotenciales</i>	18
1.1.3. GENES RELACIONADOS CON LA PLURIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE	19
1.1.4. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	21
1.1.5. PERFIL INMUNOFENOTÍPICO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	24

1.1.6. FUENTES DE OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	27
1.1.7. MEMBRANA AMNIÓTICA A TÉRMINO COMO FUENTE DE CÉLULAS MADRE	30
1.1.8. APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE	33
1.1.8.1 APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PARA LA SUSTITUCIÓN Y REGENERACIÓN ÓSEA	35
1.1.8.1.1. <i>Tejido óseo</i>	37
1.1.8.1.2. <i>Células óseas</i>	38
1.1.9. INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA <i>IN VITRO</i> MEDIADA POR DEXAMETASONA	41
1.2. JUSTIFICACIÓN	43

Capítulo II

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL	44
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PROCESO DE ELECCIÓN Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PLACENTA	45
3.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ESTROMALES A PARTIR DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA DE HUMANO	46
3.2.1. <i>Aislamiento celular primario mediante una doble digestión enzimática</i>	46
3.2.2. <i>Cultivo primario y selección de la población celular adherente</i>	47
3.2.3. <i>Inmunofenotipificación mediante citometría de flujo de la población celular adherente con marcadores de superficie CD44, CD73 y CD105</i>	47

3.2.3.1. <i>Citometría de flujo</i>	47
3.2.3.2. <i>Titulación de los anticuerpos utilizados para la separación celular</i>	49
3.2.4. <i>Inmunofluorescencia indirecta para el análisis de los factores de transcripción OCT3/4, SOX2 Y NANOG</i>	52
3.2.4.1. <i>Inmunofluorescencia indirecta</i>	52
3.2.4.2. <i>Inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal de los factores de transcripción OCT3/4, NANOG y SOX2</i>	52
3.2.5. <i>RT-PCR para el análisis de la expresión de los factores de transcripción OCT3/4 Y NANOG</i>	54
3.2.5.1. <i>Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa</i>	54
3.2.5.2. <i>Aislamiento de RNA</i>	54
3.2.5.3. <i>Transcripción reversa</i>	55
3.2.5.4. <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	55
3.3. SEPARACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁺ Y CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁻ MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	56
3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁺ Y CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁻	57
3.4.1. <i>Inmunofenotipificación de las subpoblaciones de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mediante citometría de flujo</i>	57
3.4.2. <i>Inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal de los factores de transcripción OCT3/4, NANOG y SOX2 en las subpoblaciones de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mediante citometría de flujo</i>	57
3.4.3. <i>Capacidad de diferenciación osteogénica de las subpoblaciones de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻</i>	58
3.4.3.1. <i>Evaluación de la actividad de la Fosfatasa alcalina mediante ELISA</i>	58
3.4.3.1.1. <i>Ensayo inmunoenzimático</i>	58
3.4.3.1.2. <i>Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina ósea</i>	60

3.4.3.1.3. <i>Determinación de la concentración de proteínas totales por el método de Lowry</i>	61
3.4.3.2. <i>Evaluación del depósito de calcio mediante la tinción con rojo de Alizarina</i>	62
Capítulo IV	
RESULTADOS	
4.1. Establecimiento del cultivo de células adherentes a partir de la membrana amniótica de humano	63
4.2. Expresión de los marcadores de pluripotencialidad OCT3/4 y NANOG en el cultivo celular adherente	66
4.3. Expresión de los marcadores CD44, CD73 y CD105 en la población de células madre obtenidas de membrana amniótica	69
4.4. Separación de las subpoblaciones de células madre CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁺ y CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁻ mediante citometría de flujo	72
4.5. Las subpoblaciones CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁺ y CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁻ expresan los factores de transcripción SOX2, OCT3/4 Y NANOG	74
4.6. Las subpoblaciones CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁺ y CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁻ poseen un patrón inmunofenotípico propio de las células madre mesenquimales	76
4.7. Las subpoblaciones CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁺ y CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁻ son capaces de diferenciarse hacia el linaje osteoblástico	78
4.8. Inmunogenicidad mediada por HLA-DR de las subpoblaciones CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁺ y CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁻	80
Capítulo V	
DISCUSIÓN	83
Capítulo VI	
CONCLUSIONES	90
Capítulo VII	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Las células madre embrionarias se derivan de la masa celular interna del embrión preimplantación.
- Fig. 2 Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial.
- Fig. 3 La plasticidad celular en los procesos de reprogramación, diferenciación y transdiferenciación.
- Fig. 4 Fuentes más comunes de células madre mesenquimales.
- Fig. 5 Dibujo esquemático de la placenta humana.
- Fig. 6 Sección de membrana fetal a término humana.
- Fig. 7 Organización jerárquica del hueso a diferentes escalas.
- Fig. 8 Tipos de células presentes en el tejido óseo.
- Fig. 9 Reacción enzimática de la fosfatasa alcalina.
- Fig. 10 Procesamiento de la membrana amniótica de humano.
- Fig. 11 Representación esquemática de la estructura de la membrana fetal a término.
- Fig. 12 Selección de células adherentes a las placas de cultivo.
- Fig. 13 Evaluación de la expresión de los marcadores de pluripotencialidad OCT3/4 (A) y NANOG (B).
- Fig. 14 Microscopía de fluorescencia y análisis confocal de la expresión de OCT3/4 y NANOG en células adherentes en cultivo de la membrana amniótica.
- Fig. 15 Análisis mediante citometría de flujo de la población de células adherentes obtenidas de membrana amniótica.
- Fig. 16 Análisis de la expresión de los antígenos CD44, CD73 y CD105 en la población celular de menor tamaño y menor complejidad interna.
- Fig. 17 Análisis de la expresión de los antígenos CD44, CD73 y CD105 en la población celular de mayor tamaño y mayor complejidad interna.
- Fig. 18 Expresión de los marcadores de superficie CD73, CD44 y CD105 en la población de células madre a lo largo de los pases celulares.

- Fig. 19 Separación de las subpoblaciones de células CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mediante citometría de flujo.
- Fig. 20 Microscopía de fluorescencia y análisis confocal de la expresión de SOX2, OCT3/4 y NANOG en las subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻.
- Fig. 21 Evaluación del patrón inmunofenotípico de la subpoblación de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺.
- Fig. 22 Evaluación del patrón inmunofenotípico de la subpoblación de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻.
- Fig. 23 Evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina ósea durante la diferenciación osteogénica.
- Fig. 24 Titulación del anticuerpo vs HLA-DR marcado con PerCP-Cy5.5.
- Fig. 25 Análisis de la expresión de HLA-DR mediante citometría de flujo.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Descripción de reactivos fluorescentes. Parte 1
- Tabla 2. Ensayo de titulación de anticuerpos
- Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia
- Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos usados en los ensayos de PCR
- Tabla 5. Descripción de reactivos fluorescentes. Parte 2
- Tabla 6. Reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal vs fosfatasa alcalina ósea
- Tabla 7. Curva patrón para ensayo de fosfatasa alcalina ósea
- Tabla 8. Curva patrón de BSA para determinación de proteínas totales
- Tabla 9. Evaluación del depósito de calcio mediante la tinción con rojo de Alizarina.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AEC	células epiteliales amnióticas
AMP	monofosfato de adenosina
APC	aloficocianina
AS	capa estromal amniótica
BSA	albúmina sérica bovina
CB	solución amortiguadora de citoesqueleto
CD	cluster of differentiation
cDNA	DNA complementario
cm	centímetros
cm ²	centímetros cuadrados
CS	capas estromales coriónicas
CT	células de trofoblasto
DAPI	4,6'-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DC	células de la decidua materna
Dex	dexametasona
DKK-1	Dickkopf-1
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo inmunoenzimático)
<i>et al.</i>	y colaboradores
FAO	fosfatasa alcalina ósea
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FSC	forward-scattered light (luz dispersada hacia adelante)
g	gramos
GC	glucocorticoides
h	hora
HBsAg	antígeno de superficie de la hepatitis B

HCV	virus de la hepatitis C
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	human leukocyte antigens (antígenos leucocitarios humanos)
<i>i.e.</i>	a saber
IgG	inmunoglobulina
iPS	células madre pluripotentes inducidas
ISCT	The International Society for Cellular Therapy (Sociedad Internacional para Terapia Celular)
kDa	kilodaltones
M	molar
MAPK	proteína cinasa activada por mitógeno
min	minutos
MKP-1	fosfatasa-1 de la vía de señalización de MAPK
mM	milimolar
MSCs	Mesenchymal Stem Cells (células madre mesenquimales)
µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrómetros
µmol	micromol
N	normal
ng	nanogramos
nm	nanómetros
nM	nanomolar
núm.	número
OCT3/4	octamer-binding protein 3/4
pb	pares de bases
PBS	phosphate buffered saline (solución salina amortiguada con fosfatos)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE	ficoeritrina
PerCP-Cy5.5	proteína peridinín clorofila-Cianina 5.5
PFA	paraformaldehído
pNPP	fosfato de p-nitrofenil
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
s	segundo
SB	solución amortiguadora de tinción
SFB	suero fetal bovino
SSC	side-scattered light (luz dispersada lateralmente)
SSEA-1	antígeno embrionario específico de estadio-1
TAE	solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
U	unidades
vs	<i>versus</i>
x g	unidades de veces gravedad

RESUMEN

El considerable potencial terapéutico de las células madre mesenquimales (MSCs) de humano ha generado un creciente interés en una amplia variedad de disciplinas biomédicas tales como la Ingeniería de Tejidos y la Medicina Regenerativa. Las aplicaciones terapéuticas de las MSCs se han relacionado básicamente con su capacidad de diferenciación a multilíneas y con sus propiedades inmunológicas únicas.

La membrana amniótica a término de humano es una fuente atractiva de MSCs debido principalmente al hecho de que este tejido fetal se encuentra disponible fácilmente, se obtiene mediante procedimientos no invasivos y su uso presenta mínimas cuestiones éticas y legales, además de que se ha reportado que se logra una alta eficiencia de recuperación de MSCs.

Una de las mayores dificultades en la investigación con MSCs de humano es el proceso de identificación de las células adecuadas debido a la heterogeneidad de las células en cultivo, especialmente con respecto a la comparación de la expresión de diferentes marcadores. Para tratar este problema, la Sociedad Internacional para Terapia Celular propuso criterios mínimos para definir a las MSCs de humano, a saber, la adherencia al plástico, la expresión simultánea de los antígenos de superficie CD73, CD105 y CD90, la carencia de expresión de los antígenos CD45, CD34, CD14 y el potencial de diferenciación multipotente. Sin embargo, el fenotipo antigénico de las MSCs de humano no es único y no se ha encontrado un marcador exclusivo que sea específico de estas células y hasta ahora la manera de definir a las MSCs de humano ha sido su capacidad de diferenciación *in vitro* e *in vivo*.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar una subpoblación de MSCs aislada de la membrana amniótica de humano mediante separación celular activada por fluorescencia usando un ensayo de citometría de flujo de triple tinción. Las células de la membrana amniótica a término de humano fueron aisladas enzimáticamente y las adherentes al plástico fueron expandidas en

cultivo. Separamos estas células de acuerdo a la coexpresión de los marcadores de superficie CD73, CD105 y CD44. Se aislaron dos subpoblaciones celulares (CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺CD105⁻) que mostraron un perfil inmunofenotípico negativo para CD14, CD34 y CD45 mediante análisis por citometría de flujo consistente con el reportado para células madre no hematopoyéticas. Por otra parte, detectamos la expresión de los factores de transcripción SOX2, OCT3/4 y NANOG mediante microscopía de fluorescencia y análisis confocal en el 100% de las células de ambas subpoblaciones. Estos factores de transcripción son críticos para la autorrenovación y el mantenimiento del estado pluripotente de las células madre embrionarias de ratón y de humano.

Adicionalmente, las subpoblaciones celulares CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺CD105⁻ mostraron la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia el linaje osteogénico, lo cual se evaluó por medio de la cuantificación de la actividad de la fosfatasa alcalina ósea. Además, el análisis cuantitativo de tinción con rojo de alizarina se realizó en ambas subpoblaciones con objeto de demostrar la presencia de mineralización.

Finalmente, la población celular adherente original, las subpoblaciones celulares CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺CD105⁻ y los osteoblastos diferenciados a partir de dichas subpoblaciones mostraron expresión negativa de HLA-DR mediante análisis por citometría de flujo. Este resultado confirma la baja antigenicidad de las MSCs procedentes de la membrana amniótica.

En conclusión, hemos aislado y caracterizado dos subpoblaciones celulares de MSCs de humano que expresan factores de transcripción relacionados con pluripotencia y que tienen capacidad para diferenciarse hacia el linaje osteogénico *in vitro*.

ABSTRACT

The considerable therapeutic potential of human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) has generated markedly increasing interest in a wide variety of biomedical disciplines such as tissue engineering and regenerative medicine. The therapeutic uses of MSCs have been related basically to their multilineage differentiation potential and unique immunological properties.

Term human amniotic membrane is an attractive source of MSCs mainly due to the fact that this fetal tissue is readily available and easily procured with no intrusive procedures, and its use elicit minimal ethical and legal issues, besides it has been reported having a high efficiency in MSCs recovery.

One of the major difficulties in human MSCs research is the identification process of the appropriate cells due to the alternating heterogeneity of cultured cells, especially in regard to the comparability of different markers expression. To address this problem, the International Society for Cellular Therapy proposes minimal criteria to define human MSCs, *i.e.*, adherence to plastic, surface antigen simultaneous expression (CD73, CD105, and CD90), lack expression of CD45, CD34, CD14, and multipotent differentiation potential. However, the antigenic phenotype of human MSCs is not unique and no single marker has been found to be specific for them and until now the only way to define human MSCs is by their differentiation capacity *in vitro* and *in vivo*.

The aim of the present work was to characterize a subpopulation of MSCs isolated from human amniotic membrane by fluorescence-activated cell sorting using a triple staining flow cytometric assay. Cells from term human amniotic membrane were enzymatically isolated and plastic-adherent cells were culture expanded. We sorted these cells according to the co-expression of surface markers CD73, CD105, and CD44. Two cellular subpopulations (CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ and CD73⁺/CD44⁺CD105⁻) were isolated and showed a negative immunophenotypical profile for CD14, CD34 and CD45 by flow cytometry analysis consistent with that reported for non-hematopoietic stem cells. On the

other hand, we detected the expression of the transcription factors SOX2, OCT3/4, and NANOG by confocal fluorescence microscopy in the 100% of the cells of both subpopulations. These transcription factors are critical for self-renewal and pluripotency of human and mouse embryonic stem cells.

In addition, cellular subpopulations CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ and CD73⁺/CD44⁺CD105⁻ were able to undergo *in vitro* differentiation towards osteogenic lineage assessed by means of quantitation of bone-specific alkaline phosphatase activity. Furthermore, quantitative analysis of alizarin red staining was performed in both subpopulations in order to demonstrate the presence of mineralization.

Finally, original cellular adherent population, CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ and CD73⁺/CD44⁺CD105⁻ cellular subpopulations, and osteogenic differentiated cells showed lack HLA-DR expression by flow cytometry analysis. This result confirms low antigenicity of the amniotic membrane derived MSCs.

In conclusion, we have isolated and characterized two cellular subpopulations of human MSCs expressing pluripotency related transcription factors and with potential to *in vitro* differentiate into osteogenic lineage.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. CÉLULAS MADRE Y SU CLASIFICACIÓN

Las células madre se caracterizan por ser células inmaduras con la capacidad de proliferar y dividirse simultáneamente para conservar, por un lado, una población que mantenga el estado indiferenciado (autorrenovación) y, por otro, generar células hijas comprometidas hacia diferentes linajes celulares las cuales se diferencian en células especializadas con características morfológicas y funcionales concretas (Preston *et al.*, 2003). Cabe señalar que las células madre han recibido otras denominaciones tales como troncales o estaminales (por su nombre en inglés “stem cells”).

Las células madre han sido clasificadas, generalmente, con base en dos criterios: el ontogénico y la potencialidad. Desde el punto de vista ontogénico, las células madre se clasifican en: embrionarias, germinales, fetales y somáticas o adultas.

1.1.1.1. *Células madre embrionarias*

Derivan del embrión de los mamíferos en su etapa de blastocisto y poseen la capacidad de generar cualquier célula diferenciada en el organismo.

Después de la penetración del espermatozoide, el óvulo fecundado adquiere la condición de cigoto en el que se van produciendo sucesivamente, durante su recorrido por la trompa de Falopio, distintos ciclos de división celular que aumentan rápidamente el número de sus células, las cuales reciben el nombre de blastómeros. Aproximadamente a los 3 días, el embrión tiene el aspecto de una esfera compacta que se denomina mórula y que contiene de 12 a 16 blastómeros. Alrededor de los 4 días llega a la cavidad uterina y, sobre los 5 días, comienza a introducirse líquido en su interior para formar una cavidad denominada blastocele. En esta etapa, el cigoto se llama blastocisto y posee en uno de sus polos una agrupación celular que recibe el nombre de masa celular interna o embrioblasto que forma una prominencia dentro del blastocele. Las células que la integran dan origen a todos los tipos celulares, sistemas, tejidos y órganos del individuo en formación. Además, tiene una capa celular aplanada que recubre la cavidad del blastocisto y la parte exógena del embrioblasto, la cual se denomina masa celular externa o trofoblasto, de donde deriva la placenta. Hacia el final de la primera semana del desarrollo, el blastocisto humano ha comenzado su anidación en la mucosa uterina mediante la introducción en esta de las células trofoblásticas que recubren el polo del embrioblasto (Sadler, 2004).

Es importante señalar que las células de la masa interna no mantienen indefinidamente *in vivo* su capacidad de generación hacia cualquier tipo celular, ya que se van diferenciando progresivamente en los diversos tipos celulares durante la fase intrauterina del desarrollo. Sin embargo, cuando se extraen de su ambiente embrionario natural y se cultivan *in vitro*, sí son capaces de proliferar ilimitadamente y a su vez mantener su potencial de generar células capaces de diferenciarse en cualquiera de los tejidos del organismo (Verfaillie *et al.*, 2002; Desbaillets *et al.*, 2000). En este estado es que se califican como células madre embrionarias (fig. 1).

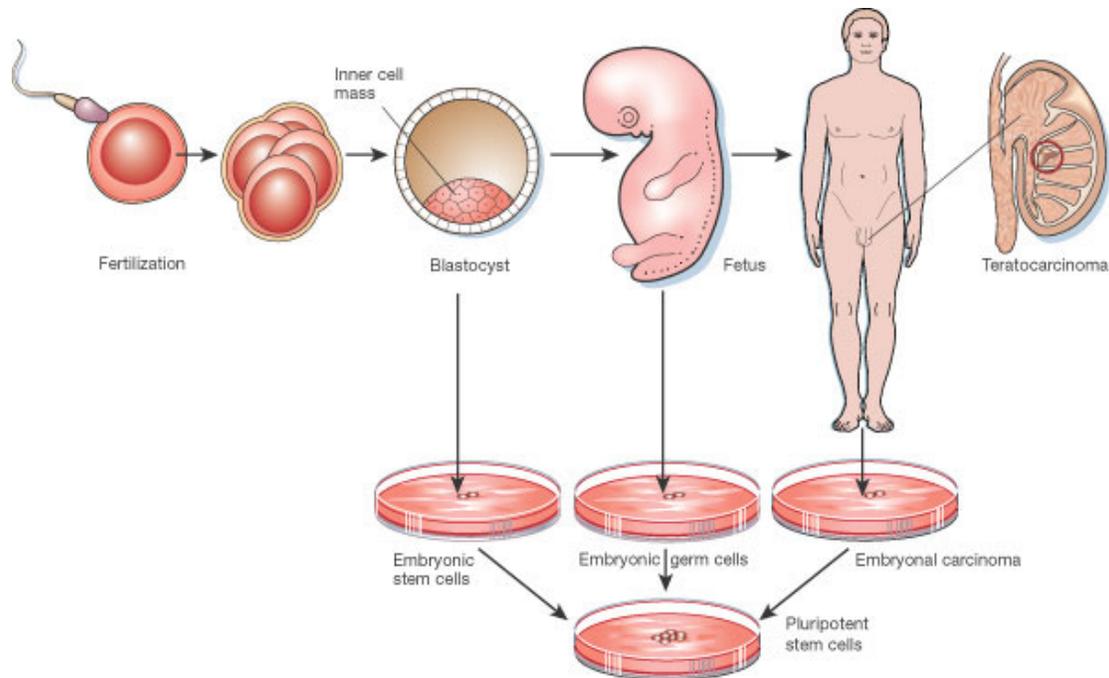


Fig. 1 Las células madre embrionarias se derivan de la masa celular interna del embrión preimplantación. Las células madre germinales se derivan de las células germinales primordiales aisladas de las gónadas embrionarias. Las células de carcinoma embrionario se derivan de las células germinales primordiales en las gónadas embrionarias, pero generalmente son detectadas como componentes de tumores testiculares en el adulto. Tomado de: Donovan *et al.*, 2001.

A pesar de que las células madre embrionarias de ratón se venían estudiando desde el inicio de los años 80 del siglo pasado (Evans *et al.*, 1981; Martin, 1981), no fue sino hasta 1998 que se obtuvieron las primeras células madre embrionarias de procedencia humana (Thomson *et al.*, 1998; Shambloott *et al.*, 1998), lo que abrió un nuevo campo de investigación y posibilidades de aplicación práctica. Sin lugar a dudas, las células madre embrionarias han resultado una gran aportación científica que ha despertado bastante interés no solamente en el campo de la Biología del desarrollo, sino también en el de la Medicina Regenerativa, en particular por las expectativas que se han creado para su aplicación terapéutica en múltiples enfermedades humanas. Sin embargo, existen varios aspectos adversos relacionados con ellas como el hecho de que el trasplante de células madre embrionarias puede formar teratomas o teratocarcinomas, los cuales son tumores gonadales raros que contienen una amplia variedad de tejidos derivados de las

tres capas germinales primarias que constituyen al embrión: endodermo, mesodermo y ectodermo (Stevens, 1967). Además, debido a que estas células proceden de un embrión humano vivo, su manipulación y destino se ha enfrentado en diferentes países a una fuerte oposición, basada principalmente en aspectos éticos, religiosos y políticos.

1.1.1.2. Células madre germinales

Son células troncales que pueden aislarse a partir de la línea embrionaria de producción de espermatozoides y óvulos. Son células pluripotenciales que derivan de los esbozos gonadales del embrión, los cuales se encuentran en la cresta gonadal que dará origen a las gónadas (fig. 1). Las células germinales no inician la diferenciación sexual hasta la mitad de la gestación; se conoce que hasta ese momento mantienen la capacidad de diferenciación hacia diferentes líneas celulares. Las células madre germinales se han aislado a partir de esas células germinales primordiales embrionarias y fetales y, tal como ocurre con las células madre embrionarias, también poseen una gran capacidad proliferativa que se hace evidente cuando se someten a cultivo (Aflatoonian *et al.*, 2006). Se ha señalado que en estas condiciones las células madre germinales se mantienen únicamente durante 70 a 80 pases, pero tienen la ventaja de que no forman teratomas cuando se inyectan en ratones, por lo que pudieran representar una fuente más segura de material trasplantable.

