



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

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

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A

PRESENTA
ERIKA HAYDÉ HERNÁNDEZ ESTÉVEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

ASESOR INTERNO
DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

SEPTIEMBRE 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **HERNÁNDEZ ESTÉVEZ ERIKA HAYDÉ**, con número de cuenta **096392780**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **04** del mes de **septiembre** de 2012 a las **10:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

VOCAL DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS*

SECRETARIO DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

SUPLENTE DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

SUPLENTE DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

El título de la tesis que presenta es: **Análisis comparativo de la morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación de las células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea, placenta y vena de cordón umbilical.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 25 de junio de 2012.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NUÑEZ
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
DR. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ
JEFE DE CARRERA

Si he conseguido ver más lejos, es porque me he subido en hombros de gigantes.

Isaac Newton

Aquel que duda y no investiga, se torna no sólo infeliz, sino también injusto.

Blaise Pascal

El esqueleto de la ciencia son los hechos, pero los músculos y los nervios son el significado que se les confiere, y el alma de la ciencia son las ideas.

Ruy Pérez Tamayo

"El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos son también útiles, porque, bien analizados, pueden conducir al éxito. Y para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea..."

Alexander Fleming

*A mis padres
Por enseñarme que sí lo puedes soñar, lo puedes lograr
Por estar siempre a mi lado
Por ser mi inspiración
Por que mis sueños y mis logros, son también suyos*

*A mis hermanas
Por la aventura de crecer juntas y de compartir esta excéntrica
familia*

*A Alan y Alinne
Por existir*

*Al Dr. Juan José Montesinos
Por ser mi profesor
Por su paciencia
Por el gusto de trabajar juntos*

*A todos los que de alguna forma u otra contribuyeron en la
realización de este trabajo.*

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
I. INTRODUCCIÓN	7
1. La Médula Ósea	7
2. El Sistema Hematopoyético	8
3. El Sistema Estromal	9
4. Las Células Troncales Mesenquimales	12
5. Aplicación Clínica de las CTMs	23
6. Fuentes Alternativas de CTMs	30
7. Placenta y Vena de Cordón Umbilical	32
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
III. HIPÓTESIS	40
IV. OBJETIVOS	41
1. Objetivo General	41
2. Objetivos Particulares	41
V. METODOLOGÍA	42
1. Obtención de muestras	42
2. Obtención y cultivo de CTMs	42
3. Detección de CFU-F	43
4. Morfología de las CTMs	44
5. Inmunofenotipo de CTMs	44
6. Capacidad de diferenciación Osteogénica, Adipogénica y Condrogénica	44
7. Inducción de Diferenciación Neural y Expresión de Proteínas Neurales	45
8. Análisis Estadístico	46

VI. RESULTADOS	47
1. Obtención de CTMs de MO, PL y VCU	47
2. Porcentaje de Obtención y Frecuencia de CTMs en MO, PL y VCU	47
3. Morfología de CTMs de MO, PL y VCU	50
4. Inmunofenotipo de CTMs de MO, PL y VCU	53
5. Capacidad de Diferenciación de las CTMs de MO, PL y VCU	57
5.1. Capacidad de Diferenciación Osteogénica	57
5.2. Capacidad de Diferenciación Adipogénica	59
5.3. Capacidad de Diferenciación Condrogénica	61
6. Capacidad de diferenciación Neural y Expresión de Proteínas Neurales en CTMs de MO, PL y VCU	63
 VII. DISCUSIÓN	 66
 VIII. CONCLUSIONES	 78
 IX. PERSPECTIVAS	 79
 X. BIBLIOGRAFÍA	 81

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA:	6-hidroxidopamina
APC:	célula presentadora de antígeno
BDNF:	factor de crecimiento derivado de cerebro
BMP-4:	proteína morfogenética de hueso 4
BSA:	albúmina de suero bovino
CFC:	célula formadora de colonias
CFU-F:	unidad formadora de colonias de fibroblastos
CMN:	células mononucleares
CPH:	célula progenitora hematopoyética
CTH:	célula troncal hematopoyética
CTM:	célula troncal mesenquimal
DC:	célula dendrítica
D-MSC:	células troncales mesenquimales de la decidua
EGF:	factor de crecimiento epidermal
EICH:	enfermedad de injerto contra huésped
FGF:	factor de crecimiento de fibroblastos
G-CSF:	factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF:	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HGF:	factor de crecimiento de hepatocitos
hAEC:	células amnióticas epiteliales humanas
hAMSC:	células estromales amnióticas mesenquimales humanas
hCMSC:	células estromales coriónicas mesenquimales humanas
hCTC:	células trofoblásticas coriónicas humanas
IGF-1:	factor de crecimiento parecido a la insulina
IL:	interleucina
INF- α :	interferón alfa
LIF:	factor inhibidor de leucemia
LTC-IC:	célula iniciadora de cultivos a largo plazo
MAP2:	proteína 2 asociada a microtúbulos
M-CSF:	factor estimulante de colonias de macrófagos
MHC:	moléculas de histocompatibilidad
MLR:	reacción mixta de linfocitos

MO:	médula ósea
Mo Abs:	anticuerpos monoclonales
MPC:	célula progenitora mesenquimal
NeuN:	proteína de núcleo neuronal
NF-200:	neurofilamento 200
NGF:	factor de crecimiento neural
OI:	osteogénesis imperfecta
OSM:	oncostatina M
PAGF:	proteína ácida glial fibrilar
PBS:	solución buffer de fosfatos
PCI:	intervención coronaria percutánea
PDGF:	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR- β :	receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta
PL:	placenta
Po Abs:	anticuerpo policlonal
SCF:	factor de células troncales
SCI:	daño completo a la médula espinal
SDF-1:	factor derivado del estroma
SFB:	suero fetal bovino
SNC:	sistema nervioso central
TGF- β :	factor de crecimiento transformante beta
TNF- α :	factor de necrosis tumoral alfa
Treg:	linfocitos T reguladores
VCU:	vena de cordón umbilical
VEGF:	factor de crecimiento vascular endotelial
Wnts:	homólogo mamífero de Drosophila Wingless
α -SMA:	alfa actina del músculo liso

RESUMEN

En los últimos años las Células Troncales Mesenquimales (CTMs) han despertado gran interés debido a la capacidad de ser diferenciadas a células de distintos tejidos y con ello al potencial terapéutico que poseen. La principal fuente de este tipo de células es la Médula Ósea (MO), sin embargo existen algunos inconvenientes con ello, dado que la obtención de aspirados de MO representa por sí misma un método invasivo para el donador, además de la falta de donadores histocompatibles e incluso a la disminución en número y potencial de las CTMs presentes en donadores adultos. Por lo anterior, se han propuesto fuentes alternativas de CTMs como la Placenta (PL) y la Vena De Cordón Umbilical (VCU), las cuales todavía son fuentes controversiales debido a que no se conocen muchas de sus características biológicas. En el presente trabajo se obtuvieron CTMs de MO, PL y VCU y se realizó un estudio de manera comparativa mediante el análisis de su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos, condroblastos y células neurales. Se obtuvieron CTMs en el 100% de las muestras de MO y PL analizadas y en 10% de las muestras de VCU. Se observó una menor frecuencia de CTMs en PL en comparación con MO, mientras que en VCU no fue posible evaluar este parámetro. Con el análisis morfológico determinamos la presencia de 4 tipos celulares morfológicamente distintos (células grandes, fibroblastoides, pequeñas y neurales) en cultivos provenientes de las tres fuentes. De igual forma, las CTMs de las tres fuentes fueron negativas para la expresión de marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34, CD45 así como para CD62L y HLA-DR y positivos para los marcadores considerados como característicos de células mesenquimales como CD73, CD90 y CD105, sin embargo presentaron variación en la expresión de CD90, al igual que CD105 en VCU. De manera interesante se observó una expresión alta y homogénea del antígeno CD13, por lo que proponemos a este marcador como característico de CTMs en las tres fuentes estudiadas. Por otra parte, las CTMs provenientes de PL y VCU fueron capaces de diferenciarse hacia osteoblastos y adipocitos de forma similar a aquellas de MO. Además las CTMs de PL y VCU al igual que de MO, se diferenciaron hacia condroblastos y se observó una mayor proporción en la formación de cartílago hialino con respecto al cartílago fibroso. En el análisis morfológico de las CTMs se observaron células con características neurales, debido a ello se analizó la presencia de proteínas neuronales (Nestina, NF200, MAP2, NeuN) y de astrocitos (PAGF) en los cultivos de las tres fuentes,

además se evaluó la capacidad para ser diferenciadas hacia células de linaje neural. En todos los cultivos se observó la expresión de estas proteínas, tanto en ausencia como en presencia de medio de inducción neural, lo cual demuestra la capacidad de ser inducidas a células con características neurales y además sugiere la existencia de una subpoblación mesenquimal con un potencial neural intrínseco. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de CTMs tanto en PL como en VCU, sin embargo podemos decir que PL es una fuente más adecuada, ya que presenta un porcentaje de obtención de CTMs igual al de MO y las características biológicas de estas células son muy similares en ambas fuentes.

I. INTRODUCCION

1. La Médula Ósea

La Médula Ósea (MO) ocupa las cavidades cilíndricas de los huesos largos y los intersticios esponjosos de las vértebras, costillas, esternón y los huesos planos del cráneo y la pelvis. Su masa total en un adulto es de 2,600 g aproximadamente (4-6% del peso corporal). La irrigación sanguínea tiene lugar a través de la pared ósea. La MO contiene amplios senos cuyo revestimiento parietal se compone de células fagocíticas (macrófagos); tienen por debajo una lamina basal llena de lagunas. Los vasos sanguíneos de la MO forman un sistema cerrado (Bloom y Fawcett, 1994).

Todas las células presentes en la sangre se derivan de una pequeña población de células troncales hematopoyéticas, las cuales se localizan en la MO. Las células troncales originan células progenitoras que proliferan y maduran hacia los diferentes linajes sanguíneos. Las células sanguíneas a distintos estadios de maduración constituyen el sistema hematopoyético y al proceso mediante el cual se forman todas las células de la sangre se le denomina hematopoyesis (Figura 1). Debido a que las células maduras presentes en la sangre periférica tienen una vida limitada, es necesaria su constante producción y para ello el sistema hematopoyético es capaz de regular los procesos de expansión, compromiso, proliferación y sobrevivencia de las células hematopoyéticas (Till y McCulloch, 1980).