1.1.1.3. Células madre fetales

En la etapa fetal también existen células madre con capacidad de diferenciación y autorrenovación. Estas células madre aparecen en tejidos y órganos fetales como sangre, hígado, pulmón, médula ósea, riñón, páncreas, placenta, cerebro y médula espinal. Las células madre fetales poseen características similares a sus homólogas en tejidos adultos aunque parecen

mostrar mayor capacidad de expansión y diferenciación. El origen de las células madre fetales podría ser a partir de células embrionarias que aparecen distribuidas por todos los tejidos fetales como reservorios de células troncales, o bien podría tratarse de células madre que proceden de nuevas oleadas de progenitores sin relación con las células troncales embrionarias (Ruiz *et al.*, 2008). Según sea su origen, se consideran células pluripotenciales, es decir con la misma capacidad de diferenciación que las células madre embrionarias, o bien como células troncales con una capacidad de diferenciación más restringida similar a la que muestran las células troncales presentes en los individuos adultos (Pappa *et al.*, 2009).

1.1.1.4. Células madre somáticas o adultas

Clásicamente, se han definido como células especializadas dentro de la organización de las células de un tejido específico de un organismo ya formado. La capacidad de diferenciación de las células troncales adultas está restringida a generar únicamente células del tejido en el que se encuentran, a las que deben recambiar de forma natural. Se ha señalado que en su evolución el organismo sitúa en los tejidos células madre somáticas como parte de los mecanismos que emplea para su renovación en condiciones fisiológicas o ante un daño en los tejidos. Sin embargo, en los últimos años se han realizado varios estudios que han aportado resultados sorprendentes, pues sugieren que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas es mayor de lo esperado, ya que han mostrado, en determinadas condiciones, capacidad para diferenciarse en células de diferentes linajes (Jiang *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2002).

Aunque los criterios establecidos para definir a una célula madre adulta son difíciles de comprobar experimentalmente, se ha mostrado que la mayor parte de los criterios que cumplen las células madre embrionarias los satisfacen también las células madre adultas, ya que pueden tener divisiones autorrenovadoras y pueden dar lugar a diversos tipos celulares. Múltiples reportes señalan la existencia de células madre adultas en varios sitios del organismo que incluyen

médula ósea, sangre periférica, cerebro, grasa, pulpa dentaria, vasos sanguíneos, músculo esquelético, piel, tejido conjuntivo, córnea, retina, hígado, conductos pancreáticos, folículo piloso, tejido gastrointestinal y pulmón (Zeidán-Chuliá *et al.*, 2009).

Todos estos hallazgos han ampliado los conocimientos sobre las células madre adultas y resulta particularmente interesante que el potencial de diferenciación de algunas de ellas las acercan al de las células madre embrionarias. Esto ha creado nuevas perspectivas para el tratamiento de diferentes enfermedades con células madre adultas, lo que en un principio se pensaba que únicamente podía hacerse con células madre embrionarias.

1.1.2. CÉLULAS MADRE Y SU POTENCIALIDAD

La potencialidad representa la capacidad y posibilidad de diferenciación de las células madre y se manifiesta y clasifica de acuerdo con el orden jerárquico de su desarrollo. En función de su potencial de diferenciación, las células madres se han clasificado en: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales (Prósper *et al.*, 2003) (fig. 2).

1.1.2.1. Células madre totipotenciales

Son aquellas células troncales que aparecen en las primeras etapas del desarrollo del embrión, esto es, en etapas anteriores a la formación del blastocisto. Estas células tienen capacidad de diferenciarse hacia todos los tipos de células de tejidos y órganos, así como en estructuras extraembrionarias tales como la placenta o el cordón umbilical (Ratajczak *et al.*, 2008).

1.1.2.2. Células madre pluripotenciales

Son las células troncales que tienen capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula a excepción de las células que integran la placenta y el cordón umbilical. Así, dan origen a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias: ectodermo, endodermo y mesodermo (Ratajczak *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2008).

1.1.2.3. Células madre multipotenciales

Son células que pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes, pero no de todos (Jiang *et al.*, 2002). Tradicionalmente, las células madre adultas se habían ubicado en esta etapa de la evolución celular. Sin embargo, en los últimos años, se ha hecho evidente que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas es mayor que la que habitualmente se les confería, pues se evidenció que podían diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias, señalándose como el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas. Este fenómeno ha sido calificado como plasticidad de las células madre adultas, tomando en cuenta la flexibilidad que tienen algunas de ellas para formar células especializadas de otros linajes (Loeffler *et al.*, 2002). El cambio del programa de diferenciación podría estar relacionado con variaciones en las señales internas y externas que reciben las células en las interacciones que tienen con todos los elementos constitutivos del nuevo microambiente, hábitat o "nicho" en que se sitúan en el organismo. Entre tales elementos podrían considerarse: proteínas promotoras e inhibidoras del ciclo celular, factores secretados por las células vecinas, además de interacciones intercelulares y con la matriz extracelular del tejido mediante proteínas de membrana (Krinner *et al.*, 2010).

1.1.2.4. Células madre unipotenciales

Son células troncales que muestran compromiso hacia un tejido y que únicamente pueden dar origen a células de un linaje como, por ejemplo, células troncales epidérmicas, del epitelio intestinal, neurales, hepáticas o células troncales de músculo esquelético (Ratajczak *et al.*, 2008). Estas células han sido denominadas en algunos trabajos como células en tránsito, células progenitoras comprometidas o células precursoras.

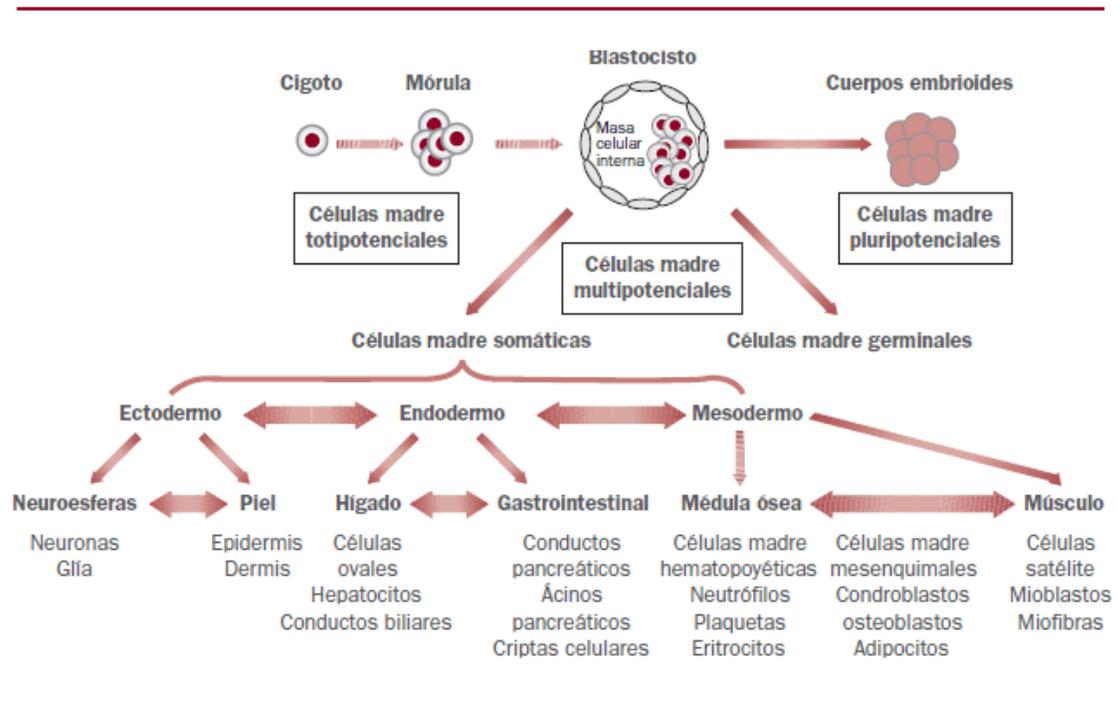


Fig. 2 Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial.
Tomado de: Prósper *et al.*, 2003.

1.1.3. GENES RELACIONADOS CON LA PLURIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE

Las células madre embrionarias son pluripotentes y mantienen la capacidad para diferenciarse hacia los linajes mesodérmico, ectodérmico y endodérmico. Como ha sido señalado por Kellner: “OCT3/4, NANOG y SOX2 constituyen una triada de factores de transcripción que son críticos para la autorrenovación y la pluripotencialidad de las células madre embrionarias de ratón y humano” (Kellner *et al.*, 2010).

Boyer *et al.* (2005) reportaron que OCT3/4, NANOG y SOX2 regulan sinérgicamente la transcripción de sus genes blanco. Estos tres factores se asocian al 3%, 9% y 7%, respectivamente, de las regiones promotoras de aproximadamente 18,000 genes en las células madre embrionarias de humano. Loh *et al.* (2006) reportaron un hallazgo similar con las células madre embrionarias de ratón. De manera importante, al menos dos de los tres factores se unen a la vez a los promotores de más de 300 genes, incluyendo los promotores o “enhancers” de los genes mismos de OCT3/4, NANOG y SOX2 y activan estos genes. Esta idea de coocupación está apoyada por la presencia de elementos adyacentes de enlace de SOX2 y OCT3/4 localizados dentro de “enhancers” de sus genes blanco. Además, OCT3/4, NANOG y SOX2 pueden estar presentes dentro de los mismos complejos de proteínas. Estos hallazgos sugieren que los tres factores de transcripción funcionan en cercana colaboración uno con otro y forman una curva de retroalimentación autorregulatoria para mantener su nivel de expresión para autorrenovación.

La importancia de OCT3/4 en la pluripotencia ha sido además destacada por la reciente innovación de la tecnología de células madre pluripotentes inducidas (iPS). Esta tecnología crea células pluripotentes tipo células madre embrionarias por introducción de cuatro factores de transcripción, incluido OCT3/4, en células diferenciadas (Takahashi *et al.*, 2006). Varios reportes han mostrado que la adición o eliminación de determinados factores es suficiente para reespecificar la

identidad celular como es ilustrado por PAX5, REST-VP16, MYOD, C/EBP β y PDX1 (fig. 3).

La reprogramación, es decir la reversión del destino celular comprometido hacia un estado pluripotente, podría también ser inducida por la expresión forzada de OCT3/4, SOX2, KLF4, NANOG y LIN28 (Takahashi *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007). Entre las diversas combinaciones de los factores de reprogramación, se ha encontrado que los factores OCT3/4 y SOX2 son indispensables para dirigir las células hacia la pluripotencia.

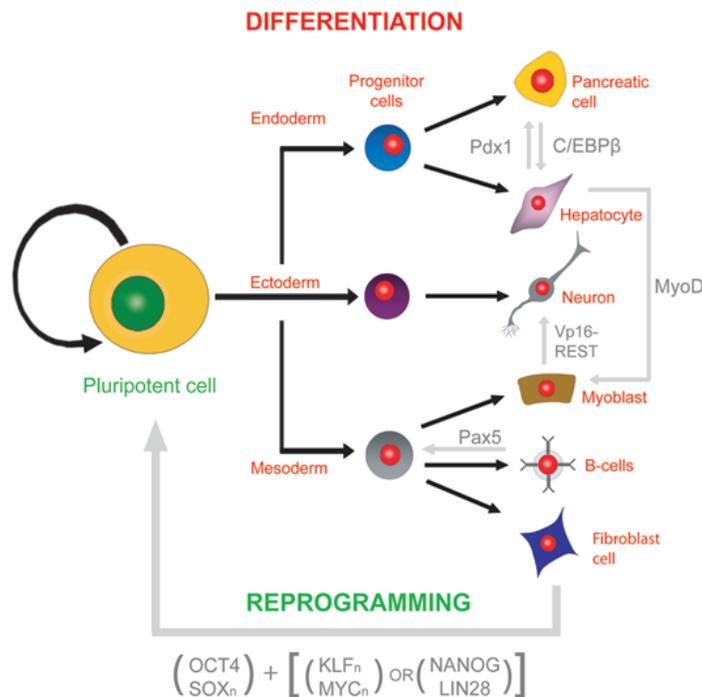


Fig 3. La plasticidad celular en los procesos de reprogramación, diferenciación y transdiferenciación. Las células madre embrionarias son pluripotentes y mantienen su capacidad para diferenciarse en linajes del mesodermo, ectodermo y endodermo. La reprogramación puede ser inducida por la expresión forzada de OCT3/4, SOX2, KLF4, NANOG y LIN28. Tomado de: Loh *et al.*, 2008.

1.1.4. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Friedenstein *et al.* (1974) describieron, por primera vez, a una población de células adherentes de médula ósea que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético. En 1976 se informó que de la médula ósea se podían obtener células estromales con capacidad clonogénica. Posteriormente, se describió a una población de células de la médula ósea que presentaba una gran capacidad proliferativa y de diferenciación hacia varios linajes celulares. Estas células se denominaron células madre mesenquimales (MSCs por sus siglas en inglés Mesenchymal Stem Cells). Estas fueron las primeras células madre no hematopoyéticas que se aislaron de la médula ósea y entre sus características destacan su adherencia al plástico, el aspecto de fibroblastos fusiformes en cultivos no estimulados, expresión de marcadores específicos como SH2, SH3 y SH4 con ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD11 y CD14. Más recientemente se han añadido otros antígenos de superficie útiles para la identificación de las MSCs, como son CD29, CD44, CD71, CD90 y CD106 (Deans *et al.*, 2000.)

Desde los primeros reportes sobre MSCs, estas células han recibido diferentes denominaciones y en ocasiones una misma población ha sido nombrada de diversas maneras (Baksh *et al.*, 2004; Robey *et al.*, 2006). Entre las denominaciones más frecuentes podemos mencionar: células estromales de médula ósea, células madre mesenquimales, células estromales mesenquimales, unidades formadoras de colonias fibroblastoides, células precursoras estromales, células adultas progenitoras multipotentes y células madre esqueléticas.

A fin de evitar controversias debido la diversidad en la terminología, en el año 2005, el comité de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (The International Society for Cellular Therapy, ISCT) enfatizó la recomendación de utilizar la denominación de “células mesenquimales estromales multipotentes”, mientras que la denominación de “células madre mesenquimales” sea reservada para un subgrupo de estas u otras células en las que se demuestre la actividad de célula madre por criterios claramente establecidos (Horwitz *et al.*, 2005). La

designación de “mesenquimal” se refiere al origen de estas células y no a su potencial de diferenciación. Por otro lado, la designación de estromal se refiere a la localización *in situ* de estas células dentro del compartimiento estromal de soporte de los tejidos en los que residen. Este comité sugirió además que se conservara el acrónimo MSCs tanto para las células mesenquimales estromales multipotentes como para las células madre mesenquimales, siempre y cuando previamente sea definido con el propósito de reducir confusiones y evitar distorsiones en la terminología.

No obstante, un problema aún más crítico en relación al estudio y caracterización de este tipo de células lo constituye la falta de sistematización en su análisis. Esto repercutió en la imposibilidad de realizar comparaciones entre las aportaciones de diversos grupos de investigación.

No es sino hasta el año 2006, que la ISCT propuso tres criterios mínimos para definir a las células madre mesenquimales (Dominici *et al.*, 2006):

1° Deben ser adherentes al plástico en condiciones estándares de cultivo utilizando botellas de cultivo de tejidos.

2° Deben expresar antígenos de superficie específicos. La población de MSCs debe expresar un fenotipo positivo ($\geq 95\%$) para CD105, CD73 y CD90, utilizando mediciones de citometría de flujo. Adicionalmente, esta población celular debe carecer ($\leq 2\%$) de los antígenos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA clase II.

3° Las células deben ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos o condroblastos bajo condiciones estándares de diferenciación *in vitro*.

Como ya se ha mencionado, las MSCs tienen la capacidad de adherirse al plástico de la caja de cultivo y, una vez iniciado este proceso, las células adquieren una morfología alargada fibroblastoide y comienzan a construir colonias simétricas (entre los 5 y los 7 días luego de que se inicia el cultivo). Las MSCs humanas proliferan más rápidamente y conservan su máxima capacidad de

multipotencialidad cuando se cultivan a densidades relativamente bajas (Sekiya *et al.*, 2001). Se ha reportado que la densidad inicial del cultivo afecta no solamente el crecimiento celular, sino también su morfología (Tropel *et al.*, 2004). Cuando las células son cultivadas a una densidad baja, la mayoría adquieren una morfología fusiforme; cuando llegan a la confluencia y comienzan a crecer en varias capas, las células se vuelven planas y con los extremos rasgados.

Las MSCs poseen un patrón de crecimiento característico que está definido en tres fases (similar a otras células progenitoras):

1° Una fase inicial de latencia, que tiene una duración de 3 a 4 días

2° Una fase de rápida expansión (fase logarítmica)

3° Finalmente, una fase estacionaria (Bruder *et al.*, 1997; Colter *et al.*, 2001).

La última etapa (estacionaria) no se basa en la inhibición del crecimiento de las células por contacto y el replaqueo de las células dispara el crecimiento aproximadamente cinco pasajes más (Colter *et al.*, 2001). El grupo de Prockop sugiere que el cambio entre las diferentes etapas está regulado principalmente por la expresión del gen Dickkopf-1 (DKK-1) y los genes Wnt5a, los cuales juegan un papel opuesto (Gregory *et al.*, 2003). La máxima expresión de DKK-1 aparece en la fase logarítmica y acorta la etapa anterior mediante la inhibición de la expresión de Wnt5a. Por otro lado, durante la fase estacionaria la expresión de la proteína Wnt5a alcanza su pico máximo.

En condiciones óptimas, las MSCs pueden ser mantenidas en cultivo de 20 a 30 duplicaciones de la población conservando su capacidad de diferenciación (Friedenstein *et al.*, 1970), lo cual muestra la gran capacidad proliferativa de estas células. El estudio del perfil del ciclo celular de las MSCs ha revelado que alrededor del 10% de estas células se encuentran en las fases S, G2 y M del ciclo celular, mientras que el 90% restante de las células permanecen en la fase G0/G1 (Conget *et al.*, 1999).

En los estudios de genómica se ha visto que las MSCs mantienen normales tanto el cariotipo como la actividad de la telomerasa, incluso hasta el pasaje 12 (Pittenger *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha observado que el subcultivo prolongado deteriora su funcionalidad y desarrollan signos evidentes de senescencia y/o apoptosis (Conget *et al.*, 1999).

1.1.5. PERFIL INMUNOFENOTÍPICO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las MSCs expresan en su mayoría los antígenos de superficie CD105, CD73 y CD90; sin embargo, es importante señalar que la abundancia de estas proteínas entre diferentes poblaciones y subpoblaciones es variable en respuesta no solamente a su origen, sino también a su entorno.

CD105, también conocida como endoglina, fue originalmente reconocida por el anticuerpo monoclonal SH2. CD105 es una glicoproteína transmembranal de 180 kDa constitutivamente fosforilada, con una marcada especificidad de tejido. CD105 está predominantemente expresada en células endoteliales donde su promotor es fuerte y selectivamente activo. Consistentemente, se detectaron niveles elevados de expresión de CD105 en el endotelio microvascular humano y en células endoteliales vasculares en tejidos que sufren angiogénesis activa. Sin embargo, CD105 también fue débilmente expresada en células no endoteliales como monocitos activados, macrófagos diferenciados, células B tempranas, precursores eritroides, fibroblastos, células dendríticas foliculares, melanocitos, células mesenquimales cardíacas, células vasculares de músculo liso, células mesangiales y sincitiotrofoblastos (Fonsatti *et al.*, 2004).

CD105 es un componente del complejo del receptor de TGF- β , una citocina pleiotrópica involucrada en la proliferación, diferenciación y migración celular (Govinden *et al.*, 2003). Se une a varios componentes de la superfamilia TGF- β . Interesantemente, la unión de TGF- β 1 a CD105 reduce los niveles de fosforilación

de CD105 (Lastres *et al.*, 1994) y los niveles de expresión de CD105 modulan los efectos de TGF- β 1 (Lastres *et al.*, 1996; Guerrero-Esteo *et al.*, 2002). Al respecto, es de interés que la inhibición de la expresión de CD105 incrementa la capacidad de TGF- β 1 de suprimir el crecimiento, la migración y la capacidad de formar tubos capilares de células endoteliales cultivadas (Li *et al.*, 2000).

Además, el descubrimiento de que los niveles de CD105 regulan la expresión de diferentes componentes de la matriz extracelular incluyendo fibronectina, colágena y PAI-1, sugieren el importante papel de CD105 en la transmigración celular (Botella *et al.*, 2004).

CD73 (NT5E 5'-nucleotidasa; Ecto-5-prima-nucleotidasa; 5-prima-ribonucleótido fosfohidrolasa) cataliza la conversión a pH neutro de purina 5-prima mononucleótidos a nucleósidos, siendo el AMP el sustrato preferido. Esta enzima consiste de un dímero de dos subunidades de 70 kDa idénticas unidas por un enlace glicosil fosfatidil inositol a la cara externa de la membrana plasmática. La enzima es usada como un marcador de diferenciación de linfocitos. Se ha propuesto que CD73 proporciona una señal antiinflamatoria a través de la producción de adenosina, llevando a una función de barrera endotelial incrementada y unión disminuida de leucocitos (Grünewald *et al.*, 2010).

Barry *et al.* (2002), utilizando los anticuerpos monoclonales SH3 y SH4, identificaron epítopes distintos de CD73 en células madre mesenquimales humanas. Estos autores inmunoprecipitaron a la ecto-5'-nucleotidasa a partir de una preparación solubilizada de membrana de dichas células madre.

CD90 (Thy-1) es una glicoproteína de membrana de 25 – 30 kDa anclada a glicosil fosfatidil inositol (Low *et al.*, 1985). CD90 es expresada en timocitos, células T periféricas, fibroblastos, células epiteliales, neuronas (Williams *et al.*, 1982) y células madre hematopoyéticas (Spangrude *et al.*, 1988). Aunque CD90 es comúnmente usado como un marcador positivo para MSCs, también ha sido descrito como un posible marcador para la diferenciación osteoblástica (Chen *et al.*, 1999). Wiesmann *et al.* (2006) realizaron un estudio con MSCs cultivadas en

medio osteoinductivo y observaron que la expresión de CD90 disminuyó mientras había un incremento en la expresión de las proteínas colágena I y osteonectina. Estos autores concluyeron que probablemente CD90 sea expresado durante la proliferación pero el nivel de expresión decline mientras las células maduran hacia células tipo osteoblasto (Wiesmann *et al.*, 2006).

CD44 es una glicoproteína transmembranal tipo I que se expresa ubicuamente y que tiene muchas variantes debido a extenso “splicing” alternativo. Las proteínas CD44 participan en muchos procesos celulares, que incluyen: regulación del crecimiento, sobrevivencia, diferenciación y motilidad. CD44 media la adhesión célula-célula y las interacciones célula-matriz extracelular a través de su unión a su principal ligando, ácido hialurónico, un glicosaminoglicano altamente concentrado en la región endosteal (endóseos) (Jin *et al.*, 2006). Otros ligandos incluyen osteopontina, fibronectina y selectina, los cuales están involucrados en el alojamiento y tráfico celular. Zhu *et al.* (2006) estudiaron la interacción entre CD44 y el ácido hialurónico de la matriz extracelular en relación a la migración de las células madre mesenquimales. En este trabajo, concluyeron que las células madre mesenquimales fueron activadas por PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) para incrementar la expresión de CD44 y que la adhesión y migración celulares fueron dependientes de la interacción de CD44 y el ácido hialurónico. Tanto la adhesión como la migración celulares pudieron ser bloqueadas ya sea por un anticuerpo anti-CD44 como por un RNA de interferencia específico de CD44.