La MO cuenta con una red de células estromales (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos) y células accesorias (monocitos y linfocitos) que producen citocinas y proteínas de matriz extracelular. En conjunto, estos elementos conforman lo que se denomina como microambiente hematopoyético, en el cual las células hematopoyéticas son capaces de proliferar y diferenciarse hacia los distintos linajes sanguíneos, mediante el contacto directo con las células estromales y por influencia de las citocinas y matriz extracelular presentes en dicho microambiente (Nicola, 1989; Mayani et al, 1992; Hubin et al, 2005; Panoskaltsis et al, 2005 Adams y Scadden, 2006). Por lo tanto, se puede decir que la MO está constituida por dos sistemas: el hematopoyético y el estromal (Bianco et al, 2001).

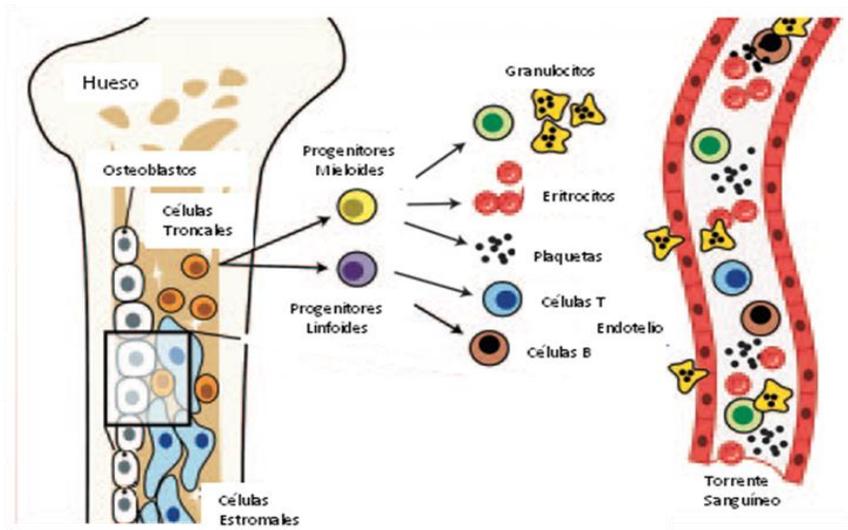


Figura 1. Sistema Hematopoyético y Sistema Estromal presentes en la MO
(Modificado de Russell, 2005)

2. El Sistema Hematopoyético

Las células que forman el sistema hematopoyético se pueden agrupar en cuatro compartimientos: El primero de ellos corresponde a las Células Troncales Hematopoyéticas (CTH), con capacidad de autorenovación y de dar origen a todas las células de la sangre durante la vida del individuo (McCulloch, 1993; Berardi et al, 1995); éstas constituyen el 0.005% del total de células en la MO. El segundo compartimiento corresponde a las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH), incapaces de autorenovarse y con características de pluripotencialidad, bipotencialidad y monopotencialidad (Ogawa et al, 1983); en conjunto, las CPH constituyen el 0.15% de las células de la MO. El tercer compartimiento comprende a las células precursoras reconocibles por su morfología y que corresponden a >99.5% de las células presentes en la médula ósea. Finalmente, las células maduras circulantes (cuarto compartimiento), que representan el último estadio de diferenciación de los elementos hematopoyéticos. Este modelo de clasificación indica que existe una jerarquía hematopoyética, en donde las células troncales son los elementos más primitivos que dan lugar a la formación de todos los constituyentes del sistema hematopoyético (Figura 2).

Existen, actualmente, diversos métodos funcionales para la identificación y

cuantificación de las CTH, uno de ellos es aquel que permite la identificación de células que inician y mantienen la hematopoyesis *in vitro* a largo plazo, al ser cultivadas en presencia de capas adherentes de células estromales que funcionan como soporte de crecimiento. A estas células se les denomina Células Iniciadoras De Cultivos A Largo Plazo (LTC-IC, por sus siglas en inglés; Figura 2), y se caracterizan por su capacidad para generar CPH por periodos superiores a las 5 semanas de cultivo (Sutherland et al, 1990). En cuanto a las CPH, su identificación y cuantificación son realizadas por medio de métodos más sencillos; básicamente, a través de su capacidad para formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos (metilcelulosa o agar), de ahí que sean conocidas como células formadoras de colonias (CFC; Metcalf, 1977).

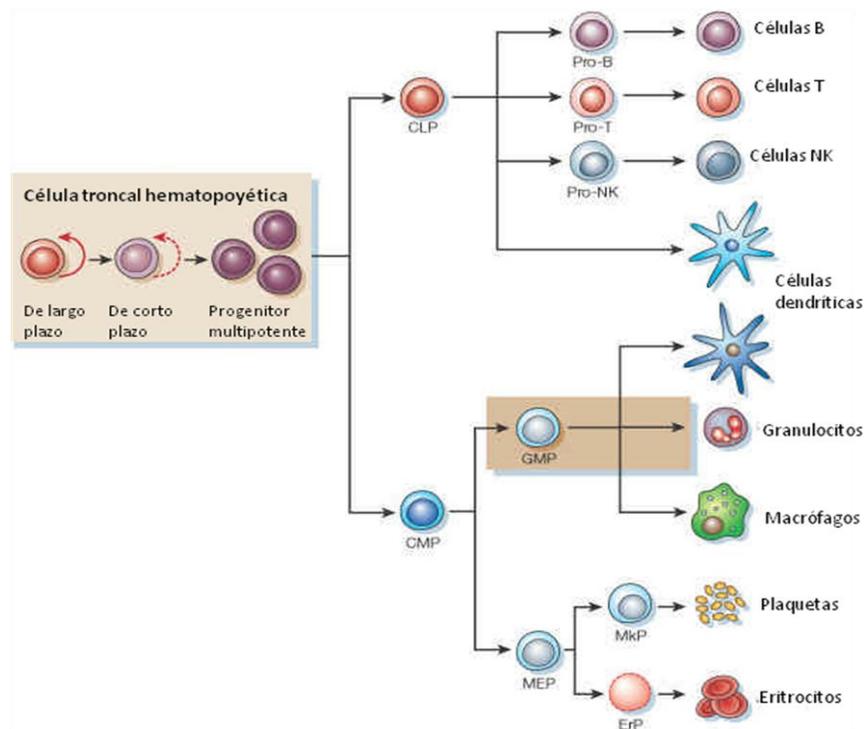


Figura 2. Los cuatro compartimentos del Sistema Hematopoyético (Modificado de Reya et al, 2001)

3. El Sistema Estromal

Las células estromales son residentes permanentes de la MO y además de ser un soporte físico, sintetizan y secretan citocinas y moléculas que forman parte de la matriz extracelular, necesarias para regular la autorenovación, diferenciación, maduración y migración de las células hematopoyéticas (Mayani et al, 1992). Las

células del estroma incluyen: células reticulares, células endoteliales, adipocitos, osteoblastos (Russell, 1996) y macrófagos (Figura 3). Las células reticulares (adventicias y fibroblásticas) representan el componente más abundante tanto *in vivo* como *in vitro*. Las células adventicias están localizadas *in vivo* alrededor de los sinusoides venosos y su papel principal es el de regular la migración de las células sanguíneas maduras de la médula a la circulación. Por su parte, las células fibroblásticas se encuentran en contacto directo con las células granulocíticas inmaduras; además tienen la capacidad de producir citocinas como Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF), Factor de Células Troncales (SCF), Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) y moléculas de la matriz extracelular como la colágena tipo I y III y fibronectina (Dorshkind, 1990; Deryugina y Müller-Sieburg, 1993; Mendoza et al, 1990).

Las células endoteliales son las encargadas de revestir a los vasos sanguíneos de la médula. Las células endoteliales se localizan en asociación con otros tipos celulares como los fibroblastos, los adipocitos, los megacariocitos maduros, las células plasmáticas y las células hematopoyéticas, formando una interfase entre la circulación y el compartimento hematopoyético. Lo anterior sugiere que las células endoteliales controlan los últimos estadios de la hematopoyesis mediante interacciones celulares directas y regulando la entrada de células maduras a la circulación periférica. Estas células también pueden regular la hematopoyesis a través de la producción de moléculas de la matriz extracelular como la colágena tipo IV y la laminina (Rafii, 1994).

Otros tipos de células estromales son los adipocitos y los osteoblastos, los primeros ocupan el mayor espacio de la médula ósea de los mamíferos adultos (médula amarilla) y se piensa que producen factores inhibidores de la hematopoyesis. En los cultivos a largo plazo aparecen cuando los cultivos son avanzados y la hematopoyesis declina (Mayani et al, 1992; Dorshkind, 1990). Por su parte los osteoblastos secretan activamente la matriz del hueso y se ha demostrado que se localizan en regiones cercanas a las células hematopoyéticas primitivas dentro de la cavidad medular. Además son capaces de secretar algunas citocinas como el G-CSF, GM-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF), IL-1, IL-6, Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) y Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α ; Igotz y Massague, 1986; Hauschka et al, 1986).

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

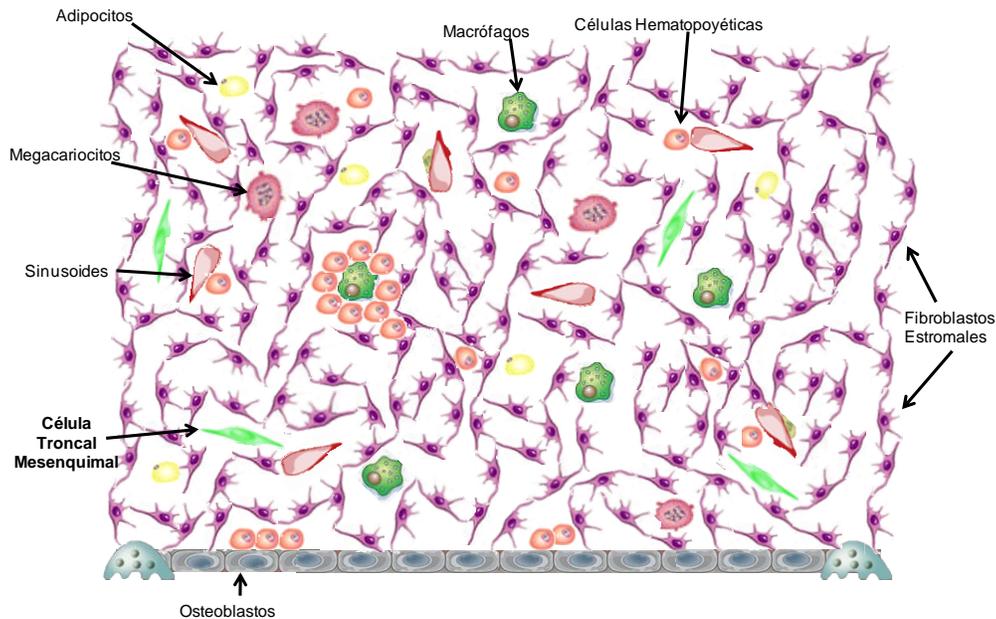


Figura 3. Células del Sistema Estromal. Origen Mesenquimal: Adipocitos, Fibroblastos, Sinusoides, Osteoblastos. Origen Hematopoyético: Macrófagos.