Además de la expresión de los antígenos de superficie anteriores, la ISCT (Dominici *et al.*, 2006) recomendó que la ausencia de expresión de antígenos hematopoyéticos sea usado como criterio adicional para excluir a las células más comúnmente encontradas en los cultivos de MSCs. Con este fin, propuso a CD45 que es un marcador panleucocitos; a CD34 que marca a progenitores hematopoyéticos primitivos y células endoteliales; a CD14 y CD11b que son expresados preferencialmente en monocitos y macrófagos; y a CD79 α y CD19 que son marcadores de células B.

1.1.6. FUENTES DE OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

La presencia de las MSCs fue descrita por primera vez en la médula ósea y, aunque es la fuente más estudiada, no es la que ofrece la mayor abundancia en relación a este tipo celular en particular. Pittenger *et al.* (1999) demostraron que solamente el 0.01% al 0.001% de las células mononucleares aisladas de la médula ósea mediante un gradiente de densidad (Percoll/Ficoll) dan lugar a colonias con capacidad adherente al plástico. El número de MSCs aisladas de este tejido puede variar en función del rendimiento de la estrategia de aislamiento, incluso cuando las células se obtienen de la misma donante (Phinney *et al.*, 1999). La abundancia de MSCs disminuye con la edad, encontrándose el mayor número en los recién nacidos y los valores se van reduciendo durante la vida hasta llegar a un 50% a la edad de 80 años (Fibbe *et al.*, 2003).

Hoy en día se sabe que además de la médula ósea, las MSCs se encuentran en otros tejidos del cuerpo humano. Hay un creciente número de reportes que describen su presencia en el tejido adiposo (Gronthos *et al.*, 2001), la sangre del cordón umbilical (Kögler *et al.*, 2004), vellosidades coriónicas de la placenta (Igura *et al.*, 2004), el líquido amniótico (Tsai *et al.*, 2004), sangre periférica (Zvaifler *et al.*, 2000), el hígado fetal (Campagnoli *et al.*, 2001), pulmón (in't Anker *et al.*, 2003) e incluso en dientes deciduos (Miura *et al.*, 2003) (fig. 4).

En cuanto a las MSCs presentes en la circulación fetal, el número más alto se detecta durante el primer trimestre y disminuye durante el segundo trimestre hasta alcanzar un 0.0001%. Por otro lado, las células nucleadas presentes en la sangre de cordón umbilical comprenden un 0.00003% de la celularidad total (Campagnoli *et al.*, 2001).

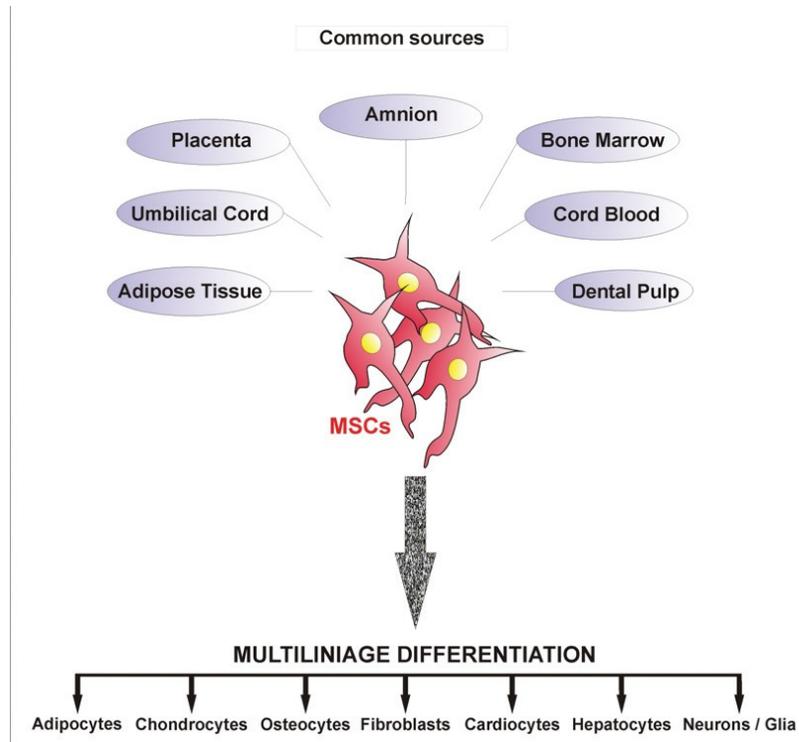


Fig. 4 Fuentes más comunes de células madre mesenquimales. Tomado de: Zeidán-Chuliá *et al.*, 2009.

Zuk *et al.*, en 2002 aislaron e identificaron una población de células madre procedentes de tejido adiposo mediante un método menos invasivo y en mayores cantidades que para el caso de la médula ósea. Esta población de MSCs, denominada células de lipoaspirado procesado, fue aislada de liposucciones cosméticas y mostraron capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico, adipogénico, miogénico, condrogénico y neurogénico.

Kern *et al.* (2006) realizaron un análisis comparativo de MSCs aisladas de tres fuentes expandidas en cultivo *in vitro* con respecto a su morfología, frecuencia de colonias, potencial de expansión, capacidad de diferenciación a multilíneas, inmunofenotipo y tasa de éxito en el aislamiento celular. Las células aisladas de médula ósea, tejido adiposo y sangre de cordón umbilical mostraron características típicas de las MSCs, es decir, morfología fibroblastoide, la observación de unidades formadoras de colonias fibroblastoides, capacidad de

diferenciación multipotencial y la expresión de un típico grupo de proteínas de superficie. Independientemente del origen, las MSCs no mostraron diferencias significativas con respecto a la morfología e inmunofenotipo. En este estudio, los autores observaron diferencias entre las tres fuentes analizadas con respecto a la tasa de éxito en el aislamiento, siendo de 100% para el caso de la médula ósea y el tejido adiposo y del 63% para la sangre de cordón umbilical. Adicionalmente, demostraron la capacidad de diferenciación hacia tres linajes mesodérmicos de las MSCs procedentes del tejido adiposo y la médula ósea, mientras que las MSCs de sangre de cordón umbilical fueron diferenciadas a los linajes condrogénico y osteogénico, pero no así hacia el linaje adipogénico.

Las investigaciones de Kern *et al.* (2006) se limitaron a la capacidad de diferenciación hacia mesodermo, por lo que el potencial de diferenciación de las MSCs se vio restringido al linaje celular correspondiente a su origen embrionario. Sin embargo, existen distintos estudios que avalan la capacidad de las MSCs de diferenciarse en tipos celulares de capas embrionarias distintas. Estudios tales como el de Kögler *et al.* (2004) han mostrado un espectro de diferenciación más amplio de las MSCs. Estos autores aislaron a una población de células madre pluripotentes a partir de sangre de cordón humano a la cual denominaron células madre somáticas ilimitadas (USSCs por sus siglas en inglés “unrestricted somatic stem cells”) y lograron demostrar su capacidad de diferenciación altamente homogénea *in vitro* hacia osteoblastos, condroblastos, adipocitos, células hematopoyéticas y células neurales incluyendo astrocitos y neuronas. Es importante señalar que una de las aportaciones más importantes de este modelo de células madre fue la obtención de resultados bastantes homogéneos en los ensayos de diferenciación y la demostración de pluripotencialidad de las MSCs.

Adicionalmente, el grupo de Kögler (2004) documentó la diferenciación *in vivo* hacia hueso, cartílago, células hematopoyéticas, tejido neural, hepático y de corazón en varios modelos animales. Sin embargo, como mostraron, la diferenciación neuronal *in vitro* derivó solamente en un fenotipo precursor, lo cual podría explicarse por la carencia del microambiente apropiado de citocinas

especiales y/o señales moleculares que no están presentes en los sistema de cultivo *in vitro*.

En el año 2007, Anjos-Afonso *et al.* reportaron la identificación, aislamiento y caracterización de una población de células mesenquimales más primitiva obtenida de la médula ósea de murino adulto con base en la expresión del antígeno embrionario específico de estadio-1 (SSEA-1). La población SSEA-1+ mostró tener un potencial extenso de diferenciación, formando *in vitro* células tipo hepatocito, astrocito y endotelial. Estos autores obtuvieron una población derivada de una sola célula que fue capaz de diferenciarse abundantemente en diferentes tipos celulares mesenquimales *in vivo*.

Los trabajos descritos en los párrafos anteriores muestran que las MSCs poseen la capacidad de diferenciarse en células especializadas distintas a las células que se encuentran en el tejido en el que normalmente residen. Esta cualidad recibe el nombre de plasticidad (Ruiz *et al.*, 2008).

1.1.7. MEMBRANA AMNIÓTICA A TÉRMINO COMO FUENTE DE CÉLULAS MADRE

La membrana amniótica a término es una fuente atractiva de células madre mesenquimales debido al hecho que este tejido fetal es generalmente desechado sin conflictos éticos. Además se logra una alta eficiencia de recuperación de células madre mediante procedimientos no invasivos con alto potencial de expansión *in vitro* y capacidad de autorrenovación (Alviano *et al.*, 2007).

La placenta humana es un órgano con una porción fetal y una materna (fig. 5). Tanto el amnios como el corion son de origen fetal y las diferentes regiones de la decidua son de origen materno.

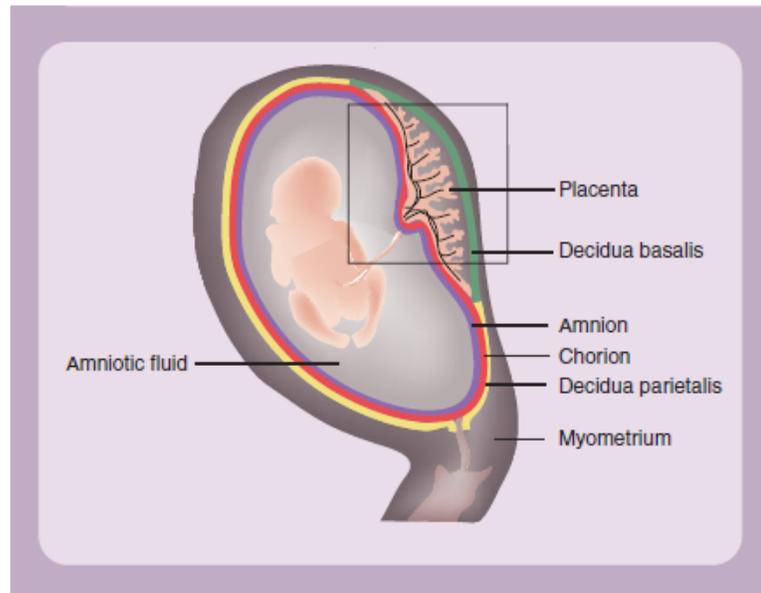


Fig. 5 Dibujo esquemático de la placenta humana que muestra el amnios (parte fetal), decidua basal y decidua parietal (parte materna). Tomado de: Pappa *et al.*, 2009.

Las dos membranas fetales, el amnios y el corion, delimitan el exterior de la superficie basal de la placenta y recubren el líquido amniótico en el cual el feto está suspendido durante el embarazo. Como la placenta, las membranas fetales facilitan el intercambio de gas y desechos y juegan un papel crítico como barreras de defensa así como el mantenimiento del embarazo y parto.

El amnios o membrana amniótica está compuesta de una monocapa epitelial que descansa sobre una gruesa membrana basal compuesta de colágena y una capa de fibroblastos bajo la membrana basal (fig. 6). El corion liso o membrana coriónica consiste de varias capas de trofoblastos indiferenciados y capas estromales. Como el amnios, las capas estromales del corion se originan del mesodermo extraembrionario. Para aislar las células del amnios o del corion a término, las dos membranas son separadas por medios mecánicos (Ilancheran *et al.*, 2009). La lámina de elastina presente en el tejido conectivo laxo del amnios y adyacente al corion, facilita la separación de las membranas.

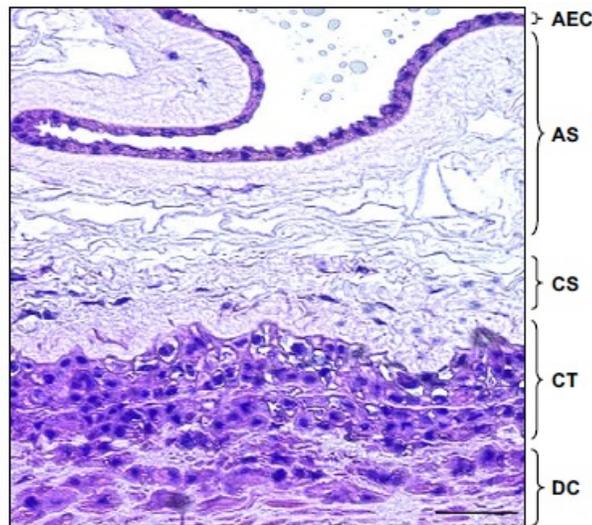


Fig. 6 Sección de membrana fetal a término humana. Tinción con hematoxilina y eosina. El amnios consta de una sola capa de células epiteliales amnióticas (AEC) y una capa estromal (AS). El corion está compuesto de capas estromales (CS) y células de trofoblasto (CT). Las células de la decidua materna (DC) adherentes al corion también pueden observarse. Barra de escala = 50 μ m. Tomado de: Ilancheran *et al.*, 2009.

Típicamente, las células estromales amnióticas humanas son obtenidas después de completa eliminación de la capa epitelial usando tripsina seguido por digestión en colagenasa. La decidua materna adherida al corion es eliminada mecánicamente y las capas de trofoblastos son digeridos con dispasa. Las capas reticulares son subsecuentemente digeridas con colagenasa para liberar las células estromales coriónicas humanas (Ilancheran *et al.*, 2009).

Durante el Primer Taller Internacional sobre células madre derivadas de placenta (First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells) realizado en Italia en marzo de 2007 (Parolini *et al.*, 2008) se acordó denominar a las células mesenquimales aisladas de membranas fetales como “células mesenquimales estromales amnióticas humanas” y “células mesenquimales estromales coriónicas de humano” en concordancia con los criterios propuestos por la ISCT para células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006).

Una característica importante que hace a las células madre derivadas de placenta atractivas para su potencial uso en Terapia Celular y Medicina Regenerativa es su baja antigenicidad. Las células estromales procedentes del amnios y del corion, así como las células epiteliales amnióticas carecen o muestran muy baja expresión de los antígenos de HLA clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y prácticamente son negativos para HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR (Ilancheran *et al.*, 2009).

1.1.8. APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE

Hoy en día no se cuenta con la disponibilidad de tratamientos eficaces para muchas enfermedades degenerativas ocasionadas por la muerte o el mal funcionamiento de células especializadas. En algunos casos, el trasplante de órganos constituye una estrategia terapéutica adecuada para restaurar la función de los órganos o tejidos dañados. Sin embargo, esta estrategia presenta inconvenientes relacionados con la falta de disponibilidad de órganos y con problemas de incompatibilidad que pueden dar lugar a rechazo. Ante esta problemática surgen la Medicina Regenerativa y la Terapia Celular como alternativas terapéuticas promisorias para el tratamiento de este tipo de enfermedades degenerativas.

La Terapia Celular se ha definido como “El trasplante de células vivas a un organismo con el propósito de reparar un tejido o funciones perdidas”. A su vez, la Medicina Regenerativa se ha definido como “un área multidisciplinaria emergente que busca el mantenimiento, la mejora o la restauración de la función de células, tejidos y órganos, mediante la aplicación de métodos relacionados principalmente con la Terapia Celular y la Ingeniería Tisular” (Ruiz *et al.*, 2008).

Las células madre se han utilizado en Terapia Celular y Medicina Regenerativa como agentes terapéuticos gracias a su capacidad para diferenciarse en células

específicas necesarias para la reparación de grupos de células o de tejidos que han sufrido algún daño.

Actualmente, se utilizan diversas estrategias para la aplicación de estas células: a) implantación directa de células troncales para la construcción de nuevas estructura, b) implantación de células troncales preinducidas para que sigan una línea de diferenciación concreta y c) estimulación de células endógenas para que ellas mismas puedan sustituir las estructuras dañadas (Brockes *et al.*, 2005).

El primer caso consiste en la administración directa de células madre al paciente de tal manera que estas colonicen el punto adecuado del cuerpo y se logren diferenciar continuamente en el tipo celular deseado.

El segundo caso se trata de trasplante de células, tejido u órganos procedentes del cultivo de células diferenciadas derivadas de células troncales. Las células troncales pueden ser cultivadas y dirigidas hacia la diferenciación en determinados tipos celulares en el laboratorio para posteriormente ser trasplantadas, por ejemplo, células musculares cardíacas para tratar insuficiencias cardíacas, neuronas productoras de dopamina para el tratamiento de la enfermedad del Parkinson, etc. Las fuentes para cada tipo celular diferenciado pueden ser células madre embrionarias o adultas, incluidas las propias células del paciente.

El tercer caso corresponde al estímulo de células madre endógenas mediante factores. Este abordaje terapéutico se basa en la posibilidad de inducir la autorreparación de tejidos u órganos dañados estimulando la población de células madre propias de un individuo, mediante la administración, por ejemplo, de factores de crecimiento, citocinas, receptores y segundos mensajeros. Estas moléculas poseen la capacidad de generar eventos regenerativos en las células, es decir, regulan el crecimiento de la célula. El objetivo de la investigación en este campo es llegar a conseguir que la sola administración de estos factores sea

capaz de inducir la expresión génica de las células en los tejidos (Ruiz *et al.*, 2008).

Dentro del grupo de enfermedades con posibilidad de desarrollar tratamientos basados en el uso de células madre, se encuentran patologías que afectan a un gran número de personas como son:

a) las enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentran el Parkinson, la esclerosis múltiple, el Alzheimer, infartos cerebrales o lesiones medulares,

b) enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular como el infarto agudo de miocardio, la isquemia y el fallo cardíaco,

c) diabetes,

d) regeneración de heridas por lesiones, quemaduras, accidentes, exposición a agentes químicos, procesos quirúrgicos o diversas patologías que producen la formación de úlceras cutáneas,

e) regeneración de cartílago y hueso. Algunas fracturas que por diferentes motivos no consiguen consolidarse llevando al desarrollo de pseudoartrosis.

1.1.8.1 APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PARA LA SUSTITUCIÓN Y REGENERACIÓN ÓSEA

Actualmente los implantes de hueso tienen una alta demanda por parte de ortopedistas, neurocirujanos, cirujanos plásticos, ortodoncistas, entre otros. El 13 de diciembre de 2000 se presentó la primera donación de hueso en México. Desde entonces el Banco de Huesos y Tejido ha conseguido 64 donadores, uno en 2000, 12 en 2001, 31 en 2002 y 20 en 2003; sin embargo, México requiere 20 mil injertos de hueso cada año, necesidad que generalmente se cubre importando

material de Estados Unidos, a través de placas metálicas o plásticas o tomando hueso del mismo paciente, a causa de la falta de donantes en el país.

La aplicación de injertos óseos no se ve restringida al tratamiento de traumatismos, sino que en los niños que presentan labio y paladar hendido, además del uso de aparatología ortopédica, se recomiendan procedimientos combinados de cirugía ortognática, elongación tisular y reconstrucción maxilar con uso de injertos óseos.

La actuación terapéutica en los campos de la Traumatología y Ortopedia, Cirugía Oral y Maxilofacial e Implantología, se asienta sobre los principios biológicos de la regeneración ósea, en los que están implicadas células, matriz extracelular y señales osteoinductivas.

Las estrategias actuales para reparar el hueso incluyen el uso de autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, las cuales son terapias con muchas limitaciones, debido a problemas como fuentes limitadas de obtención de hueso, morbilidad de los sitios donadores, problemas de rechazo del injerto y transmisión de enfermedades. Como alternativa de solución a estos problemas, surge la Ingeniería de Tejidos, que se define como una ciencia interdisciplinaria donde se aplican principios de ingeniería y las ciencias de la vida para crear sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido u órgano que ha sido afectado (Langer *et al.*, 1993).

El éxito de la Ingeniería de Tejidos óseos depende, por un lado, del desarrollo de matrices porosas que proporcionen el soporte necesario a las células para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas. Por otro lado, el componente celular ideal para esta aplicación debe ser obtenido mediante estrategias de aislamiento sencillas, contar con la capacidad de ser expandidas *in vitro*, y aún más importante, alcanzar la diferenciación y maduración osteoblástica de manera robusta y eficaz.

1.1.8.1.1. Tejido óseo

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado y altamente vascularizado que continuamente se está remodelando en el transcurrir de la vida del ser humano (Poirier *et al.*, 2002). Este tejido juega un papel importante en la locomoción, además de que el esqueleto posee una adecuada capacidad para soportar carga y actuar como protector de los órganos del cuerpo (Rouvière *et al.*, 2005).

El hueso es un material constituido por una variedad de tipos celulares y una matriz orgánica que están fuertemente asociados a una matriz de minerales de calcio hidratados (principalmente fosfatos de calcio en forma de hidroxiapatita). La matriz orgánica consiste principalmente de colágena (alrededor del 95%); los componentes orgánicos restantes (5%) son proteoglicanos y proteínas no colagenosas (Meyer *et al.*, 2006; Hollinger *et al.*, 2005).

Al igual que todos los órganos del cuerpo, el hueso tiene una organización jerárquica que abarca órdenes de magnitud de escala macro (centímetro) hasta componentes nanoestructurados (matriz extracelular) (fig. 7). Como muchos materiales compuestos, la integración de los minerales en la matriz orgánica permite al hueso poseer mejores propiedades mecánicas en comparación con las propiedades de sus componentes puros, es decir el uso de los minerales (material frágil) o la matriz orgánica (material elástico) por separado (Hollinger *et al.*, 2005). En adición a sus funciones estructurales, el hueso está íntimamente involucrado en la homeostasis a través del almacenaje de iones de calcio y fósforo y la regulación de electrolitos en la sangre.