También esta presente la matriz extracelular que es una estructura altamente organizada, compuesta de glicoproteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos que son secretadas por las células del estroma medular. Entre las funciones de la matriz se incluyen: la mediación de la unión celular, la unión de factores de crecimiento y la inducción de la autorenovación y diferenciación de las células hematopoyéticas (Gordon, 1988). La adhesión de las células hematopoyéticas a las células del estroma es importante para el control de la liberación de las células maduras hacia la sangre. Esta adhesión está mediada por las moléculas de la matriz extracelular y por la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células hematopoyéticas (Blair y Thomas, 1997).

4. Células Troncales Mesenquimales.

Como hemos visto existen en la Médula Ósea (MO) dos sistemas de manera primordial (Figura 1), el sistema hematopoyético que es capaz de formar a todas las células de la sangre (Figura 2) y el sistema estromal (Figura 3), el cual se ha definido de manera tradicional como el soporte sobre el cual proliferan y se diferencian las células hematopoyéticas (Deans y Moseley, 2000). Sin embargo este concepto se ha modificado y en la actualidad se sabe que el sistema estromal esta conformado por células troncales estromales o también denominadas Células Troncales Mesenquimales (CTMs), que son capaces de originar a cada uno de los diferentes linajes celulares diferenciados que se pueden distinguir en este sistema, como osteoblastos, adipocitos, células endoteliales y fibroblastos estromales (Short, 2003).

Las CTMs son células clonogénicas que además de originar células del mesodermo (osteoblastos, condrocitos, células endoteliales) se diferencian en células ectodermales (células neuronales; Kassem, 2004) y endodermales (células pulmonares y pancreáticas). Son adherentes, no fagocíticas, con morfología fibroblastoide y capaces de mantener la mielopoyésis (Figura 4).

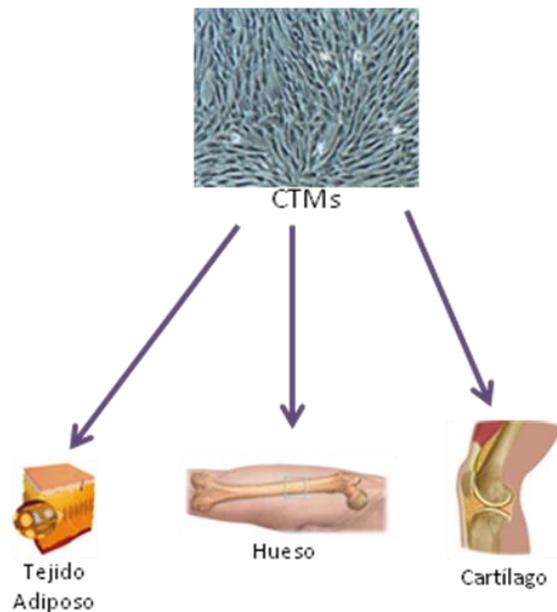


Figura 4. Capacidad de diferenciación de las CTMs. Adipogénico (adipocitos), osteogénico (hueso) y condrogénico (cartílago).

En 1869 Goujon fue el primero en reportar la presencia de células con potencial osteogénico en MO de conejo (Goujon, 1869). Posteriormente, Friedenstein y cols. las describieron en 1968 como aquellas con características adherentes, clonogénicas, no fagocíticas y con capacidad de formar colonias de tipo fibroblastoide (definidas como Unidades Formadoras de Colonias Fibroblásticas; CFU-F, por sus siglas en inglés) y que pueden ser aisladas de suspensiones celulares de médula ósea de organismos post-natales, al ser cultivadas en medio líquido a densidades celulares apropiadas (10^4 - 10^5 células/cm²). De hecho, estos investigadores encontraron que los CFU-Fs pueden bajo condiciones experimentales adecuadas, dar lugar a la formación de tejido conectivo diferenciado en donde se incluye cartílago, hueso, tejido adiposo, tejido fibroso y células adherentes capaces de mantener la mielopoyesis (Friedenstein, 1974). El concepto de célula troncal mesenquimal fue propuesto por Maureen Owen y cols. (Owen, 1988) basados en parte en los trabajos de Friedenstein.

Estudios sobre las CFU-Fs obtenidas a partir de aspirados de MO humana han demostrado que se producen entre 1 y 20 de este tipo de colonias por cada 1×10^5 células mononucleares sembradas (Castro-Malaspina et al, 1980; Simmons y Torok-Storb, 1991). La proliferación de CFU-F *in vitro* esta regulada por diferentes factores como el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF; Owen, et al, 1987), el factor de crecimiento epidermal (EGF; Gronthos y Simmons, 1995) y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico-2 (FGF-2; Bianchi, 2003). De igual manera se han detectado algunos inhibidores de la formación de colonias de CFU-F, como el Interferón-alfa (INF- α) e Interleucina-4 (IL-4) que bajo condiciones *in vitro* inhibieron la formación de colonias estimuladas por la combinación de EGF y PDGF (Gronthos y Simmons, 1995; Wang et al, 1990).

Por otra parte, un aspecto importante es la localización anatómica de las células mesenquimales en la médula ósea. Algunos estudios sugieren que este tipo de células se localizan en las paredes de la red vascular sanguínea de la médula ósea, dado que se ha demostrado que las CFU-F obtenidas expresan Actina de Músculo Liso alfa (α -SMA; Gronthos et al, 2003), y las células capaces de expresar esta proteína se limitan a los pericitos capilares, a las células que revisten la superficie del endosteo y a las células de músculo liso vascular de las arterias medulares. En contraparte esta proteína no se ha detectado en las células reticulares de los nichos hematopoyéticos,

en adipocitos o células endoteliales vasculares (Bianco et al, 2001). De igual forma en células mesenquimales cultivadas se han detectado proteínas adicionales características de pericitos y células de músculo liso, tales como h-caldesmon, metavinculina, calponina y las cadenas pesadas de miosina de músculo liso (Galmiche et al, 1993).

Como ya se mencionó la fuente principal para obtener CTMs es la MO. El material de inicio consiste en aspirados de MO obtenidos de donadores normales, los cuales son utilizados para el trasplante alogénico de MO. Después de obtener y sembrar células mononucleares de dichos aspirados en un medio basal suplementado con suero fetal bovino (Prockop, 1997; Conget et al 1999); la población en desarrollo de células adherentes es considerada la fuente primaria *ex vivo* de CTMs. No existe un procedimiento experimental único para la separación de estas células y la mayoría de los laboratorios se han basado en la adherencia, autorenovación y capacidad de diferenciación multipotencial (hueso/adiposo/cartílago).

En un microscopio de luz o de contraste de fases los cultivos de CTMs muestran una población homogénea de células fibroblastoides (Castro-Malaspina et al 1980; Friedstein et al 1976). Los estudios de ciclo celular revelan que aunque una pequeña fracción de estas células están activamente comprometidas con la proliferación, la mayoría de las células se encuentran estacionadas en la fase G_0/G_1 del ciclo celular (Conget et al, 1999). Aunque no se ha determinado el largo de los telómeros en cada célula, el alto porcentaje de células en la fase G_0/G_1 sugieren una alta capacidad de diferenciación de las CTMs (Tamir et al, 2000). Más aún la población G_0/G_1 de CTMs incluye una subpoblación de células quiescentes que se evidencian por el contenido de ARN y ADN (Conget et al, 1999) o por el análisis de tamaño y granularidad por medio de citometría de flujo (Colter et al, 2000).

Después del subcultivo, las CTMs muestran un gran potencial de expansión no obstante este presenta alta variabilidad. Aunque algunas preparaciones pueden ser expandidas a través de 15 doblajes celulares (Bruder et al, 1998; Digirolamo et al, 1999; Phinney et al, 1999), otras cesan la replicación después de cuatro doblajes celulares aproximadamente. La naturaleza de este conflicto puede tener origen en varias determinantes, en el procedimiento usado para extraer la médula (Bruder et al, 1998;

Digirolamo et al, 1999, Phinney et al, 1999; Blazek et al, 1999), la baja frecuencia de CTMs en los aspirados de médula (Pittenger et al, 1999) y la edad o condición del donador del cual se preparan las CTMs (Bruder et al, 1998; Galotto et al, 1999). A pesar del alto potencial de expansión *in vitro*, las CTMs no pierden (después de subcultivo moderado) su cariotipo normal y actividad de telomerasa (Pittenger et al, 1999). Sin embargo, el subcultivo extensivo perjudica la función celular por el comienzo de evidentes señales de senescencia (Digirolamo et al, 1999) y/o apoptosis (Conget et al, 1999).

A la fecha no existe una definición inmunofenotípica que se considere como universal para las CTMs, es decir de manera análoga a la expresión del antígeno CD34 en las células troncales hematopoyéticas. Algunos estudios señalan que el enriquecimiento de CFU-F se asocia a varios marcadores entre los que se encuentran Thy-1 (CD90), CD44, CD49a, CD10, CD146 y de acuerdo a su respuesta a factores de crecimiento los receptores para PDGF, EGF, Factor de Crecimiento Parecido a Insulina 1 (IGF-1) y Factor de Crecimiento Neural (NGF; Simmons et al, 1994; Gronthos y Simmons, 1995; Filshie et al, 1998; Deschaseaux y Charbord, 2000). Anticuerpos adicionales han sido utilizados para identificar a las células mesenquimales, tal es el caso de SH2 que reconoce un epítipo de endoglina (CD105), el receptor III de TGF β presente en las células endoteliales, eritroblastos, monocitos y células estromales de tejido conectivo (Majumdar et al, 2000a). Los anticuerpos SH3 y SH4 que identifican epítopes del antígeno CD73, una molécula involucrada en la activación de las células B (Barry et al, 2001).

Aún a pesar de que se han identificado diferentes marcadores presentes en la células mesenquimales, es difícil establecer un inmunofenotipo característico de la mismas, sin embargo la Sociedad Internacional de Terapia Celular ha postulado algunos criterios mínimos para definir a las CTMs humanas, como la expresión de los antígenos de superficie CD105, CD73 y CD90 y la ausencia de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 y HLA-DR, además de su capacidad para diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro* (Dominici et al, 2006).