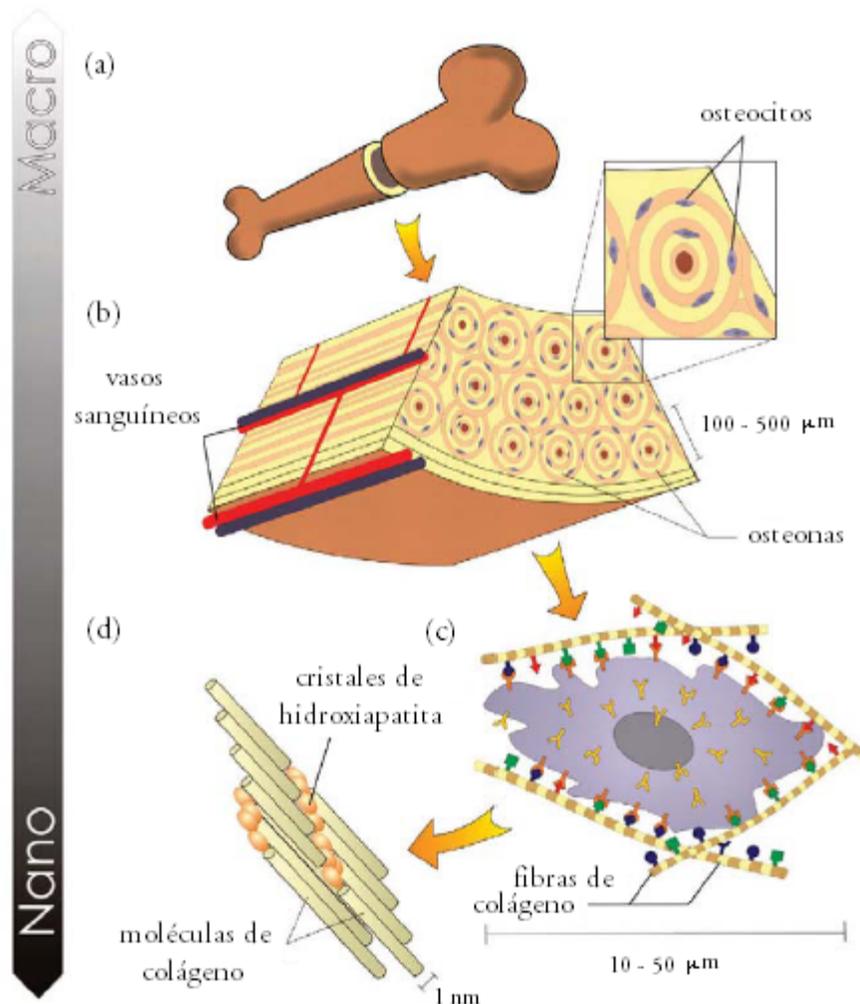


Fig. 7 Organización jerárquica del hueso a diferentes escalas. (a) Capa compacta calcificada en la zona exterior del hueso, (b) sistema de harvest u osteonas en la capa externa, (c) célula rodeada de receptores de membrana celular y (d) nanoarquitectura de la matriz extracelular. Tomado de: Stevens, 2008.

1.1.8.1.2. Células óseas

El hueso está formado por dos tipos de linajes celulares: 1) Células a partir de un linaje osteoblástico, incluyendo osteoprogenitores, preosteoblastos, células de revestimiento óseo y osteocitos y 2) osteoclastos. En la figura 8 se muestran los diferentes tipos de células encontradas en el tejido óseo.

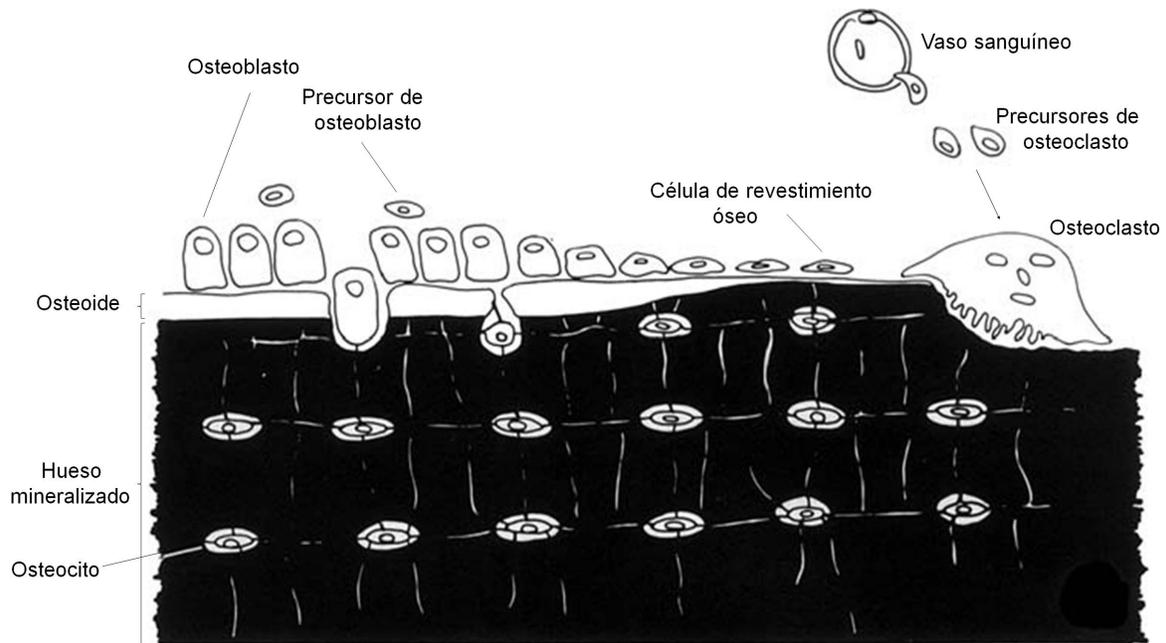


Fig. 8 Tipos de células presentes en el tejido óseo. Tomado y modificado de: Grol *et al.*, 2009, quien realizó una adaptación de Marks *et al.*, 1988.

El osteoblasto es la célula encargada de la síntesis de la matriz extracelular del tejido óseo. Al estar en actividad presenta polaridad y morfología cúbica. Cada osteoblasto posee muy desarrollado su retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi, lo cual es característico en las células que producen grandes cantidades de proteínas. La colágena tipo I es la principal proteína segregada por parte de los osteoblastos, sustancia esencial para la posterior mineralización de la hidroxiapatita. También sintetiza proteínas no colágenas, como los glicosaminoglicanos, la osteocalcina, la osteopontina, la sialoproteína ósea, las cuales interaccionan con las integrinas. Los osteoblastos son responsables de la regulación de calcio y de fósforo, mecanismo primordial para el depósito de los cristales de hidroxiapatita. Eventualmente, la actividad sintética de las células disminuye y estas quedan embebidas en la matriz formada y son llamadas osteocitos (Stevens, 2008).

Los osteoblastos se derivan de células mesenquimales (células madre de la médula ósea y células madre del tejido conjuntivo). Estas células se pueden

diferenciar en varias estirpes celulares en función de los mediadores o reguladores de la transcripción a los que son sometidos. Así, una célula madre pluripotente puede terminar diferenciándose en un osteoblasto, un adipocito, un condroblasto, un mioblasto o un fibroblasto. Los osteoblastos siempre revisten la capa de la matriz ósea que producen antes de calcificarse, momento en el que se denominan osteoide. Dicho tejido es producido en la formación de la matriz y el proceso de calcificación.

El osteocito, osteoblasto diferenciado, es la célula ósea madura en mayor abundancia en el cuerpo, en relación 10:1 con respecto a los osteoblastos. Se encuentra rodeado por la matriz ósea y su morfología es plana. A su vez establecen conexiones entre ellos, garantizando la impermeabilidad de la matriz mientras se produce la mineralización del osteoide. Los osteocitos pasan por varias fases de maduración hasta quedar completamente embebidos en la matriz ósea y se mantienen en un estado de aparente reposo. Son los responsables del mantenimiento de la matriz controlando la concentración de fosfatos y calcio y son directamente estimulados por calcitonina e inhibidos por la hormona paratiroidea. Poseen la capacidad de sintetizar y resorber la matriz de manera limitada. Estas actividades contribuyen a la homeostasis de la calcemia. Finalmente, en la fase degenerativa, caracterizada por picnosis y fragmentación del núcleo de los osteocitos, se produce apoptosis. Es importante el recambio óseo, aunque si es masivo puede ser perjudicial para la estructura ósea.

El osteoclasto es una célula polinucleada de gran tamaño cuya función principal es la resorción del tejido óseo. En actividad, el osteoclasto se localiza en la superficie ósea donde se produce la resorción; como producto de su actividad se forma una excavación poco profunda denominada laguna de resorción o lagunas de Howship. Los osteoclastos reabsorben las trabéculas y van formando tejido óseo a manera de laminillas (Meyer *et al.*, 2006).

1.1.9. INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA IN VITRO MEDIADA POR DEXAMETASONA

Las hormonas esteroides participan activamente en el metabolismo óseo y tienen regulación multifuncional en muchos tipos de células incluyendo médula ósea (Hong *et al.*, 2009). Por ejemplo, los glucocorticoides (GC) juegan un papel clave en las múltiples diferenciaciones de las MSCs y sobrerregulan el potencial de diferenciación osteogénico, condrogénico y adipogénico.

Los GC son hormonas esteroides secretadas por la corteza adrenal que juegan un papel pivotal en la regulación de una variedad de funciones del desarrollo, metabólicas e inmunes. El mecanismo clásico de la acción de los GC es primariamente a nivel de transcripción, donde la hormona forma un complejo transcripcionalmente activo con su receptor intracelular cognado. Este complejo puede, ya sea, incrementar o aumentar la expresión de genes enlazándose a elementos de respuesta a GC en la región promotora de los genes blanco o por asociación no covalente con proteínas correguladoras adicionales (Brann *et al.*, 1995).

La dexametasona (Dex), un derivado sintético de los glucocorticoides tiene efectos complejos de estimulación e inhibición sobre el metabolismo esquelético y la formación ósea. Dex es ampliamente utilizada a dosis farmacológicas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Sin embargo, la administración por períodos prolongados de esta hormona tiene efectos secundarios adversos sobre el esqueleto, induciendo osteoporosis afectando la actividad osteoblástica. Los mecanismos celulares y moleculares por los cuales las dosis farmacológicas de Dex inducen pérdida de hueso incluyen: 1) proliferación atenuada del osteoblasto, 2) síntesis de colágena reducida, 3) apoptosis incrementada del osteoblasto, 4) inhibición de los factores de crecimiento osteogénicos.

Trabajando con células estromales de médula ósea de humano, Cheng observó que concentraciones de 10 nM y 100 nM de Dex promueven la

diferenciación osteogénica *in vitro* (Cheng *et al.*, 1994). En estos ensayos, la diferenciación inducida por Dex fue aparente después de 2 a 3 días de tratamiento y alcanzó un máximo entre los 7 y 14 días a juzgar por la actividad de fosfatasa alcalina.

Diversos grupos de investigación han utilizado Dex como inductor de la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales provenientes de placenta (Alviano *et al.*, 2007; Soncini *et al.*, 2007; in't Anker *et al.*, 2004; Portmann-Lanz *et al.*, 2006).

Dex tiene efectos diferenciales sobre la expresión del transcrito de Runx2, sus niveles de proteína y su actividad de unión al DNA dependiendo de la especie, del tipo celular osteogénico y de las condiciones de cultivo usado para estudiar esta hormona *in vitro*.

Runx2 (también conocido como Cbfa1, Osf2, AML3 y PEBP2 α A) es un regulador transcripcional esencial de la diferenciación del osteoblasto y la formación de hueso. La delección homocigota de Runx2 detiene la maduración del osteoblasto, resultando en la ausencia de osificación endocondral e intramembranosa (Komori *et al.*, 1997).

Runx2 dirige la diferenciación osteogénica mediante la unión a un elemento de acción en *cis* específico del osteoblasto, denominado OSE2, sobre la región promotora de los genes esqueléticos blanco.

Phillips *et al.* (2006) demostraron que Dex induce osteogénesis, al menos en parte, por modulación del estado de fosforilación de un residuo de serina (Ser125) sobre la isoforma de Runx2 tipo II mediante regulación negativa. Estos autores demostraron que el estado de fosforilación de este específico residuo de serina juega un papel crucial tanto en la diferenciación osteoblástica temprana como en la inducción de la mineralización de la etapa tardía (Phillips *et al.*, 2006). Adicionalmente, mostraron que la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) fosforila Runx2 en residuos dentro del dominio carboxilo terminal rico en

prolina-serina-treonina y que la disminución inducida por Dex en la fosforilación de Runx2 correlaciona con la sobrerregulación de MKP-1 (fosfatasa-1 de la vía de señalización de MAPK) a través de un mecanismo dependiente del receptor de GC.

1.2. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los marcadores de superficie han sido insuficientes como un medio para identificar a las células madre debido a que los marcadores candidatos pueden encontrarse también en células que no son troncales, o bien, un marcador particular puede ser expresado únicamente en una célula madre en un cierto estado o bajo ciertas condiciones, como ocurre con CD34 en las MSCs hematopoyéticas. Sin embargo, los marcadores de superficie u otros atributos son útiles en la caracterización de las células madre, ya sea aisladas o cultivadas, y como un medio para comenzar a comprender sus interacciones potenciales con las células vecinas y el ambiente celular. Se han propuesto un gran número de moléculas de superficie en las MSCs y, aunque es extenso, aún es insuficiente. Por otra parte, se han observado algunas variaciones en las moléculas de superficie en las MSCs de un laboratorio a otro y sería necesario trabajo extra para entender si estas diferencias representan poblaciones separadas de células madre, técnicas de cultivo diferentes, o bien si estas variaciones son debidas a los diversos métodos de análisis. Es por esta razón que nos propusimos realizar la separación de una subpoblación celular procedente de la membrana amniótica de humano que, como una aportación valiosa, tuviera la particularidad de ser seleccionada utilizando triple marcaje con anticuerpos dirigidos contra los antígenos CD73, CD44 y CD105 de tal manera que, a nivel de células individuales, la subpoblación coexpresara estos marcadores y mostrara características fenotípicas acordes a los lineamientos establecidos por la ISCT.

Capítulo II

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar una subpoblación de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ obtenidas a partir de la membrana amniótica humana

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar mediante procedimientos enzimáticos a una población celular capaz de adherirse a las placas de cultivo.
- Seleccionar mediante citometría de flujo aquella subpoblación celular que coexpresen en su superficie a los marcadores CD73, CD44 y CD105.
- Analizar mediante citometría de flujo el inmunofenotipo de la(s) subpoblación(es) seleccionada(s).
- Estudiar, en la(s) subpoblación(es) seleccionada(s), la expresión y coexpresión de los factores de transcripción OCT3/4, SOX2 y NANOG mediante RT-PCR e inmunofluorescencia indirecta
- Evaluar, en la(s) subpoblación(es) seleccionada(s), la capacidad para diferenciarse hacia el linaje osteoblástico mediante la inducción con dexametasona.

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PROCESO DE ELECCIÓN Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PLACENTA

Este estudio se realizó con placentas donadas por mujeres embarazadas que acuden al servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Para la elección de las pacientes candidatas para la donación se tomaron en cuenta los siguientes criterios de selección: se incluyeron placentas provenientes de mujeres embarazadas que tras valoración de la historia obstétrica en el momento de la llegada a la maternidad, esta se considere normal y con los controles serológicos de rutina efectuados durante el embarazo con resultado negativo (HBsAg, HCV y HIV como mínimo). Así mismo, se excluyeron del estudio: placentas provenientes de una gestación inferior a 32 semanas, en las que existió ruptura de la membrana de 12 a más horas antes del parto, placentas de mujeres que presentaron fiebre superior a 38°C, aquellas que provenían de gestaciones con inmunización feto-materna, en las que se detectó sufrimiento fetal y finalmente aquellas placentas que provenían de mujeres con alguna patología adicional (preeclampsia, diabetes, hipertensas). Con estos criterios nos aseguramos de no interferir en embarazos y/o partos de alto riesgo y por otro lado de eliminar placentas con evidencias de procesos infecciosos. Una vez que se seleccionaron las pacientes, se les informó acerca del uso que se le daría a la placenta y en caso de aceptar participar, se les invitó a firmar una carta de consentimiento informado. Luego del alumbramiento se tomó toda la placenta y se

envió al departamento de Biología Molecular para proceder a la obtención de la membrana amniótica bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

3.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ESTROMALES A PARTIR DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA DE HUMANO

3.2.1. Aislamiento celular primario mediante una doble digestión enzimática

Las placentas (núm. = 10) fueron procesadas inmediatamente después del procedimiento de cesárea o bien dentro de la primera hora posterior al alumbramiento.

La membrana amniótica fue separada mecánicamente del corion subyacente por desprendimiento utilizando pinzas y tijeras previamente esterilizadas. Se tomó la membrana de la zona proximal al cordón umbilical teniendo cuidado de no cortar los vasos sanguíneos. Aproximadamente se trabajó con una superficie de 50 cm² equivalente a 5 g de tejido. Dentro de una campana de flujo laminar se lavó la membrana amniótica varias veces con PBS (solución salina amortiguada de fosfatos) estéril a fin de eliminar rastros de sangre. Se realizaron cortes finos del tejido utilizando un bisturí estéril. Los fragmentos de membrana resultantes fueron sometidos a tratamiento por digestión enzimática en dos pasos secuenciales:

a) incubación con una solución de tripsina al 0.125% conteniendo EDTA 0.5 mM (ICN Biomedicals, tripsina 0.25% diluido con PBS estéril) a 37°C durante 30 min con objeto de eliminar las células amnióticas epiteliales. La incubación se realizó en un horno de hibridación con rotación constante.

b) tratamiento con colagenasa tipo II (GIBCO) 100 unidades /ml preparada en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) a pH 5.6 conteniendo

cloruro de calcio 3 mM para incrementar la eficiencia de disociación. La incubación se realizó a 37°C durante 1.5 a 2 h con agitación constante.

Posteriormente, la suspensión celular se diluyó con PBS, se filtró para eliminar trozos de tejido no digerido y se centrifugó a 1,000 rpm (200 x g) durante 10 min a 4°C. El paquete celular se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente.

3.2.2. Cultivo primario y selección de la población celular adherente

El paquete celular obtenido después de la centrifugación se resuspendió en 5 ml de medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, previamente inactivado a 56°C durante 20 minutos), L-glutamina 2 mM y una mezcla de penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml (GIBCO). Las células se cultivaron en botellas de plástico (Falcon, Becton Dickinson) de 25 cm² a 37°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. Las células no adherentes fueron eliminadas después de un período de cultivo de entre 5 y 7 días mediante cambios de medio cada tercer día. Cuando los cultivos alcanzaron un 90% de confluencia, las células fueron despegadas de las botellas de cultivo por digestión con tripsina 0.125%/EDTA 0.5 mM durante 5 min a 37°C y subcultivadas para expansión y subsecuentes análisis. Este primer paso de subcultivo se consideró como pase número 1 y un nuevo proceso de digestión con tripsina correspondió a pase 2 y así sucesivamente.

3.2.3. Inmunofenotipificación mediante citometría de flujo de la población celular adherente con marcadores de superficie CD44, CD73 y CD105

3.2.3.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología que simultáneamente permite medir y analizar múltiples características físicas y químicas de partículas individuales, generalmente células, mientras están suspendidas en líquido y pasan alineadas

de una en una produciendo una señal al interferir con un haz de luz. Estas mediciones son realizadas mientras las células pasan en fila, a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo, a través del aparato de medida en flujo laminar. Es esencial disponer de una suspensión de células o partículas individuales, de modo que la dificultad para obtenerla es un factor limitante para el empleo de la técnica, lo cual se complica si se desea trabajar con células vivas. Las células o partículas son marcadas con colorantes fluorescentes que son capaces de excitarse con una fuente luminosa de alta energía.

El citómetro de flujo necesita un sistema combinado de:

- Fluidos, para introducir y restringir las células para análisis.
- Óptica, una fuente de excitación y un sistema colección para generar y recoger las señales luminosas. El sistema de excitación consiste en un láser, lentes y prismas para dirigir el rayo. El sistema de colección consiste en espejos ópticos y filtros para encaminar determinadas longitudes de onda hacia detectores ópticos determinados.
- Electrónica, para convertir las señales ópticas en señales electrónicas proporcionales y digitalizarlas para análisis computacional.

Un fluorocromo es una molécula química que absorbe la luz a una determinada longitud de onda (energía de excitación) y emite a una longitud superior (menor energía). Interacciona con la luz de excitación procedente del láser. Se utiliza unido a anticuerpos específicos para antígenos de la célula. La cantidad de fluorescencia que emite una célula es proporcional a la cantidad de sitios de unión que tenga el anticuerpo. Existen en la actualidad diferentes marcadores de fluorescencia los cuales difieren entre ellos debido a su unión a la célula.

- Marcadores fluorescentes de unión covalente: son fluorocromos que reaccionan y se usan para marcar proteínas, lípidos, o bien otras moléculas biológicas. Deben ser suficientemente selectivos y reactivos. Se emplean

cromóforos con grupos isotiocianato, clorotrizinil y ésteres de succinimida, por su capacidad de unión. Entre los fluorocromos más empleados se encuentran la fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, Texas red, cianinas (láseres diodos), etc. La ficoeritrina (ficobiliproteína) ha tenido una gran aceptación por su gran absorción, rendimiento y fotoestabilidad; además se puede excitar a 488 nm pero emite más allá del espectro de la fluoresceína permitiendo el doble análisis con un solo láser. La capacidad para detectar simultáneamente la fluorescencia de dos, tres, cuatro o, actualmente, hasta 17 fluorocromos de diferentes longitudes de onda, abre ampliamente el campo del análisis multiparamétrico (Perfetto *et al.*, 2004).

- Marcadores fluorescentes de unión no covalente: son fluorocromos que debido a su especial composición molecular se unen a determinados componentes celulares. Entre estos se pueden mencionar el Hoechst 33342 (unión a A-T, vital), DAPI (A-T), DIPI (A-T), cromomicina A3 (unión a G-C), olivomicina (G-C) y mitramicina (G-C).

El objetivo del análisis por inmunofluorescencia en citometría de flujo es asignar cada célula a un grupo celular específico que compartan propiedades comunes. El primer paso es identificar las células de interés distinguiéndolas por sus propiedades de dispersión de luz (tamaño vs complejidad celular). Una vez que las células de interés han sido distinguidas de los otros tipos celulares, se puede usar la inmunofluorescencia para determinar la proporción o el número de células que poseen un determinado marcador.

3.2.3.2. Titulación de los anticuerpos utilizados para la separación celular

Para el análisis por citometría de flujo de los diferentes marcadores de superficie abordados durante este trabajo, se utilizaron los anticuerpos que se enlistan en la tabla 1. Es importante señalar que cada uno de ellos estuvo sujeto a estandarización.

Tabla 1. Descripción de reactivos fluorescentes. Parte 1

Analito	Detector	Fluorocromo	Fabricante	Catálogo	Lote	Clona
CD44	Anti-CD44 IgG2a, κ	Biotina	Serotec	MCA89B		F10-44-2
CD73	Anti-CD73 IgG1, κ	PE	BD Biosciences	550257	32110	AD2
CD105	Anti-CD105 IgG1, κ	APC	BioLegend	323208	B114609	43A3
HLA-DR	Anti-HLA-DR IgG2a, κ	PerCP-Cy5.5	BioLegend	307629	B113534	L243
Biotina	Estreptavidina	PerCP-Cy5.5	BioLegend	405214		Estreptavidina
Control	Isotipo IgG2a, κ	PerCP-Cy5.5	BioLegend	400252	B123032	MOPC-173
Control	Isotipo IgG1, κ	PE	BioLegend	400112	B125235	MOPC-21
Control	Isotipo IgG1, κ	APC	BioLegend	400122		MOPC-21

Para esta serie de ensayos, las células adherentes cultivadas en botellas de 25 cm² fueron despegadas por digestión con tripsina 0.125%/EDTA 0.5 mM durante 5 min a 37°C, lavadas con PBS y resuspendidas en solución amortiguadora de tinción (SB, Becton Dickinson Pharmingen). Se realizó el análisis con 20,000 células en 50 µl de SB por cada tubo. Se les adicionaron los volúmenes de cada anticuerpo como se indica en la tabla 2 y, previa agitación suave, se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad. Se lavaron las muestras con 1.2 ml de PBS y se centrifugaron a 2,000 rpm (400 x g), durante 10 min a 4°C. Las células teñidas con el anticuerpo anti-CD44 biotinilado (tubos 9, 10, 11, 12, 17 y 20) se incubaron con 100 µl de estreptavidina marcada con PerCP-Cy5.5 preparada 1:100 en SB. Después de agitación suave, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad. Se lavaron con 1.2 ml de PBS y se centrifugaron a 2,000 rpm (400 x g), durante 10 min a 4°C. Las células teñidas de cada tubo fueron resuspendidas en 250 µl de PBS y analizadas para inmunofluorescencia de tres colores por citometría de flujo (FACSAria, Becton Dickinson). El análisis de datos se realizó usando el software

FlowJo versión 7.2.2 (Tree Star Inc; Ashland, OR). Los controles de isotipo propios de cada anticuerpo se utilizaron para descartar pegado inespecífico.

Tabla 2. Ensayo de titulación de anticuerpos

Tubo	Anticuerpo	Dilución	Volumen (µl)
1	CD73	1:2	10
2	CD73	1:2	5
3	CD73	1:2	2.5
4	CD73	1:2	1.25
5	CD105	1:2	10
6	CD105	1:2	5
7	CD105	1:2	2.5
8	CD105	1:2	1.25
9	CD44	1:4	10
10	CD44	1:4	5
11	CD44	1:4	2.5
12	CD44	1:4	1.25
13	HLA-DR	1:4	10
14	HLA-DR	1:4	5
15	HLA-DR	1:4	2.5
16	HLA-DR	1:4	1.25
17	CD44	1:4	10
18	CD73	1:2	10
19	CD105	1:2	10
20	CD44	1:4	10
	CD73	1:2	10
	CD105	1:2	10
21	Isotipo PerCP-Cy5.5	1:4	10
22	Isotipo PE	1:2	10
23	Isotipo APC	1:2	10
24	Nada		

Los tubos 17, 18 y 19 se utilizaron como controles de compensación. Con los anticuerpos titulados, se procedió a analizar la expresión de los antígenos de superficie CD44, CD73, CD105 y HLA-DR de las células madre mesenquimales procedentes de la membrana amniótica de humano.

3.2.4. Inmunofluorescencia indirecta para el análisis de los factores de transcripción OCT3/4, SOX2 Y NANOG

3.2.4.1. Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia es una técnica que permite la visualización de una proteína específica o antígeno en células o secciones de tejidos mediante el enlace o unión de un anticuerpo específico químicamente conjugado con un colorante fluorescente tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC). Hay dos tipos principales de métodos de tinción inmunofluorescente: a) inmunofluorescencia directa, en la cual el anticuerpo primario es marcado con un colorante fluorescente y b) inmunofluorescencia indirecta, en la cual un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo es usado para reconocer un anticuerpo primario. La tinción inmunofluorescente puede realizarse sobre células fijadas en laminillas y secciones de tejido. Las muestras teñidas para inmunofluorescencia son examinadas bajo un microscopio de fluorescencia o microscopio confocal. En las técnicas de inmunofluorescencia es necesaria la introducción de controles negativos, los cuales permitirán reconocer que la reacción antígeno-anticuerpo ha tenido lugar y que no es producto de unión inespecífica.

3.2.4.2. Inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal de los factores de transcripción OCT3/4, NANOG y SOX2

Para este ensayo, las células fueron sembradas a semiconfluencia (70%) sobre cubreobjetos. A fin de eliminar el medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS y, posteriormente, se realizó un lavado con solución amortiguadora de citoesqueleto (CB: MES 10 mM, NaCl 150 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM, glucosa 5 mM, pH 7). Las células se fijaron con una solución precalentada a 37°C de paraformaldehído (PFA) al 3% en CB durante 15 min a temperatura ambiente. Después de un lavado con PBS, se realizó la permeabilización con una solución de tritón X-100 al 0.05% en PFA/CB durante 5 min. Las preparaciones se trataron con gelatina al 0.5% en PBS durante 20 min a

temperatura ambiente a fin de bloquear los sitios inespecíficos. Después de enjuagar las células con PBS, se procedió a incubación con los anticuerpos policlonales descritos en la tabla 3, durante toda la noche a 4°C. A partir de este paso, las muestras se mantuvieron protegidas de la luz. Después de realizar 3 lavados con PBS, las muestras se cubrieron con el anticuerpo secundario dirigido contra IgG de conejo acoplado a FITC (Zymed) y faloidina-isotiocianato de tetrametilrodamina B (Sigma) a una dilución de 0.5 µg/ml y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS y se eliminó el exceso de este antes de ser montadas sobre un portaobjetos. Para preservar la intensidad de la fluorescencia, se utilizó el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories), el cual está adicionado con DAPI para la contratinción de los núcleos. La tinción con DAPI, que hace evidentes los núcleos, se utilizó con la finalidad de visualizar todas las células presentes (esto correspondía al 100%) y calcular el porcentaje de las células positivas exclusivamente para la tinción con FITC.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia

Anticuerpo	Fuente	Fabricante	Catálogo	Lote	Clona	Dilución de trabajo
OCT3/4	Policlonal Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-25401	C1708	H-65	1:100
NANOG	Policlonal Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-33759	C0909	H-155	1:100
SOX2	Policlonal Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-20088	G1910	H-65	1:100
IgG(H+L) de conejo-FITC	Policlonal Cabra	Zymed	81-6111	60907181		1:90

Las imágenes se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia (Nikon) acoplado al sistema de láser confocal Bio-Rad MRC 600. De cada toma se realizaron una serie de 8-12 cortes en Z.

3.2.5. RT-PCR para el análisis de la expresión de los factores de transcripción OCT3/4 Y NANOG

3.2.5.1. Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) es un método sensible para la detección de niveles de expresión de RNA mensajero. Tradicionalmente, la RT-PCR involucra dos pasos: la reacción de transcripción reversa y la amplificación por PCR. A partir del RNA, el cDNA es sintetizado usando una transcriptasa reversa y el cDNA resultante es utilizado como “template” para la subsecuente amplificación por PCR mediante el uso de oligonucleótidos específicos para uno o más genes.

3.2.5.2. Aislamiento de RNA

Después de lavar con PBS las células en cultivo, se adicionó 1 ml de TRIzol (Invitrogen) por caja de 75 cm², se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para asegurar la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por ml de TRIzol. Se agitó vigorosamente durante 15 s y se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 2 min. Se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min a 4°C para separar las fases. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 0.5 ml de isopropanol. Después de incubar las muestras a -20°C durante toda la noche, se centrifugaron durante 15 min y se realizaron dos lavados con etanol al 75%. Se evaporó el etanol a temperatura ambiente y las pastillas se resuspendieron con agua tratada con dietilpirocarbonato. Para eliminar el DNA genómico contaminante, las muestras fueron tratadas con desoxirribonucleasa I (Invitrogen). La concentración y pureza de los RNA extraídos fueron determinadas por medición espectrofotométrica de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH TM; Biotek Instruments Inc, USA).

3.2.5.3. Transcripción reversa

Los cDNA de cadena sencilla fueron sintetizados con 875 ng de RNA total, 0.5 µg de oligo(dT)15 primer (Promega), 0.5 mM de una mezcla de dNTP's, MgCl₂ 3 mM, 20 U de inhibidor de ribonucleasas (Amresco) y 1 µl de transcriptasa reversa Improm-II (Promega). El volumen final de cada reacción fue de 20 µl y las incubaciones de alineamiento se realizaron a 25°C durante 5 min y de extensión a 55°C durante 1 h. Para verificar la calidad de los cDNA's, estos fueron utilizados para la amplificación de un fragmento del gen "house-keeping" de α-tubulina. El producto de 402 pb fue visualizado en geles de agarosa al 2% en solución amortiguadora Tris-acetato 0.04M / EDTA 0.001M (TAE) y teñidos con bromuro de etidio.

3.2.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa

Las amplificaciones de OCT3/4 y NANOG se realizaron con 50 ng de cDNA, 3 mM MgCl₂, 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Promega). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones se muestran en la tabla 4. Las condiciones para los ensayos de PCR fueron: a) desnaturalización 95°C (5 min); b) alineamiento: OCT3/4 30 ciclos [95°C (30 s) / 61°C (17 s) / 72°C (20 s)]; NANOG 30 ciclos: [95°C (30 s) / 59°C (30 s) / 72°C (25 s)]; α-tubulina 30 ciclos: [95°C (30 s) / 59°C (30 s) / 72°C (25 s)]; c) extensión 72°C (5 min).

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos usados en los ensayos de PCR

Gen	Tamaño del producto (pb)	Oligonucleótido (5' – 3')	Uso
OCT3/4	204	F - GCT CATCCT GGG GGT TCT ATT R – CTGGTTCGCTTTCTCTTTCCGG	20 picomoles
NANOG	201	F - ACC TTC CAA TGT GGA GCA AC R - GAG AAT TTG GCT GGA ACT GC	20 picomoles
α-Tubulina	402	F - CAG ATG CCA AGT GAC AAG AC R - ACT CCA GCT TGG ACT TCT TG	20 picomoles

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TAE y teñidos con bromuro de etidio.

3.3. SEPARACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ Y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar el ensayo de separación de una subpoblación de células madre mesenquimales con el inmunofenotipo CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺, se procesaron entre 3 y 5 millones de células, las cuales se resuspendieron en 900 µl de SB esterilizado por filtración. Se incubaron con los anticuerpos: anti-CD73 (30 µl), anti-CD44 (15 µl) y anti-CD105 (60 µl) y se realizaron las incubaciones y los lavados como se describió anteriormente con la modalidad de realizar el proceso en campana de flujo laminar. El paquete celular se resuspendió en 2 ml de PBS estéril. La separación de la subpoblación celular CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺, así como de una subpoblación carente del marcador de superficie CD105 (CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻) se realizó utilizando la opción de pureza a una velocidad de 5,000 eventos por segundo. Este procedimiento se llevó a cabo en un citómetro FACSAria (Becton Dickinson). Las células fueron recolectadas en PBS estéril conteniendo 3% de SFB. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS estéril y cultivadas en medio DMEM y 10% de SFB para su expansión.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MADRE CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ Y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻

3.4.1. Inmunofenotipificación de las subpoblaciones de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mediante citometría de flujo

Cultivos de las subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ dentro de los pases 2 y 4 fueron evaluados en la expresión de antígenos de superficie, descritos en la tabla 5, relacionados con el linaje hematopoyético.

Tabla 5. Descripción de reactivos fluorescentes. Parte 2

Analito	Detector	Fluorocromo	Fabricante	Catálogo	Lote	Clona
CD14	Anti-CD14 IgG2a, κ	RPE	Serotec	MCA1568PE	03098	TUK4
CD45	Anti-CD45 IgG1, κ	RPE	Invitrogen	MHCD45044	534339C	HI30
CD34	Anti-CD34 IgG1, κ	PE	BD Biosciences	348057	71041	8G12
Control	IgG2a κ Isotipo	PE	BioLegend	400211	B124880	MOPC-173
Control	IgG1 κ Isotipo	PE	BioLegend	400112	B125235	MOPC-21

3.4.2. Inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal de los factores de transcripción OCT3/4, NANOG y SOX2 en las subpoblaciones de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mediante citometría de flujo

Este ensayo se realizó conforme a la metodología descrita en el apartado 3.2.4.2.

3.4.3. Capacidad de diferenciación osteogénica de las subpoblaciones de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻

Para inducir diferenciación osteogénica, las células en cultivo se sembraron en cajas de 6 pozos (área = 9.5 cm²/pozo) (Costar, Corning Incorporated) a una densidad de 20,000 células por pozo. Como base, se utilizó medio DMEM suplementado con 10% de SFB, L-glutamina 2 mM y una mezcla de penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml. Para la inducción, el medio base fue suplementado con una mezcla que contenía β-glicerofosfato (Sigma, sal disódica) 10 mM, ascorbato de sodio (Sigma) 0.25 mM y dexametasona (Sigma) 10⁻⁸ M. Este medio de diferenciación se recambió cada tercer día durante 21 días y, para los casos en los que se llegó a confluencia, se realizaron cambios diarios de medio. Se realizó una cinética de diferenciación obteniendo muestras de los cultivos diferenciados a diferentes tiempos mediante la cosecha de las células correspondientes a un pozo por duplicado. Se consideró como tiempo 0 al cultivo que nunca se expuso a la mezcla inductora.

3.4.3.1. Evaluación de la actividad de la Fosfatasa alcalina mediante ELISA

3.4.3.1.1. Ensayo inmunoenzimático

La actividad de la fosfatasa alcalina ósea (FAO) durante el proceso de diferenciación osteogénica se determinó utilizando un ensayo inmunoenzimático comercial (MicroVue, Quidel Corporation, USA). Este análisis permite la medición cuantitativa de la actividad de la fosfatasa alcalina específica de hueso como un indicador de la actividad osteoblástica, ya que la isoforma esquelética u ósea de la fosfatasa alcalina es una glicoproteína que se encuentra en la superficie celular de los osteoblastos.

El ensayo MicroVue utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido contra la fosfatasa alcalina específico para la isoenzima ósea, el cual muestra una afinidad

elevada y selectiva para esta isoenzima. Este monoclonal presenta una baja reactividad cruzada con la forma hepática de la fosfatasa alcalina y una unión insignificante a las isoenzimas intestinal y placentaria (tabla 6).

Tabla 6. Reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal vs fosfatasa alcalina ósea

Isoenzima	% reactividad
Ósea	100
Hepática	3 – 8
Placentaria	0
Intestinal	0.4

El formato de este ensayo incluye tiras de pozos a los que se les ha adsorbido anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de FAO purificado. Se utilizó una curva patrón con las siguientes referencias (Tabla 7):

Tabla 7. Curva patrón para ensayo de fosfatasa alcalina ósea

Referencia	Concentración (U/L)*
A	0
B	2
C	20
D	50
E	80
F	140

* 1 unidad representa 1 μmol de fosfato de p-nitrofenil (pNPP) hidrolizado por min a 25°C en amortiguador 2-amino-2-metil-1-propanol

La fosfatasa alcalina hidroliza el enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico (pH óptimo entre 9 y 10) liberando fosfato inorgánico. En este ensayo se utilizó como sustrato al fosfato de p-nitrofenil que, al ser hidrolizado origina como producto al p-nitrofenol que es un compuesto de color, el cual en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, por

Los resultados de las muestras se expresaron como U/L y estos valores fueron normalizados contra la concentración de proteínas de cada una de las muestras analizadas.

3.4.3.1.3. Determinación de la concentración de proteínas totales por el método de Lowry

Para determinar la concentración de proteínas totales se utilizó el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y como referencia se elaboró, por duplicado, una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA, fracción V, Calbiochem) como se detalla en la tabla 8:

Tabla 8. Curva patrón de BSA para determinación de proteínas totales

Tubo	[BSA] µg/40µl
1	0
2	1
3	1.5
4	2
5	3
6	4
7	5
8	6
9	7
10	8
11	9

La curva patrón y las muestras a analizar, previamente diluidas en 40 µl de agua destilada estéril, se colocaron en placas de 96 pozos (Costar, Corning Incorporated). Se les adicionaron 200 µl del reactivo C conteniendo:

100 partes del reactivo A (Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N)

1 parte del reactivo B1 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%) (Merck)

1 parte del reactivo B2 (Tartrato NaK al 2%) (Merck)

y se incubó durante 10 min en oscuridad. En seguida se adicionaron 20 µl del reactivo de Folin (reactivo de fenol de Ciocalteu & Folin, Sigma-Aldrich) a cada pozo y se incubó durante 20 min en oscuridad. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 580 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron utilizando el programa CurveExpert 1.4. Para calcular la concentración de las muestras problemas en función de la curva estándar se aplicó la fórmula: $y = a + bx$

3.4.3.2. Evaluación del depósito de calcio mediante la tinción con rojo de Alizarina

El hueso sufre un continuo proceso de remodelamiento que requiere la actividad coordinada de dos tipos de células. Por una parte, los osteoclastos destruyen la matriz ósea, mientras los osteoblastos depositan colágena, calcio, fósforo y otros minerales para formar nuevo hueso. El balance entre la actividad de osteoclastos y osteoblastos determina la masa y densidad del hueso.

El rojo de Alizarina es utilizado para detectar la presencia de calcio en el hueso. Se realizó la cuantificación de los depósitos de calcio en los cultivos de células mediante el uso de un ensayo comercial de osteogénesis (Millipore), basado en la tinción con rojo de Alizarina. Las células (10^4 células / ml) fueron cultivadas en placas de 6 pozos y cosechadas en los días 0, 9, 14 y 21 posterior a la inducción con el coctel osteogénico. Para el ensayo, las células fueron lavadas con PBS y descalcificadas con HCl 0.6 M a 37°C durante 12 h. Posteriormente, fueron incubadas con una solución de NaOH 0.1 M y SDS al 0.1% para extraer el contenido de calcio. Finalmente, se realizó la medición de la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH TM; Biotek Instruments Inc, USA) y la concentración fue calculada extrapolando contra una curva estándar. Los resultados fueron normalizados con el contenido de proteína total evaluados por la técnica de Lowry.

Capítulo IV

RESULTADOS

4.1. Establecimiento del cultivo de células adherentes a partir de la membrana amniótica de humano

Reportes previos describen la utilización de la membrana amniótica como fuente de células madre mesenquimales, sin embargo, como Schugar *et al.* (2009) han descrito, la utilización de diferentes métodos de extracción y aislamiento de estas células da como resultado una amplia gama de poblaciones con grandes coincidencias y en ocasiones no sutiles diferencias.

En la primera parte de este trabajo nos planteamos aislar a partir de la membrana amniótica a aquella población celular que tuviera la capacidad de adherirse a la caja de cultivo, esto con base en los criterios establecidos en el año 2007 durante el Primer Taller Internacional sobre células madre derivadas de placenta (Parolini *et al.*, 2008).

Con la finalidad de aislar las células de la membrana amniótica a término, se procedió a separar mecánicamente la membrana amniótica del corion subyacente por simple desprendimiento. Esta facilidad para despegar ambas membranas se debe a la presencia de una capa de elastina presente en el tejido conectivo laxo de la membrana amniótica y adyacente al corion.

Se tomó la membrana de la zona proximal al cordón umbilical (fig. 10A) debido a que se ha considerado una zona con una densidad mayor de células madre mesenquimales. Se tuvo mucho cuidado para evitar cortar los vasos sanguíneos.

Generalmente se procesaron de 5 a 7 g de tejido, lo cual equivale a una superficie de aproximadamente 50 a 70 cm² de membrana, respectivamente. Después de lavar exhaustivamente la membrana con PBS estéril (fig. 10B), se cortó en fragmentos más pequeños utilizando bisturí para permitir el acceso de los siguientes tratamientos enzimáticos (fig. 10C).

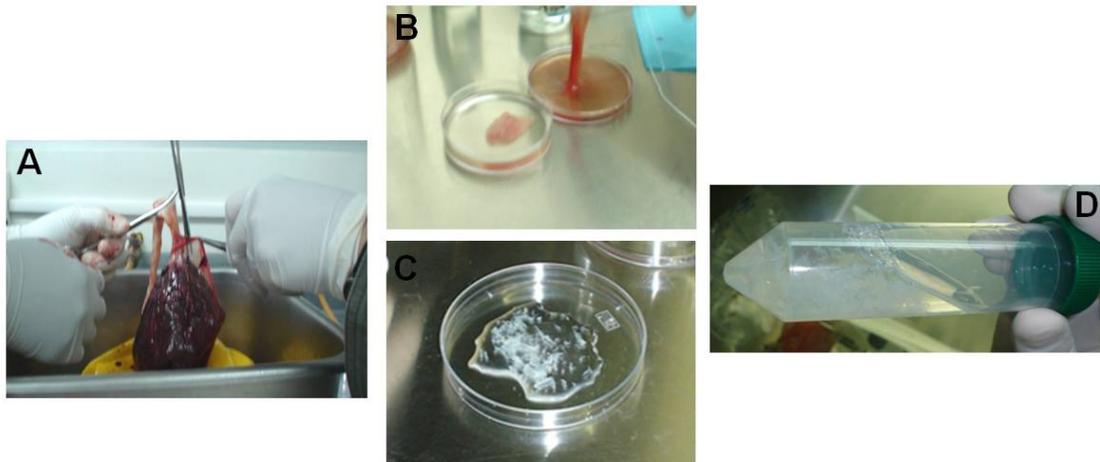


Fig. 10 Procesamiento de la membrana amniótica de humano. A: Separación mecánica de la membrana amniótica. B: Lavados exhaustivos con PBS. C: Fragmentación del tejido. D: Digestión enzimática de los fragmentos tisulares.

Esta estrategia se basa en una doble digestión enzimática. La primera consiste en la acción de la tripsina (fig. 10D), la cual nos permitió la eliminación completa de la monocapa de células epiteliales amnióticas que descansa sobre una membrana basal gruesa compuesta de colágena y una capa de fibroblastos bajo la membrana basal. Debido a que el soporte en el cual residen las células estromales amnióticas tiene una composición que comprende, principalmente, a diversos miembros de la familia de las colágenas (fig. 11), el siguiente paso de digestión enzimática consistió en el tratamiento con colagenasa tipo II (también conocida como MMP8), la cual escinde las colágenas fibrilares, tales como colágena tipo I, II, III, V y XI, así como colágenas no fibrilares, incluyendo colágenas tipo IX, XII y XIV (Curry *et al.*, 2003). La actividad enzimática de la colagenasa tipo II es más selectiva para la colágena tipo I que para el tipo III. Este

tratamiento nos permitió aislar las células del compartimiento estromal de soporte en el cual estas células residen. Es importante señalar que los tiempos de incubación tanto con tripsina como colagenasa debieron ser los mínimos necesarios de tal forma que obtuviéramos un buen rendimiento en el proceso de extracción, pero sin dañar la superficie celular.

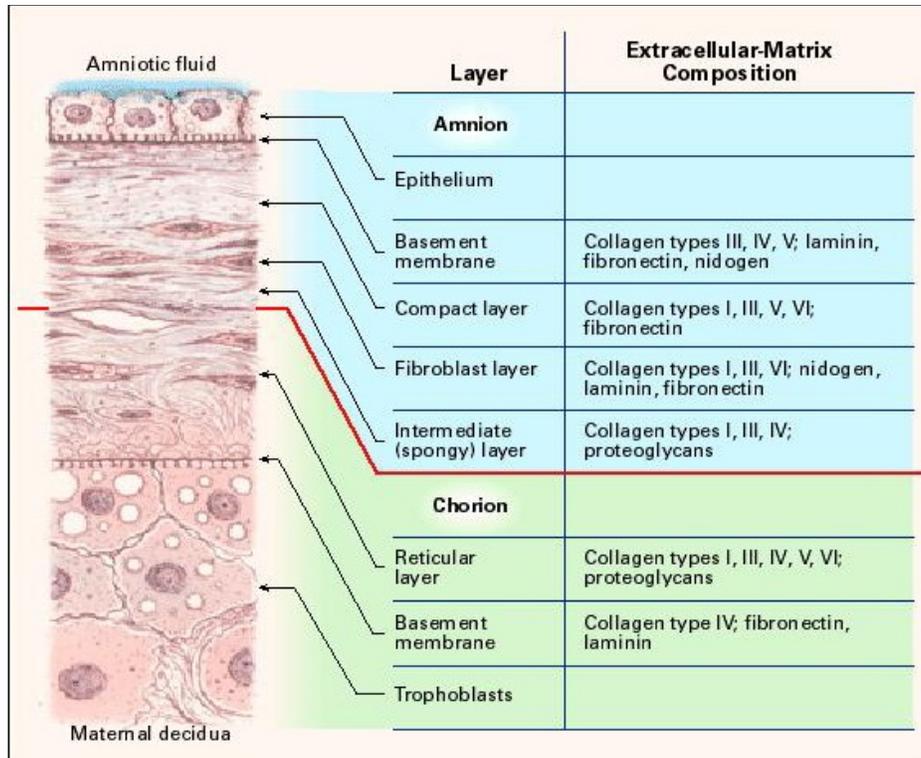


Fig. 11 Representación esquemática de la estructura de la membrana fetal a término. Se muestran los componentes de la matriz extracelular de cada capa. Tomado de: Niknejad *et al.*, 2008, quien realizó una adaptación de Parry *et al.*, 1998.