Por otra parte, se ha demostrado la utilidad de los cultivos estromales para el soporte de la expansión de las células hematopoyéticas *in vitro* (Majumdar et al, 1998).

Asimismo, también se ha demostrado que las células mesenquimales por sí mismas son capaces de incrementar la proliferación y expansión de CTH y CPH *in vitro* mediante la producción de citocinas que actúan de manera temprana para mantener a las células troncales hematopoyéticas en un estado de quiescencia o de autorenovación más que de diferenciación tales como SCF, Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), Factor Derivado del Estroma (SDF-1), Oncostatina M (OSM), Proteína Morfogenética Ósea (BMP-4), el Ligando del Receptor Flt-3 y TGF- β (Haynesworth et al, 1996; Majumdar et al, 1998 y Majumdar et al 2000b). Además éstas células son capaces de producir interleucinas como IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 e IL-15 (Azizi et al, 1998) y receptores para citocinas como IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, Interferón- γ R, TNF- α R I y II y el receptor para transferrina (Azizi et al, 1998; Pittenger et al, 1999).

Además de proveer el contacto crítico célula-célula y producir factores de crecimiento para la hematopoyesis, las CTMs también atraen células troncales hematopoyéticas injertadas hacia la MO, induciendo los receptores de homing (Blair y Thomas, 1997). En animales sanos, las CTMs son capaces de migrar a otros tejidos además de la MO (Francois et al, 2006). Diversos experimentos *in vitro* han demostrado que la migración de CTMs esta regulada por SDF-1/CXCR4 y el complejo formado por el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) y c-Met e involucra a las metaloproteinasas de matriz (Son et al, 2006).

Como población, las CTMs derivadas de MO han demostrado tener un significativo pero altamente variable potencial de autorenovación durante su propagación serial *in vitro* (Bruder et al, 1997; Colter et al, 2000). Se ha demostrado que las CFU-Fs no ciclan *in vivo* (Friedenstein et al, 1974), y la entrada de estas a ciclo celular y subsecuente desarrollo en colonias depende de los factores de crecimiento (Castro-Malaspina et al, 1980). Los doblajes de población mas altos se han conseguido como consecuencia de la adición de factores de crecimiento específicos (FGF-2) al medio de cultivo basal (Bianchi et al, 2003). La densidad de siembra también juega un papel importante en la capacidad de expansión de las células mesenquimales. A menor densidad de plaqueo mayor expansión (Colter et al, 2000). Los trabajos realizados sugieren que las CTMs y sus clones son heterogéneos con respecto a su capacidad de autorenovación (Bianco et al, 2001).

El LIF (Jiang et al, 2002; Metcalf et al, 2003), el FGF-2 (Tsutsumi et al, 2001; Zaragoza et al, 2006) y el homólogo mamífero de *Drosophila* Wingless (Wnts; Kleber, 2004; Boland et al, 2004) entre otros, han sido implicados en el mantenimiento de la troncalidad de las CTMs. Se ha demostrado su papel en la autorenovación, mantenimiento del tejido embrionario mesenquimal no diferenciado (Kolf et al, 2007). LIF es una citocina pleiotrópica que mantiene el estado troncal de las CTMs (Jiang et al, 2002) y también activa y reprime la diferenciación osteoblástica y osteoclastica (Heymann y Reuselle, 2000). El FGF2 mantiene el estado troncal de las CTMs (Tsutsumi et al, 2001) y en presencia de Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, prolonga el período de vida de aquellas derivadas de MO a más de 70 doblajes poblacionales y mantiene su potencial de diferenciación hasta 50 doblajes (Bianchi et al, 2003). Esto sugiere que el FGF-2 selecciona preferencialmente la sobrevivencia de una subpoblación de células con alto potencial de autorenovación. El tratamiento con Wnt3a incrementa la proliferación de las CTMs adultas e inhibe la diferenciación osteogénica (Boland et al, 2004). Se ha sugerido que la β -catenina está involucrada en la regulación de la autorenovación por medio de Wnt. Las CTMs expresan los marcadores genéticos de células troncales embrionarias Oct-4 (involucrado tanto en el mantenimiento de la capacidad de regeneración como del estado de troncalidad de las células troncales; Matikainen y Laine, 2005, Barry et al, 2005), Sox-2 (implicado en el desarrollo embrionario temprano y el mantenimiento del estado de no diferenciación de las células troncales; Zhang et al, 2005; Erices et al, 2000; Thellin et al, 2000; Zhang et al, 2004; Niyibizi et al, 2004) y Rex-1 (comprometido en el funcionamiento de las células troncales Izadpanah et al, 2006).

Las colonias individuales derivadas de una sola CTM precursora han sido reportadas como heterogéneas en términos de potencial de linaje. Pittenger y cols. publicaron que un tercio de los clones de CTMs derivadas de MO son pluripotentes (osteogénicas/condrogénicas/adipogénicas; Pittenger et al, 1999). En otro estudio, Muraglia y cols. demostraron que el 30% de los clones celulares derivados de CTMs *in vitro* exhibieron un potencial de diferenciación tri-linaje (osteogénico/condrogénico/adipogénico), mientras que el resto mostró un potencial bi-linaje (osteogénico/condrogénico) o uni-linaje (osteogénico; Muraglia et al, 2000).