Después de los tratamientos enzimáticos, la suspensión celular se diluyó con PBS y se filtró para eliminar restos de tejido no digerido. El paquete celular recuperado fue cultivado en un medio de cultivo DMEM que contenía solamente los nutrientes mínimos suplementado con 10% de SFB. Como se muestra en la fig. 12A, se obtuvo una población celular morfológicamente muy heterogénea, la cual comenzó a adherirse a las placas dentro de las primeras 2 a 4 horas de cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. Esta capacidad

de las células aisladas de la membrana amniótica de adherirse a las placas de cultivo es el primer criterio de selección de las células madre mesenquimales según los lineamientos establecidos en el año 2007 durante el Primer Taller Internacional sobre células madre derivadas de placenta (Parolini *et al.*, 2008). El segundo criterio mínimo para definir a las células madre mesenquimales es su capacidad para dar origen a unidades formadoras de colonias con morfología fibroblastoide, lo cual fue observado después de un período de 5 a 7 días de cultivo (fig. 12B). Conforme avanzó el cultivo y alcanzó la subconfluencia, se pudo apreciar que las células adquirían una morfología alargada fibroblastoide y comenzaron a originar colonias.

En promedio, al cabo de 10 a 14 días posteriores al aislamiento, se obtuvieron cultivos confluentes (fig. 12C). Es importante señalar que la tasa de proliferación de estos cultivos se mantuvo estable incluso hasta el octavo y décimo pases.

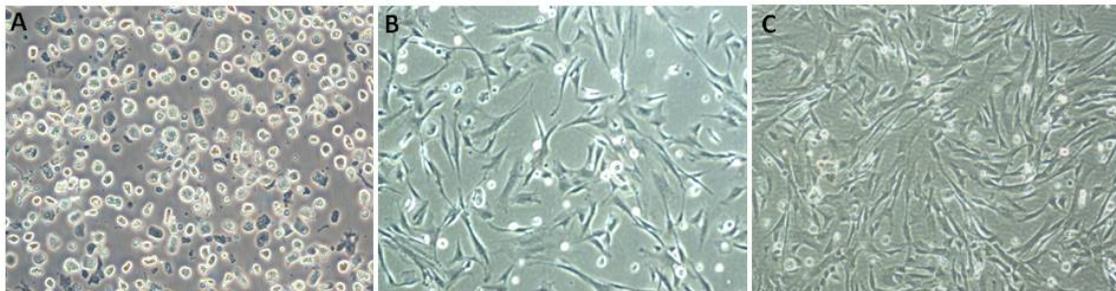


Fig. 12 Selección de células adherentes a las placas de cultivo. Células aisladas de la membrana amniótica de humano se cultivaron en medio DMEM a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. A: Primer día de cultivo. B: Cultivo entre los días 5 y 7. C: Cultivo entre los días 10 y 14.

4.2. Expresión de los marcadores de pluripotencialidad OCT3/4 y NANOG en el cultivo celular adherente

El mantenimiento del estado indiferenciado (o de la pluripotencia cuando se trata de células madre), así como el proceso de diferenciación, son producto de la acción de muchos factores de transcripción que intervienen de manera coordinada en el tiempo formando distintos complejos sobre los promotores de los genes

diana que son así activados secuencialmente. La importancia de algunos de ellos, como OCT3/4, SOX2 y NANOG, para mantener el estado pluripotente y la autorrenovación de las células madre se ha podido demostrar en estudios de sobreexpresión. Para demostrar que en la población celular adherente aislada se expresaban algunos de estos factores de transcripción, se analizó mediante ensayos RT-PCR cualitativos la presencia de los mensajeros de OCT3/4 y NANOG. Para estos ensayos se extrajo RNA a partir de cultivos en fases tempranas. Una vez sintetizados los cDNA's, se verificó la calidad de estos mediante la amplificación de α -tubulina como gen control de tipo "housekeeping". En la figura 14 se muestra la presencia del amplicón de 204 pb (fig. 13A) correspondiente a OCT3/4; así mismo, la expresión de NANOG es evidenciada por la presencia de un fragmento de 201 pb (fig. 13B).

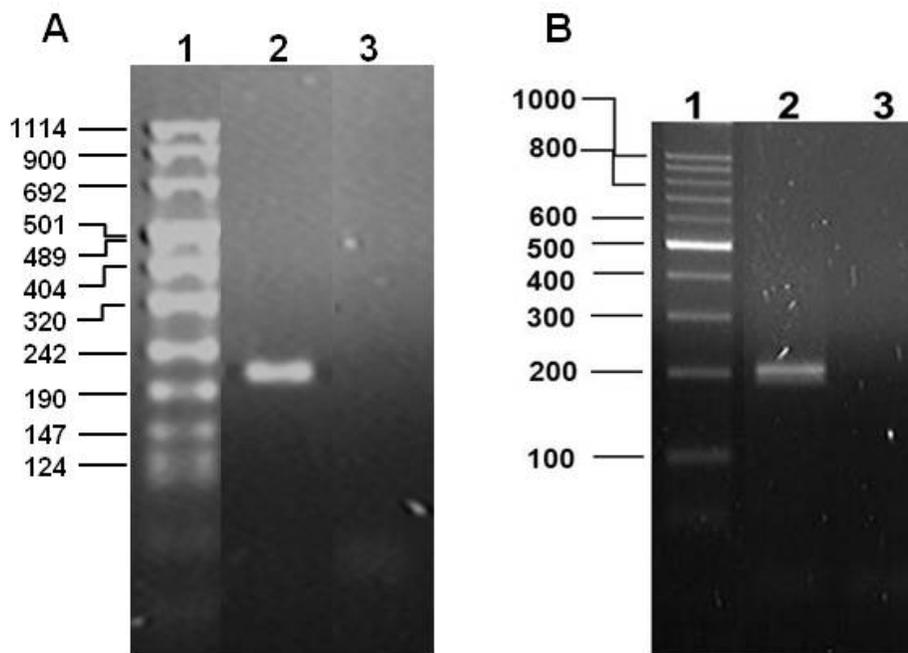


Fig. 13 Evaluación de la expresión de los marcadores de pluripotencialidad OCT3/4 (A) y NANOG (B). Se extrajo RNA total de la población de células adherentes en cultivo de la membrana amniótica y se realizaron ensayos de RT-PCR. Carril 1: Marcador de PM; carril 2: RNA de células adherentes de membrana amniótica; carril 3: control sin RNA.

Para demostrar a nivel de proteína la presencia de ambos factores de transcripción, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta. De manera interesante, estos ensayos nos permitieron observar que entre un 70 a 80% de las células expresaron OCT3/4 (fig. 14), mientras que el 100% de las células fueron positivas para la presencia de NANOG (fig. 14).

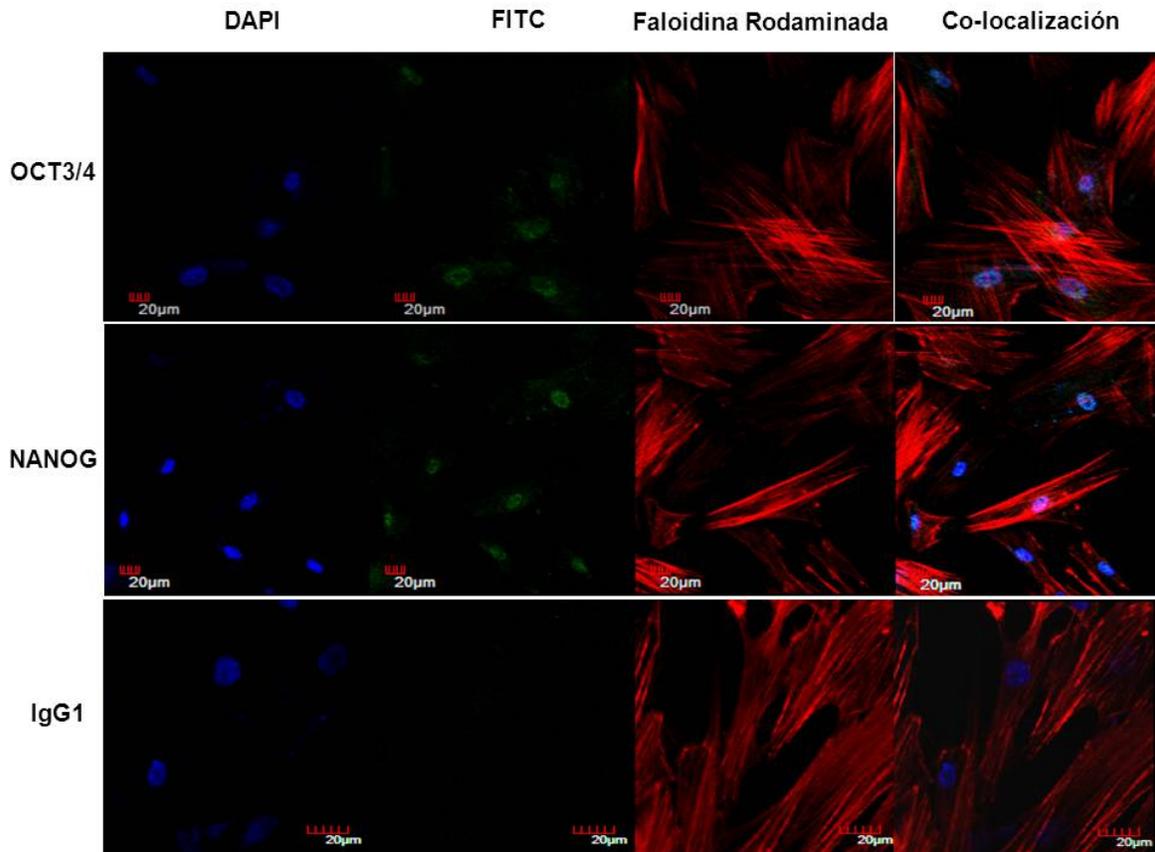


Fig. 14 Microscopía de fluorescencia y análisis confocal de la expresión de OCT3/4 y NANOG en células adherentes en cultivo de la membrana amniótica. En verde se muestra la tinción con los anticuerpos dirigidos contra OCT3/4 o NANOG, en azul la tinción con DAPI de los núcleos y en rojo la tinción del citoesqueleto de actina con faloidina rodaminada. Como control negativo se utilizó IgG1.

Estos resultados demuestran que la población de células adherentes aisladas de la membrana amniótica por medio de la doble digestión enzimática conserva su estado indiferenciado.

4.3. Expresión de los marcadores CD44, CD73 y CD105 en la población de células madre obtenidas de membrana amniótica

Una vez que se confirmó la expresión de los factores de transcripción relacionados con el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre, nos dimos a la tarea de evaluar, mediante citometría de flujo, parámetros fenotípicos con el fin de tener un criterio adicional en la caracterización de la población aislada.

Por citometría de flujo, se examinó la viabilidad de las células mediante la medición de la incorporación de yoduro de propidio y la presencia de annexina V en la membrana celular, obteniendo un porcentaje mayor al 90%.

Cuando se examinaron las características de tamaño y de granularidad de la población adherente completa, pudimos confirmar la gran heterogeneidad de la población aislada. Los resultados de este análisis se muestran en una gráfica de puntos (dot plot) (fig. 15). En el eje de las abscisas se grafica el tamaño celular relativo (FSC), mientras que en el eje de las ordenadas se grafica la granularidad o complejidad interna relativa (SSC) de estas células, característica que es un indicador de su actividad metabólica. En un análisis inicial FSC vs SSC, en una escala lineal (fig. 15A), se observó una alta dispersión celular, lo que no permitía delimitar una población como tal. Cuando en el análisis se aplicó una escala logarítmica para los parámetros FSC vs SSC, pudimos observar la presencia de dos poblaciones celulares, una de menor tamaño y con poca granularidad y una segunda, de mayor tamaño y altamente granular, lo cual refleja mayor actividad metabólica (fig. 15B).

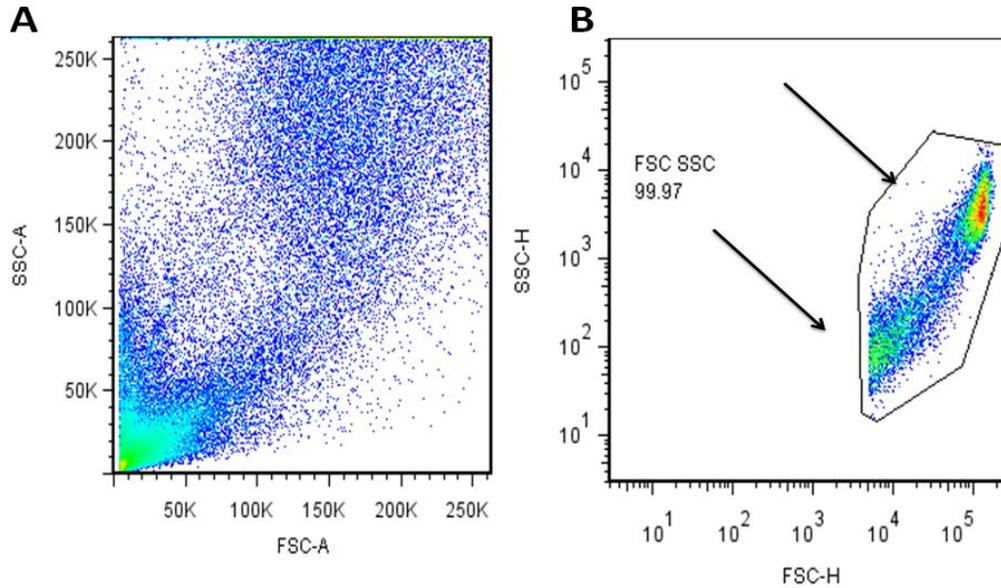


Fig. 15 Análisis mediante citometría de flujo de la población de células adherentes obtenidas de membrana amniótica. La población celular total fue analizada en escala lineal (A) y en escala logarítmica (B). Dos poblaciones celulares, diferentes en tamaño y complejidad interna, son señaladas con las flechas.

Se analizó la expresión de los antígenos de superficie CD44, CD73 y CD105 en ambas poblaciones celulares de manera independiente.

Como puede observarse en las figs. 16 y 17, la expresión de los marcadores es diferente en las dos poblaciones. En la población celular de menor tamaño y menor complejidad interna (fig. 16), el 82% de las células coexpresan los antígenos CD44 y CD73, siendo prácticamente negativas para el marcador CD105, el cual es expresado únicamente por el 0.08% de las células CD44⁺/CD73⁺. Cuando analizamos la expresión de estos antígenos en la población celular de mayor tamaño y mayor complejidad interna (fig. 17), podemos observar que el 97.57% de las células coexpresan los antígenos CD44 y CD73 y un 6.31% de las células expresan de manera simultánea el antígeno CD105.

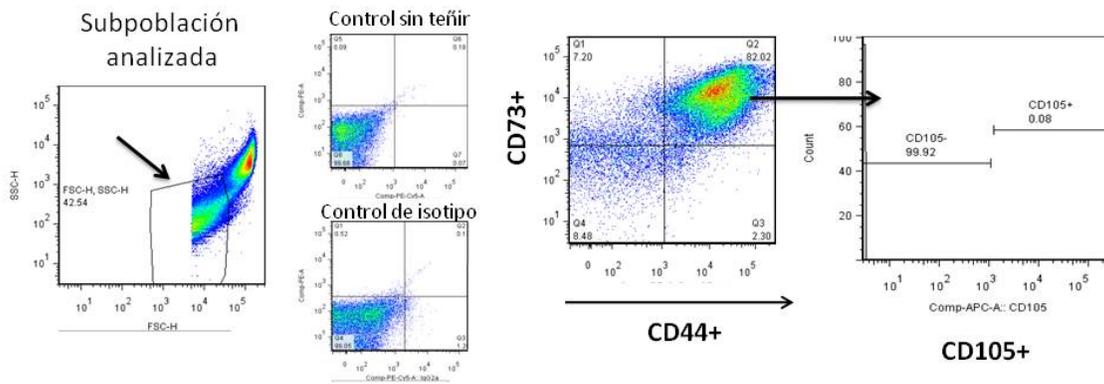


Fig. 16 Análisis de la expresión de los antígenos CD44, CD73 y CD105 en la población celular de menor tamaño y menor complejidad interna.

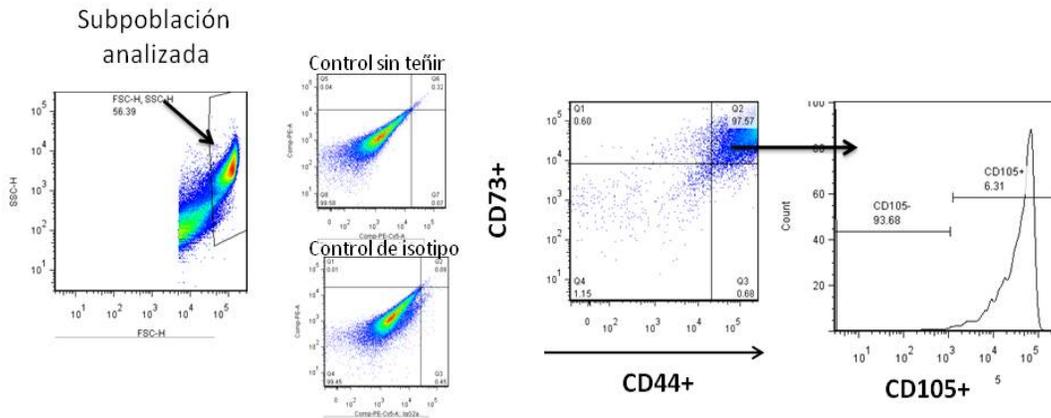


Fig. 17 Análisis de la expresión de los antígenos CD44, CD73 y CD105 en la población celular de mayor tamaño y mayor complejidad interna.

Entre las características que observamos en la población celular aislada de la membrana amniótica podemos mencionar la gran estabilidad en la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD73, no solamente a lo largo de los pases celulares sino también entre las diferentes muestras analizadas. Por el contrario, la expresión del CD105 mostró una expresión significativamente más baja en comparación con las proteínas CD44 y CD73; más importante aún, el antígeno CD105 mostró fluctuaciones importantes a lo largo de los pases celulares. Debido a que este marcador formaba parte del esquema de selección, decidimos analizar

mediante citometría de flujo su expresión en pasajes tempranos (hasta el tercer pasaje). En la figura 18, se puede observar que conforme avanzan los pasajes celulares la expresión de este marcador se incrementa. Sin embargo, cabe señalar que en promedio la expresión más estable la observamos dentro de los primeros pasajes siendo el 6.3% el valor más constante.

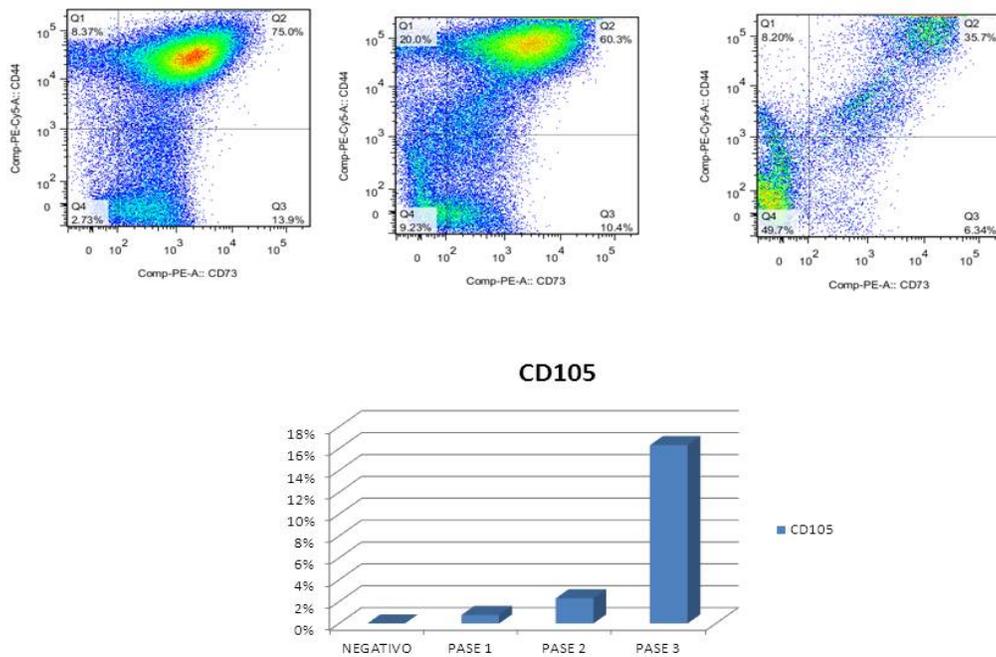


Fig. 18 Expresión de los marcadores de superficie CD73, CD44 y CD105 en la población de células madre a lo largo de los pasajes celulares.

4.4. Separación de las subpoblaciones de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mediante citometría de flujo

Las células madre mesenquimales pueden ser fácilmente seleccionadas con base en sus propiedades de adherencia al plástico, pero la carencia de un único marcador específico todavía representa un reto para los investigadores. Esta es la razón por la cual un grupo de marcadores de superficie positivos y negativos han sido utilizados para garantizar homogeneidad en el aislamiento. Es así que la

positividad para los marcadores CD73, CD90, CD105 y la ausencia de marcadores tales como CD14, CD34, CD45 y HLA-DR se han considerado recomendables para definir, caracterizar y aislar a las células madre mesenquimales.

En este trabajo, además de los marcadores CD73 y CD105, incluimos el análisis de CD44 que es una molécula de adhesión, cuya función en células madre mesenquimales está relacionada con fenómenos de diferenciación y migración celular (Zhu *et al.*, 2006).

Para la selección de la subpoblación de interés, se definió como la emisión de fluorescencia positiva a aquella que excedió los niveles obtenidos por >99% de las células a partir del control de la población que fue teñida únicamente con el isotipo del anticuerpo primario. El análisis y la selección se basaron en la presencia de 3 fluorocromos (CD73-PE, CD44-PerCP-Cy5.5 y CD105-APC). Las células que coexpresaron los marcadores CD73 y CD44 fueron seleccionadas y a partir de esta población se generó un gráfico de dot-plot de side scatter vs CD105-APC. De este gráfico, se seleccionaron las células que expresaban CD105 utilizando los controles de isotipo como referencia y la intensidad media de fluorescencia. Al menos 5,000 eventos por segundo en la región de CD73 y CD44 fueron analizados. Los datos fueron analizados usando la versión 7.2.2 del software FlowJo. (fig. 19). En promedio, el análisis inicial mostró que el 91 % de la población de células viables mostraron ser CD73⁺/CD44⁺. Así mismo, la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ correspondió al 12.1%, mientras que la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ correspondió al 30.9%.

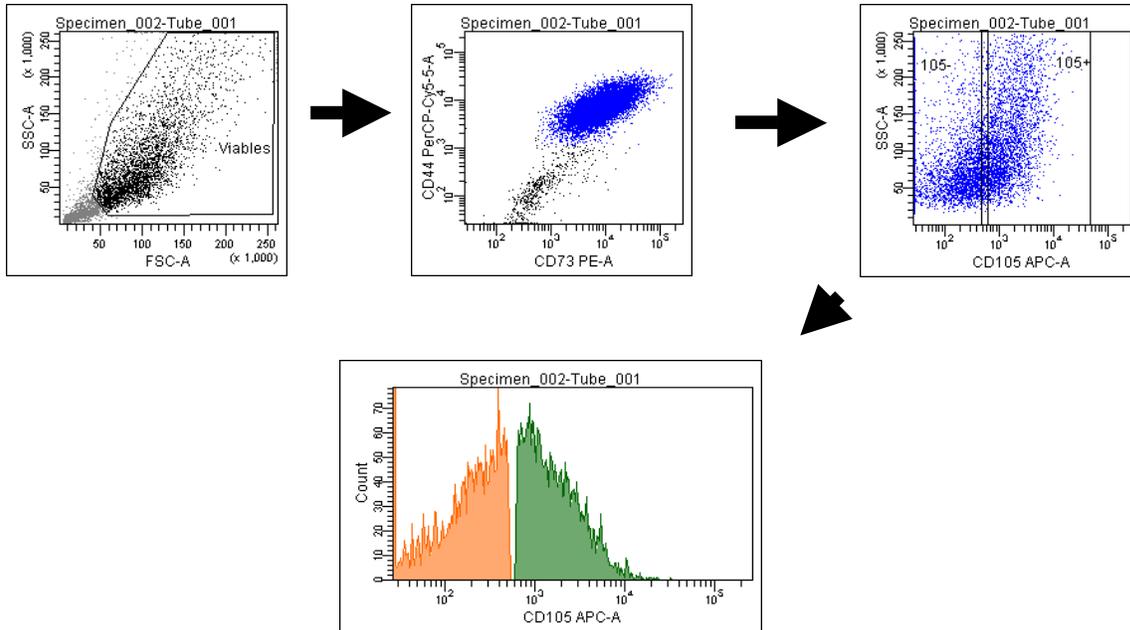


Fig. 19 Separación de las subpoblaciones de células $CD73^+/CD44^+/CD105^+$ y $CD73^+/CD44^+/CD105^-$ mediante citometría de flujo. El ensayo se realizó utilizando la opción de pureza a una velocidad de 5,000 eventos por segundo. La eficiencia del ensayo fue del 97% para el caso de la subpoblación $CD73^+/CD44^+/CD105^-$ y del 96.4% para la subpoblación $CD73^+/CD44^+/CD105^+$.

4.5. Las subpoblaciones $CD73^+/CD44^+/CD105^+$ y $CD73^+/CD44^+/CD105^-$ expresan los factores de transcripción SOX2, OCT3/4 Y NANOG

Por otra parte, evaluamos la expresión de los factores de transcripción SOX2, OCT3/4 y NANOG en las subpoblaciones celulares $CD73^+/CD44^+/CD105^+$ y $CD73^+/CD44^+/CD105^-$ mediante microscopía de fluorescencia y análisis confocal. OCT3/4 y NANOG, en conjunto con SOX2, constituyen un grupo crítico para la autorrenovación y el mantenimiento del estado pluripotente de las células madre embrionarias de humano y ratón y de las células de la masa interna del blastocisto. De manera por demás interesante, en los ensayos de microscopía de fluorescencia (fig. 20) observamos que el 100% de las células de la subpoblación $CD73^+/CD44^+/CD105^+$ mostraron la expresión de los factores de transcripción SOX2, OCT3/4 y NANOG. Interesantemente, también observamos la expresión de estos tres factores en el 100% de la subpoblación celular $CD73^+/CD44^+/CD105^-$ carente del marcador de superficie CD105. Estos ensayos contribuyen

fuertemente a asignar a ambas subpoblaciones la denominación de células madre considerando que estos factores de transcripción están relacionados con la potencialidad de las células.

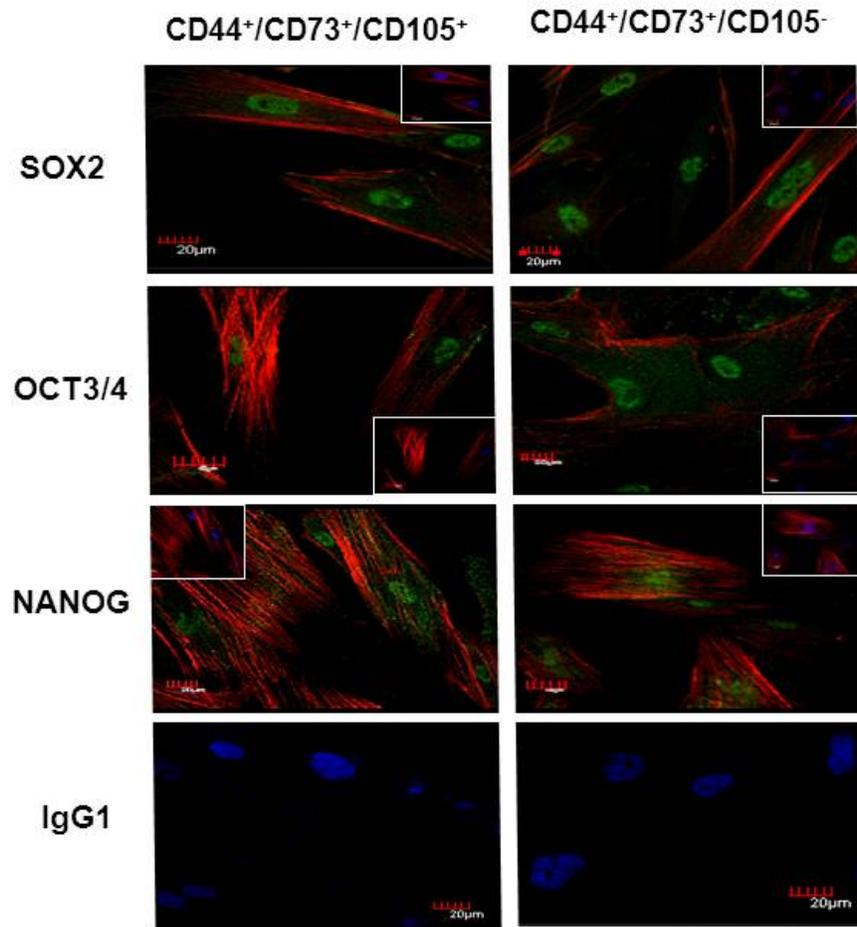


Fig. 20 Microscopía de fluorescencia y análisis confocal de la expresión de SOX2, OCT3/4 y NANOG en las subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻. En verde se muestra la tinción con los anticuerpos dirigidos contra SOX2, OCT3/4 o NANOG; en azul la tinción con DAPI de los núcleos y en rojo la tinción del citoesqueleto de actina con faloidina rodamina. Como control negativo se utilizó IgG1.

4.6. Las subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ poseen un patrón inmunofenotípico propio de las células madre mesenquimales

La Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT) propuso utilizar la carencia de expresión de antígenos hematopoyéticos y de monocitos como un criterio adicional para caracterizar a las MSCs humanas. Por esta razón, decidimos evaluar la expresión de los marcadores CD14, CD34 y CD45 en las subpoblaciones celulares que aislamos con el fenotipo CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻. Desde el ensayo de separación, ambas subpoblaciones se mantuvieron en cultivo y entre los pases 2 y 4 se caracterizaron mediante la evaluación de su patrón inmunofenotípico por citometría de flujo. Por recomendación de la ISCT, consideramos como expresión negativa cuando se determinaron valores menores o iguales a 2%. En promedio, la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ mostró valores de 1.9% para CD45, 0.1% para CD34 y 0.8% para CD14 (fig. 21). Por su parte, la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mostró valores de 1.8% para CD45, 1.8% para CD34 y 0.7% para CD14 (fig. 22).

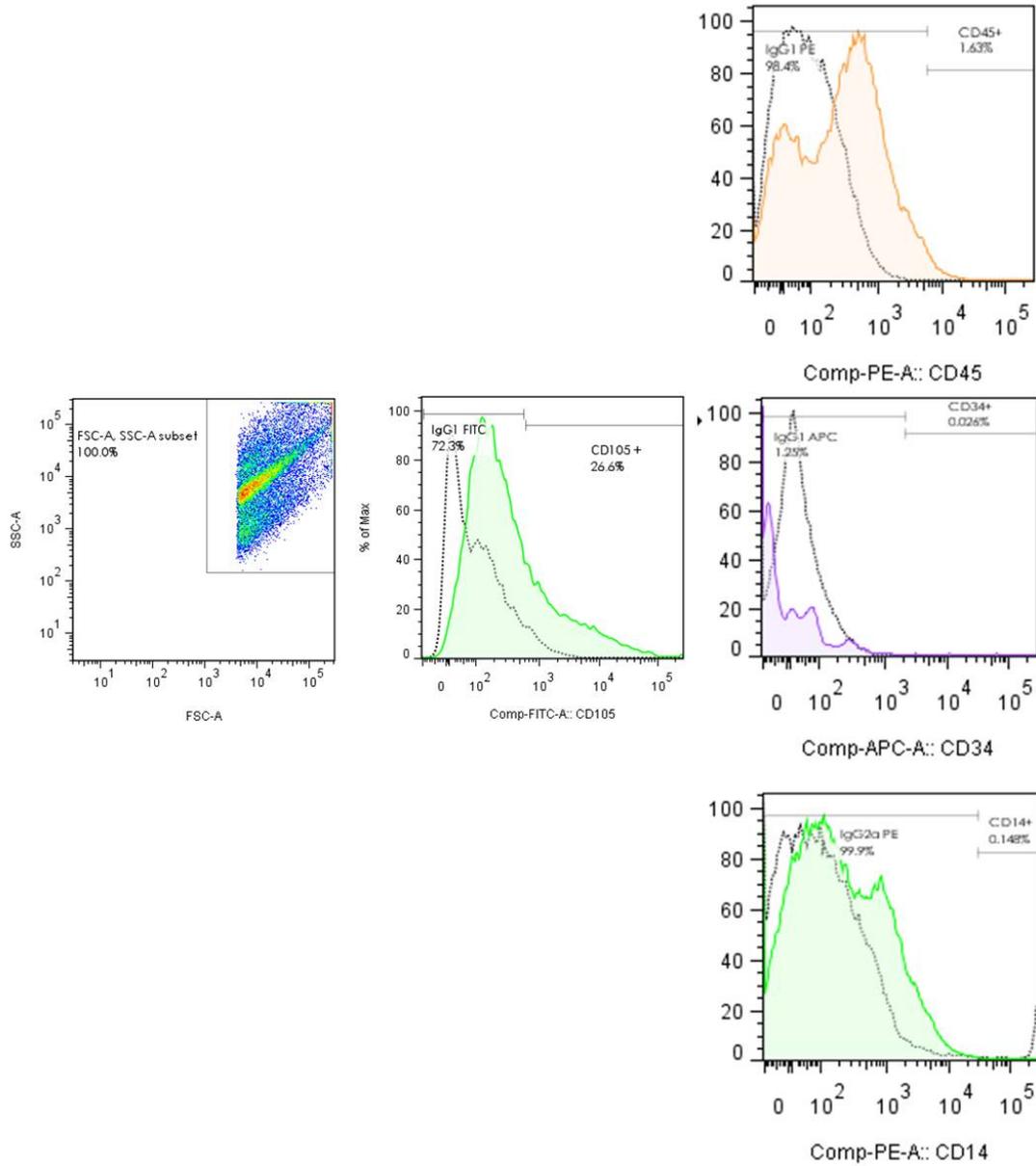


Fig. 21 Evaluación del patrón inmunofenotípico de la subpoblación de células madre CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺. Cultivos de la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ dentro de los pases 2 y 4 fueron analizados mediante citometría de flujo. El patrón de expresión de estos marcadores corresponde a la evaluación de dos lotes distintos de células.

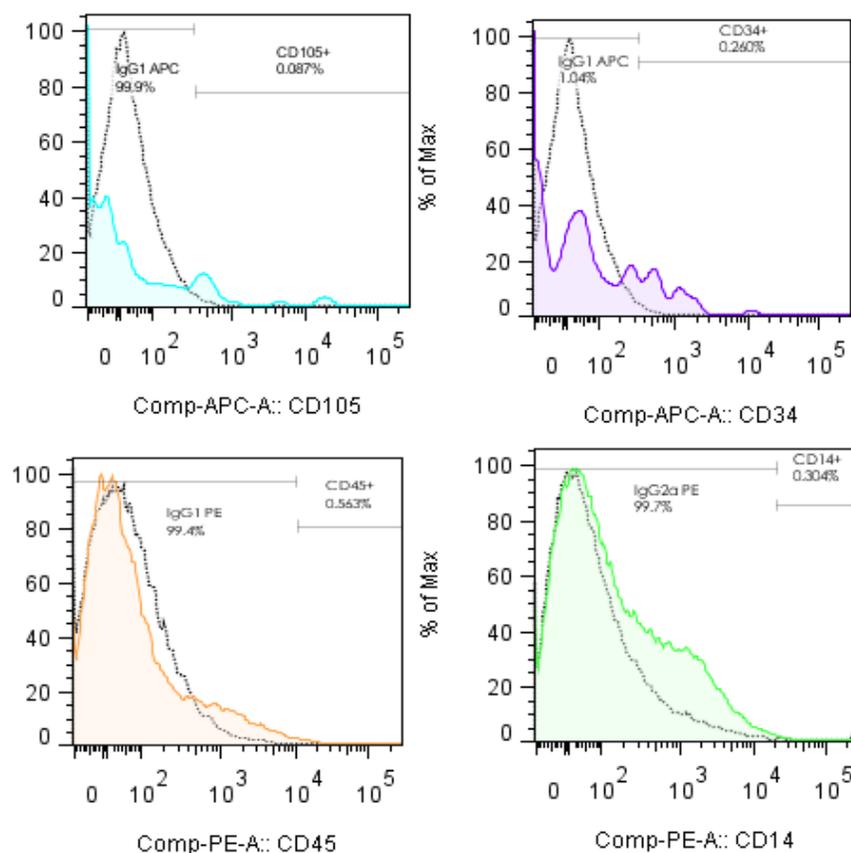


Fig. 22 Evaluación del patrón inmunofenotípico de la subpoblación de células madre $CD73^+/CD44^+/CD105^-$. Cultivos de la subpoblación $CD73^+/CD44^+/CD105^-$ dentro de los pases 2 y 4 fueron analizados mediante citometría de flujo. El patrón de expresión de estos marcadores corresponde a la evaluación de dos lotes distintos de células.

4.7. Las subpoblaciones $CD73^+/CD44^+/CD105^+$ y $CD73^+/CD44^+/CD105^-$ son capaces de diferenciarse hacia el linaje osteoblástico

Para demostrar si ambas subpoblaciones celulares eran capaces de ser diferenciadas hacia el linaje osteoblástico, fueron inducidas con un coctel constituido por dexametasona, β -glicerofosfato y ascorbato de sodio durante 14 días. Se tomaron muestras a los días 0, 3, 5, 7, 9 y 14 postinducción y se evaluó la actividad de fosfatasa alcalina ósea mediante ELISA. Es importante señalar que esta estrategia refleja únicamente la actividad de la isoenzima ósea sin mostrar

reactividad cruzada con otras isoenzimas. A partir de este ensayo logramos demostrar que aunque ambas subpoblaciones mostraron una actividad de la enzima suficientemente alta como para comenzar el proceso de mineralización, la temporalidad en la que se observa el pico de actividad está desfasada por 4 días, siendo la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ la que comienza el proceso de mineralización más temprano (fig. 23). Estos tiempos corresponden al punto de transición que marca el final de la segunda etapa y el comienzo de la etapa de mineralización de la matriz extracelular.

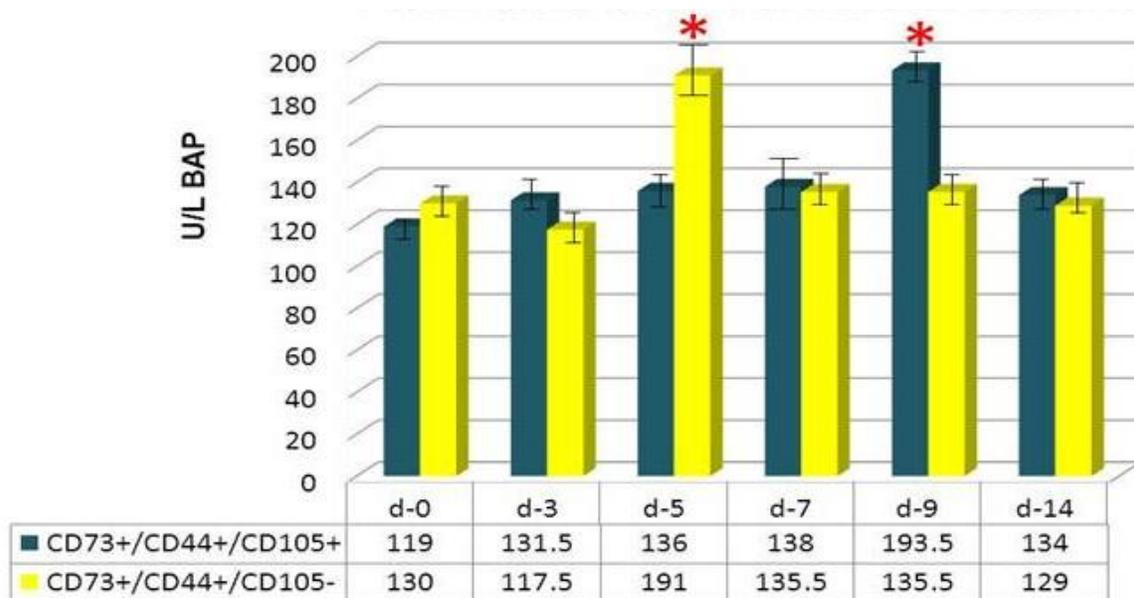


Fig. 23 Evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina ósea durante la diferenciación osteogénica. Las subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ fueron sometidas a diferenciación osteogénica y la actividad de la fosfatasa alcalina ósea se determinó utilizando un ensayo inmunoenzimático. Los valores, normalizados contra la concentración de proteínas de las muestras analizadas, se expresan como promedio \pm desviación estándar (núm. = 3). * p <0.05

Para demostrar que ambas subpoblaciones eran capaces, no solamente de iniciar el proceso de diferenciación osteogénica, sino también de generar osteoblastos maduros, analizamos su capacidad de mineralización (depósitos de calcio) mediante la tinción con rojo de Alizarina. En la tabla 9 se muestra que, aunque ambas subpoblaciones muestran positividad, la subpoblación

CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ presenta una concentración claramente superior en comparación con la CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺, incluso superior que la población original (MSCs) de la cual fueron obtenidas.

Tabla 9. Evaluación del depósito de calcio mediante la tinción con rojo de Alizarina.

Subpoblación	T0	T9	T21
MSCs	0.58 ± 0.06	1.04 ± 0.07	1.75 ± 0.07
CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁺	0.55 ± 0.06	1.58 ± 0.04*	2.14 ± 0.07*
CD73 ⁺ /CD44 ⁺ /CD105 ⁻	0.57 ± 0.06	1.98 ± 0.06*	2.76 ± 0.09*

Los valores muestran el contenido de calcio intracelular en $\mu\text{mol/mg}$ de proteína. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar (núm. = 3). * $p < 0.05$, comparación de la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ vs la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ en el mismo día.

4.8. Inmunogenicidad mediada por HLA-DR de las subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻

Un importante aspecto que hace a las células mesenquimales de membrana amniótica atractivas para su potencial uso en terapia basada en células madre es su baja antigenicidad, por lo cual decidimos evaluar mediante citometría de flujo la expresión de HLA-DR en las células mesenquimales obtenidas de la membrana amniótica, así como en las dos subpoblaciones que separamos (CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻) y en los osteoblastos diferenciados a partir de dichas subpoblaciones.

Las células obtenidas de la membrana amniótica mostraron un patrón negativo para el antígeno HLA-DR, lo cual nos estaría indicando su ausencia de inmunogenicidad (fig. 24). En las cuatro diluciones utilizadas del anticuerpo dirigido contra HLA-DR, se puede observar que las lecturas caen dentro del rango del control de isotipo.

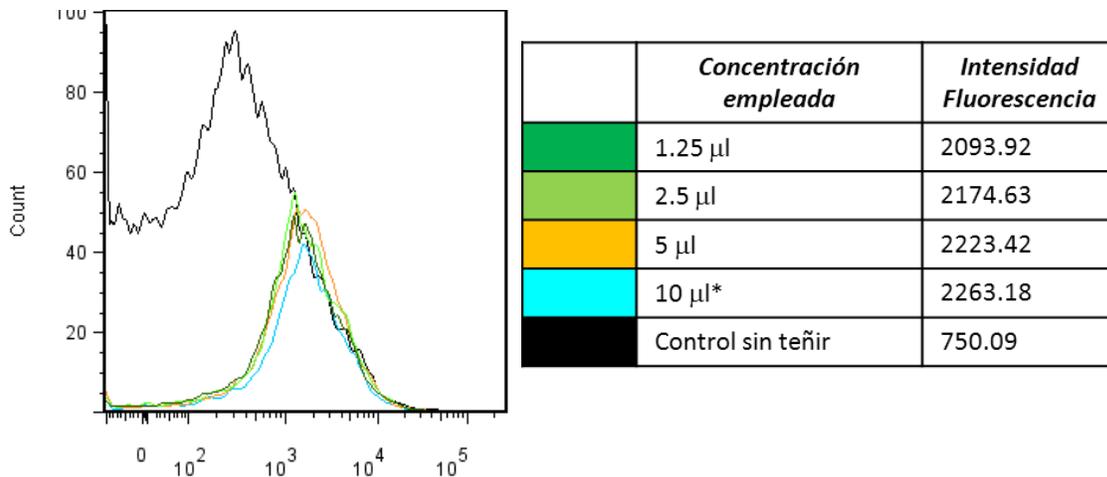


Fig. 24 Titulación del anticuerpo vs HLA-DR marcado con PerCP-Cy5.5. Se utilizaron 20,000 células madre mesenquimales de membrana amniótica de humano por cada tubo.

Al evaluar la expresión de HLA-DR en las dos subpoblaciones que separamos (CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻), así como en los osteoblastos diferenciados a partir de dichas subpoblaciones, esta característica de ser HLA-DR negativo se mantuvo (fig. 25). Estos resultados son de gran importancia para nuestro grupo de trabajo, puesto que estamos interesados en la utilización de estas células diferenciadas para proyectos en Ingeniería de Tejidos.

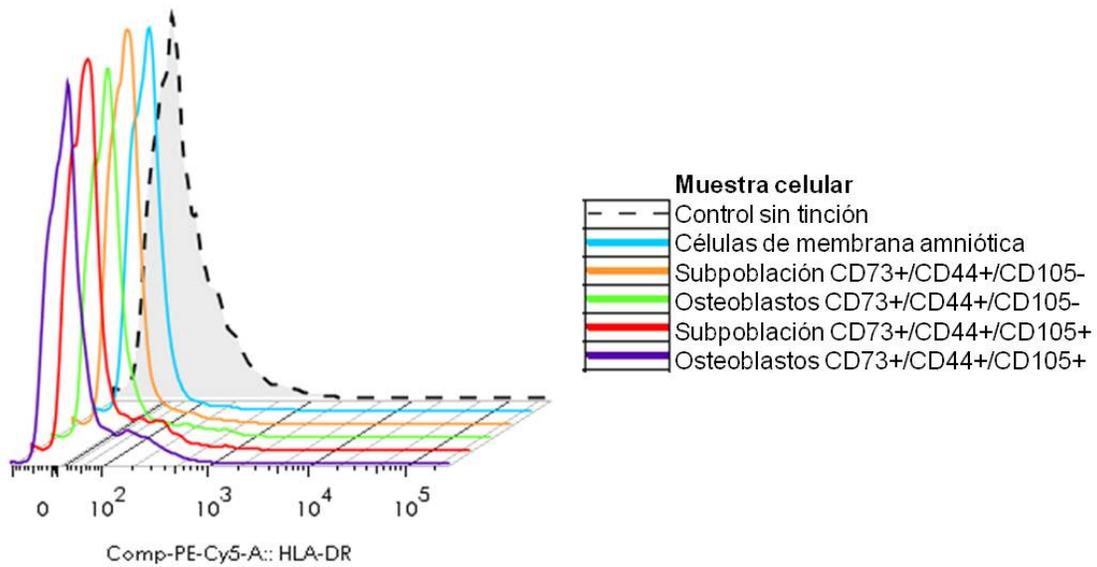


Fig. 25 Análisis de la expresión de HLA-DR mediante citometría de flujo. El ensayo se realizó utilizando 20,000 células madre mesenquimales de membrana amniótica de humano por cada tubo.

Capítulo V

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar una subpoblación homogénea de células madre mesenquimales obtenidas a partir de la membrana amniótica humana con características inmunofenotípicas específicas y con capacidad de diferenciación osteogénica *in vitro*.

Una de las mayores dificultades en la investigación en células madre es el proceso de identificación y discriminación de las células apropiadas. Debido a la carencia de marcadores específicos, las células madre mesenquimales (MSCs) han sido identificadas ya sea analizando sus capacidad de diferenciación en ensayos *in vitro* o *in vivo*, o bien mediante el análisis de los marcadores de superficie que la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT) ha recomendado como criterios mínimos para definir a estas células. Esta sociedad reconoce que el panel propuesto de antígenos no identifica exclusivamente a MSCs en comparación con algunas otras células, de ahí la importancia de utilizar dicho fenotipo de superficie en conjunto con otros criterios funcionales en el proceso de caracterización de estas células.

A pesar de que el fenotipo antigénico de las MSCs no es único y no se ha encontrado un marcador o marcadores para identificarlas y ayudar en su aislamiento, ciertos antígenos, en particular proteínas de superficie, han sido utilizados en un esfuerzo por caracterizar a las MSCs humanas mediante ensayos de inmunofenotipificación.

En este trabajo, utilizamos un análisis de citometría de flujo de triple tinción a fin de realizar la detección simultánea de los antígenos CD73, CD44 y CD105 a nivel de células individuales. Esta combinación de marcadores coexpresados y la carencia de antígenos hematopoyéticos representa una estrategia promisoría para la caracterización distintiva de las MSCs.

Trabajos previos como los de Majumdar *et al.*, (2000), Gronthos *et al.*, (2003), Fickert *et al.*, (2004), Aslan *et al.*, (2006), Martinez *et al.*, (2007), Maddox *et al.*, (2009), Arufe *et al.*, (2009 y 2010) y Jiang *et al.*, (2010) han reportado la separación de poblaciones con alguno de los antígenos de superficie característicos de MSCs mediante citometría de flujo o bien por separación celular magnética.

En el estudio realizado por Majumdar *et al.*, (2000), el anticuerpo anti-CD105 fue usado para aislar células de aspirados de médula ósea de humano; después de expansión en cultivo, estas células fueron diferenciadas *in vitro* en células condrogénicas y mostraron un inmunofenotipo característico a las MSCs.

Gronthos *et al.*, (2003) reportaron el aislamiento de una población altamente enriquecida de MSCs de médula ósea de humano adulto con potencial clonogénico en base al uso de STRO-1 en combinación con un anticuerpo dirigido contra VCAM-1/CD106 (molécula de adhesión celular vascular 1).

Aslan *et al.*, (2006), trabajando con médula ósea de humano, usaron el método de inmunoaislamiento basado en CD105 para obtener una población fresca, sin previo cultivo, de MSCs CD105⁺. En este estudio, demostraron que las MSCs CD105⁺ inmunoaisladas no cultivadas son multipotentes *in vitro* y muestran su capacidad para formar hueso *in vivo*.

Martinez *et al.*, (2007) reportaron la expresión del gangliósido neural GD2 en MSCs de médula ósea recién aisladas o expandidas en cultivo, así como en MSCs aisladas de tejido adiposo. Utilizando este marcador de superficie, realizaron la

inmunoselección magnética de una población con capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Maddox *et al.*, (2009), por otro lado, trabajaron con células de tejido adiposo murino, las cuales después de ser cultivadas, fueron separadas por citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra CD105, CD73 y CD90 de manera independiente. Este grupo mostró que la expresión de estos antígenos se incrementa con el cultivo, por lo que realizaron la separación positiva hasta el pase 8. Tanto la subpoblación CD73⁺ como la subpoblación CD105⁺ pudieron ser diferenciadas hacia el linaje osteogénico *in vitro*, a diferencia de la subpoblación CD90.2⁺, la cual no mostró un claro potencial osteogénico.

En nuestro grupo, el modelo de elección para el estudio de las células madre mesenquimales es la membrana amniótica a término de humano. Entre otras razones, porque se logra una alta eficiencia de recuperación de células madre mediante procedimientos no invasivos. Las células obtenidas de esta fuente muestran un alto potencial de expansión *in vitro* y capacidad de autorrenovación (Alviano *et al.*, 2007). Además, este tejido fetal es generalmente desechado, por lo que no representa ningún conflicto ético.

Para el aislamiento de las MSCs, nosotros utilizamos una estrategia basada en el tratamiento secuencial enzimático con tripsina y colagenasa; esta estrategia nos permitió digerir el tejido en un tiempo corto y con un alto rendimiento. Después de ser cultivadas, analizamos las células adherentes mediante citometría de flujo en escala logarítmica y observamos la presencia de dos poblaciones con características físicas (tamaño relativo y granularidad o complejidad interna relativa) distintas. A diferencia de trabajos previos como el de Smith *et al.*, (2004), nosotros sí observamos diferencias en el patrón de tinción con el anticuerpo dirigido contra CD105 en ambas poblaciones. Smith *et al.*, (2004), trabajando con MSCs de médula ósea, realizaron la separación de cuatro subpoblaciones definidas en base a sus características físicas en análisis por citometría de flujo, es decir en función de la dispersión de la luz láser (FSC vs SSC). Estos autores encontraron diferencias entre sus poblaciones en ensayos de clonogenicidad y de

diferenciación osteogénica; sin embargo al evaluar más de 200 antígenos no encontraron ninguno que discriminara efectivamente entre las poblaciones celulares que estudiaron.

Nos parece interesante señalar que en nuestro modelo, la más notable diferencia entre ambas subpoblaciones fue la expresión del antígeno CD105, el cual fue expresado por más del 6% de la población celular de mayor tamaño y mayor complejidad interna. En cuanto a la población de menor tamaño y mejor complejidad interna, estas células expresaron los antígenos CD73 y CD44, pero no el CD105.

Dicho porcentaje supera por mucho a la población de células madre mesenquimales encontradas en otros tejidos como la médula ósea en donde representan aproximadamente el 0.001% a 0.01% del total e inclusive comparada con tejidos como el cordón umbilical en donde se ha reportado una abundancia del 2.3%.

Schieker *et al.*, (2007) establecieron un método de inmunofluorescencia para detectar al mismo tiempo varios antígenos característicos de MSCs en una sola célula. El método que utilizó este grupo fue la adquisición de imagen espectral e incluyó el análisis de CD44, CD105, VCAM-1/CD106, colágena IV y fibronectina. Con base en el patrón de expresión simultáneo de estos antígenos, pudieron distinguir entre MSCs y osteoblastos de humano al observar la expresión positiva de los antígenos CD105 y VCAM-1/CD106 en las MSCs estudiadas y negativa para los osteoblastos.

En nuestro caso, decidimos realizar la separación de las poblaciones que habíamos observado mediante citometría de flujo utilizando triple marcaje con anticuerpos dirigidos contra los antígenos CD73, CD44 y CD105. Esto nos permitiría asignar cada célula a un grupo celular con el inmunofenotipo particular (específico) de nuestro interés. Decidimos separar tanto la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ como la subpoblación CD73⁺/CD44⁺CD105⁻ a fin de evaluar

sus características de superficie, así como su capacidad de diferenciación osteogénica *in vitro*.

A pesar de la variación en los fenotipos reportados de las subpoblaciones mesenquimales, se ha aceptado ampliamente que las células en cultivo, independientemente del método empleado en su aislamiento y cultivo, carecen de la expresión de antígenos hematopoyéticos prototipo incluyendo CD45, CD34, CD11b y CD14.

En este trabajo, evaluamos la expresión de los antígenos CD14, CD34 y CD45 mediante citometría de flujo en las subpoblaciones que habíamos separado. Como era de esperarse, tanto la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ como la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ carecen de la expresión de estos marcadores hematopoyéticos.

Por otra parte, evaluamos la expresión de los factores de transcripción OCT3/4 y NANOG en la población celular adherente mediante microscopía de fluorescencia y análisis confocal. OCT3/4 y NANOG, en conjunto con SOX2, constituyen un grupo crítico para la autorrenovación y el mantenimiento del estado pluripotente de las células madre embrionarias de humano y ratón y de las células de la masa interna del blastocisto. La expresión de estos genes es inhibida durante la diferenciación.

La importancia de estos factores para la pluripotencialidad ha sido destacada además por el advenimiento de la tecnología de células madre pluripotentes inducidas (iPS) (Takahashi *et al.*, 2007). Mediante esta tecnología, se realizó la generación de células iPS a partir de fibroblastos dérmicos de humano adulto con la transducción de OCT3/4, SOX2 y otros factores de transcripción. La mayoría de los protocolos con iPS no requiere NANOG exógeno, el cual es activado por OCT3/4 y otros factores introducidos.

De manera por demás interesante, en nuestros ensayos de microscopía de fluorescencia observamos que el 100% de la población celular adherente mostró

la expresión del factor de transcripción NANOG, mientras que más del 70% de las células expresaron OCT3/4. Estos ensayos nos permiten atribuirle la jerarquía (categoría) de células madre, con base en su potencialidad, a la población celular que hemos aislado de la membrana amniótica a término.

Corroboramos la presencia de OCT3/4 y NANOG mediante ensayos de RT-PCR, en los cuales pudimos observar la amplificación de transcritos correspondientes a estos marcadores de pluripotencialidad.

Adicionalmente, evaluamos la expresión de los factores de transcripción SOX2, OCT3/4 y NANOG en las subpoblaciones celulares CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mediante microscopía de fluorescencia y análisis confocal. En estos ensayos observamos que el 100% de las células de ambas subpoblaciones mostraron la expresión de estos marcadores relacionados con el mantenimiento de la potencialidad de las células madre.

Las dos subpoblaciones de células madre mesenquimales fueron inducidas a diferenciación osteogénica utilizando una mezcla inductora conteniendo dexametasona, β-glicerofosfato, ascorbato de sodio. Utilizando estas condiciones de cultivo, nos dimos a la tarea de evaluar la actividad de la fosfatasa alcalina ósea (FAO) a lo largo de una cinética del proceso de diferenciación osteogénica, con lo cual podríamos definir la segunda etapa de diferenciación, correspondiente al desarrollo y maduración de la matriz extracelular. Para el caso de la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ se encontró un pico de actividad de la FAO al día 5 de inducción, mientras que para la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺, este pico se ubicó al día 9 de la inducción. Estos tiempos corresponden al punto de transición que marca el final de la segunda etapa del desarrollo del fenotipo del osteoblasto y el comienzo de la etapa de mineralización de la matriz extracelular (Lian *et al.*, 1995). Los ensayos que realizamos con rojo de Alizarina nos permiten concluir que ambas subpoblaciones celulares dieron origen a osteoblastos maduros tomando como base su capacidad de mineralización.

Por otra parte, un importante aspecto que hace a las MSCs procedentes de la membrana amniótica muy atractivas para su potencial uso en terapia basada en células madre es su baja antigenicidad. Estas células carecen o muestran una muy baja expresión de antígenos HLA clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y prácticamente no expresan antígenos clase II (HLA-DR). Inicialmente evaluamos la presencia del antígeno HLA-DR en la población celular total aislada de la membrana amniótica, la cual mostró un fenotipo negativo para este antígeno. Posteriormente, investigamos la expresión de HLA-DR en las dos subpoblaciones que habíamos separado por citometría de flujo ($CD73^+/CD44^+/CD105^+$ y $CD73^+/CD44^+/CD105^-$), así como en los osteoblastos diferenciados a partir de dichas subpoblaciones. Interesantemente, en todos los casos observamos que, independientemente del proceso de cultivo o de diferenciación osteogénica, las células mantuvieron el inmunofenotipo HLA-DR negativo. Este resultado es verdaderamente significativo considerando que, en la actualidad, el uso de las células madre para Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa es uno de los caminos más atractivos para los investigadores en esta área.

Capítulo VI

CONCLUSIONES

- 1.- Establecimos con éxito el cultivo de una población celular adherente obtenida mediante la digestión secuencial con tripsina y colagenasa de la membrana amniótica a término de humano.
- 2.- Separamos mediante citometría de flujo dos subpoblaciones celulares en base a la expresión de los antígenos de superficie CD73, CD44 y CD105.
- 3.- Analizamos, de acuerdo con los lineamientos establecidos por la Sociedad Internacional para Terapia Celular, el fenotipo de las subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻. Reportamos que ambas subpoblaciones se caracterizan por la ausencia de expresión de los antígenos hematopoyéticos CD34 y CD45, así como del marcador de monocitos CD14.
- 4.- Evaluamos en las dos subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ la capacidad de diferenciación osteogénica utilizando una mezcla inductora conteniendo dexametasona, β-glicerofosfato y ascorbato de sodio.
- 5.- Definimos la temporalidad de la etapa de maduración de la matriz ósea, en la que principalmente ocurren cambios en la composición y organización de la matriz (modificaciones que la hacen competente para ser mineralizada). En la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻, el punto de transición correspondió al día 5, mientras que en la subpoblación CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺, correspondió al día 9 de inducción osteogénica.

6.- Determinamos la capacidad de mineralización en la población celular adherente y en las subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mediante ensayos de tinción con rojo de Alizarina.

7.- Observamos la expresión de los marcadores de pluripotencialidad OCT3/4 y NANOG en la población celular adherente mediante microscopía de fluorescencia y análisis confocal. Corroboramos la presencia de OCT3/4 y NANOG mediante ensayos de RT-PCR.

8.- Determinamos la expresión de los factores de transcripción SOX2, OCT3/4 y NANOG en el 100% de las células de las subpoblaciones CD73⁺/CD44⁺/CD105⁺ y CD73⁺/CD44⁺/CD105⁻ mediante ensayos de microscopía de fluorescencia y análisis confocal.

9.- Observamos que las células adherentes de la membrana amniótica, las subpoblaciones celulares obtenidas por citometría de flujo, así como los osteoblastos diferenciados a partir de ambas subpoblaciones, mostraron un fenotipo negativo para el antígeno HLA-DR.

Capítulo VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aflatoonian B, Moore H. Germ cells from mouse and human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2006 Nov;132(5):699-707.

Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007 Feb 21;7:11.

Anjos-Afonso F, Bonnet D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):1298-306.

Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes-Boquete I, De Toro FJ, Blanco FJ. Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *J Cell Biochem*. 2009 Sep 1;108(1):145-55.

Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes I, de Toro FJ, Blanco FJ. Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes. *J Cell Biochem*. 2010 Nov 1;111(4):834-45.

Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells*. 2006 Jul;24(7):1728-37.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.

Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Nov 30;289(2):519-24. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Feb 8;290(5):1609.

Botella LM, Sanz-Rodriguez F, Sanchez-Elsner T, Langa C, Ramirez JR, Vary C, Roughley PJ, Bernabeu C. Lumican is down-regulated in cells expressing endoglin. Evidence for an inverse relationship between Endoglin and Lumican expression. *Matrix Biol*. 2004 Jan;22(7):561-72.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005 Sep 23;122(6):947-56.

Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995 Feb;52(2):113-33.

Brockes JP, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science*. 2005 Dec 23;310(5756):1919-23.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64(2):278-94.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2396-402.

Chen XD, Qian HY, Neff L, Satomura K, Horowitz MC. Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. *J Bone Miner Res*. 1999 Mar;14(3):362-75.

Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*. 1994 Jan;134(1):277-86.

Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 3;98(14):7841-5.

Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999 Oct;181(1):67-73.

Curry TE Jr, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev*. 2003 Aug;24(4):428-65.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000 Aug;28(8):875-84.

Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol*. 2000 Nov;85(6):645-51.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):92-7.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154–156, 1981.

Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;996:235-44.

Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(5):R422-32.

Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med*. 2004 Jun 11;2(1):18.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393-403.

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92.

Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther*. 2003 May;98(2):257-65.

Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002 Jun;8(6):607-12.

Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem*. 2003 Jul 25;278(30):28067-78.

Grol MW, Panupinthu N, Korcok J, Sims SM, Dixon SJ. Expression, signaling, and function of P2X7 receptors in bone. *Purinergic Signal*. 2009 Jun;5(2):205-21.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001 Oct;189(1):54-63.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003 May 1;116(Pt 9):1827-35.

Grünewald JK, Ridley AJ. CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. *J Inflamm (Lond).* 2010 Feb 5;7(1):10.

Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem.* 2002 Aug 9;277(32):29197-209.

Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C; Eds. Bone tissue engineering; CRC press: New York, 2005.

Hong L, Sultana H, Paulius K, Zhang G. Steroid regulation of proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a gender difference. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009 Apr;114(3-5):180-5.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.

Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2004;6(6):543-53.

Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta.* 2009 Jan;30(1):2-10.

in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.* 2003 Aug;88(8):845-52.

in 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells.* 2004;22(7):1338-45.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol.* 2002 Aug;30(8):896-904.

Jiang T, Liu W, Lv X, Sun H, Zhang L, Liu Y, Zhang WJ, Cao Y, Zhou G. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2010 May;31(13):3564-71.

Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006 Oct;12(10):1167-74.

Kellner S, Kikyo N. Transcriptional regulation of the OCT3/4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol Histopathol*. 2010 Mar;25(3):405-12.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-301.

Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*. 2004 Jul 19;200(2):123-35.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997 May 30;89(5):755-64.

Krinner A, Hoffmann M, Loeffler M, Drasdo D, Galle J. Individual fates of mesenchymal stem cells in vitro. *BMC Syst Biol*. 2010 May 27;4:73.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6.

Lastres P, Martín-Perez J, Langa C, Bernabéu C. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J*. 1994 Aug 1;301 (Pt 3):765-8.

Lastres P, Letamendía A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, López LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabéu C. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol*. 1996 Jun;133(5):1109-21.

Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J*. 2000 Jan;14(1):55-64.

Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J*. 1995;15:118-40.

Loeffler M, Roeder I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach. *Cells Tissues Organs*. 2002;171(1):8-26.

Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2006 Apr;38(4):431-40.

Loh YH, Ng JH, Ng HH. Molecular framework underlying pluripotency. *Cell Cycle*. 2008 Apr 1;7(7):885-91.

Low MG, Kincade PW. Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature*. 1985 Nov 7-13;318(6041):62-4.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.

Maddox JR, Liao X, Li F, Niyibizi C. Effects of Culturing on the Stability of the Putative Murine Adipose Derived Stem Cells Markers. *Open Stem Cell J*. 2009 Jan 1;1:54-61.

Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol*. 2000 Oct;185(1):98-106.

Marks SC Jr, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat*. 1988 Sep;183(1):1-44.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634-7638, 1981.

Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4245-8. Erratum in: *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):826.

Meyer U, Wiesmann HP. Bone and cartilage engineering; Springer: Verlag Berlin Heidelberg, 2006.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008 Jan;26(1):101-6.

Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2008 Apr 29;15:88-99.

Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* 2009 May;4(3):423-33.

Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 2008 Feb;26(2):300-11.

Parry S, Strauss JF 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 1998 Mar 5;338(10):663-70.

Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):648-55.

Phillips JE, Gersbach CA, Wojtowicz AM, García AJ. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci.* 2006 Feb 1;119(Pt 3):581-91.

Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 1999 Mar 15;72(4):570-85.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Poirier J, Ribadeau JL, Catala M, André JM, Gherardi R, Bernaudin JF. *Histología; Masson: Barcelona, 2002.*

Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Mar;194(3):664-73.

Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulsom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol*. 2003 Apr;56(2):86-96.

Prósper F, Verfaillie CM. [Adult stem cells]. *An Sist Sanit Navar*. 2003 Sep-Dec;26(3):345-56.

Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Wan W, Ratajczak J, Wojakowski W, Kucia M. Hunt for pluripotent stem cell -- regenerative medicine search for almighty cell. *J Autoimmun*. 2008 May;30(3):151-62.

Robey PG, Bianco P. The use of adult stem cells in rebuilding the human face. *J Am Dent Assoc*. 2006 Jul;137(7):961-72.

Rouvière H, Delmas A. Anatomía humana descriptiva, topográfica y funcional; Masson S. A.: Barcelona, 2005.

Ruiz Romero G, Moreno M, López M, Vega M. Medicina Regenerativa y Terapia Celular. Informe de Vigilancia Tecnológica. GENOMA ESPAÑA/FUAM, 2008.

Sadler TW. Langman Embriología médica. Con orientación clínica. 9a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2004.

Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Böcker W, Guelkan H, Neth P, Jochum M, Mutschler W. Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat*. 2007 May;210(5):592-9.

Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, Schmidt BT, Askew Y, Nance JJ, Evron JM, Peault B, Deasy BM. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:789526.

Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jun 8;284(2):411-8.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13726-31.

Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells*. 2004;22(5):823-31.

Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 Jul-Aug;1(4):296-305.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988 Jul 1;241(4861):58-62.

Stevens LC. The biology of teratomas. *Adv Morphog.* 1967;6:1-31.

Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today.* 2008;11(5):18-25.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res.* 2004 May 1;295(2):395-406.

Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 2004 Jun;19(6):1450-6.

Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2002:369-91.

Wiesmann A, Bühring HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med.* 2006 Mar 31;2:8.

Williams AF, Gagnon J. Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. *Science.* 1982 May 14;216(4547):696-703.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.

Zeidán-Chuliá F, Noda M. "Opening" the mesenchymal stem cell tool box. *Eur J Dent.* 2009 Jul;3(3):240-9.

Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, Demetriou A, Wu GD. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):928-35.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477-88.