Asimismo, Kuznetsov y cols. publicaron que solo el 58% de los clones derivados de una sola colonia tienen la capacidad de formar hueso en cápsulas de cerámica con fosfato hidroxapatita de calcio, después de la implantación en ratones inmunodeficientes (Kuznetsov et al, 1997). Todos estos resultados demuestran que las CTMs clonalmente derivadas son heterogéneas con respecto a su potencial de desarrollo. El enriquecimiento de una población inicial de CTMs mas homogénea, particularmente aquellas que tienen un potencial de diferenciación de multilinaje, puede también prolongar el período de vida de las células mesenquimales en la expansión *in vitro* (Baksh et al, 2004).

Baksh y cols. proponen un modelo para la regulación de la diferenciación de una célula troncal, que incorpora 2 compartimentos distintos pero continuos. En el primer compartimento las CTMs entran en modificación transcripcional, generando células sin aparentes cambios en fenotipo y capacidad de autorenovación. Similares a CTMs residentes en MO adulta, la mayoría de las células mesenquimales cultivadas *in vitro*, permanecen indiferenciadas hasta que son estimuladas. Bajo estimulación, las CTMs multipotentes entran en división asimétrica, dando origen a dos células hijas, una es la replica exacta de la célula madre y mantiene el potencial de multilinaje, y la otra se convierte en una célula precursora que continua dividiéndose simétricamente generando mas células precursoras. Estas células precursoras son morfológicamente similares a las CTMs multipotentes pero difieren en su transcripción de genes (repertorio). Las progresión de CTMs a precursoras es considerada el primer paso en el compromiso de las células troncales. La transición o salida del “compartimento de células troncales” al “compartimento del compromiso” ocurre cuando las células precursoras continúan dividiéndose simétricamente para generar células progenitoras unipotentes, simultáneamente con la adquisición de propiedades de linaje específico, convirtiéndose en células completamente maduras y comprometidas con fenotipo distinguible (Baksh et al, 2004).

El compromiso y diferenciación de las CTMs a tipos celulares maduros específicos es un proceso temporal altamente controlado que involucra la actividad de factores de transcripción, citocinas, factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular. Hay varios factores esenciales para el compromiso de una CTM. Entre ellos, moléculas secretadas y sus receptores (TGF- β), matriz extracelular (colágenos y

proteoglicanos), actina de citoesqueleto y factores de transcripción intracelular (Cbfa1/Rnux2, PPAR γ , Sox9 y MEF2) juegan importantes papeles en el compromiso de las CTMs en linajes específicos y el mantenimiento de sus fenotipos diferenciados (Olsen et al, 2000; Waddington et al, 2003; McBeath et al, 2004; Harada y Rodan, 2003).

Se ha propuesto que los osteoblastos, condrocitos y adipocitos derivados de CTMs pueden cambiar su fenotipo a otros linajes mesenquimales en respuesta a estímulos extracelulares específicos (Song y Tuan, 2004). Durante este proceso, se observa proliferación extensiva y las células comprometidas pierden su fenotipo de linaje específico, antes de asumir un estado similar a las células troncales primitivas tanto en morfología como en función. Por lo tanto, bajo inducción estas células “desdiferenciadas” son capaces de adquirir un nuevo fenotipo indiferenciado, esto es, entran en rediferenciación. De este modo se puede concluir que tanto células progenitoras pre-comprometidas y completamente diferenciadas mantienen la multipotencialidad y que su plasticidad durante el “cambio fenotípico” puede ser preservada durante la diferenciación y ser readquirida bajo circunstancias definidas y microambiente apropiado como la reparación y regeneración de tejido (Baskh et al, 2004).

Otro mecanismo biológico que se ha propuesto pueden llevar a cabo las CTMs, es la transdiferenciación, el cual se considera un proceso donde un tipo celular comprometido y en progreso hacia un linaje específico, cambia a otro tipo celular a través de una reprogramación genética y por tanto se da un cambio fenotípico de un tipo celular diferenciado a otro. Sin embargo, se dice que puede existir la posibilidad de contaminación de progenitores celulares y/o fusión celular. No obstante, Song y Tuan demostraron que las CTMs humanas completamente diferenciadas son capaces de desdiferenciación y transdiferenciación en células de otro linaje a nivel de una sola célula (Song y Tuan, 2004). Varias líneas de evidencia sugieren la existencia de un potencial de transdiferenciación en células troncales adultas de mamíferos, otros hallazgos sugieren que se trata de fusión celular (Terada et al, 2002; Ying et al, 2002) y heterogeneidad celular (Verfaille, 2002; Orkin y Zen, 2002). Se ha sugerido que la regulación de la desdiferenciación y transdiferenciación puede jugar un importante papel en el desarrollo, mantenimiento y regeneración de tejido en mamíferos (Song y

Tuan, 2004). Así, se ha demostrado que las CTMs humanas que han sido pre-comprometidas a un linaje mesenquimal pueden transdiferenciarse en otros tipos celulares y que células completamente diferenciadas pueden tener una mayor plasticidad de la que se creía (Song y Tuan, 2004). Con esta propiedad se puede requerir modificar el modelo jerárquico de diferenciación celular para incluir rutas de transdiferenciación y diferenciación (Eisenberg y Eisenberg, 2003).

Por otra parte, también se han realizado estudios relacionados con la capacidad de inmunosupresión de las CTMs. Así se ha demostrado que las CTMs suprimen muchas de las funciones de las células T, B, NK y células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) y son pobremente reconocidas por los huéspedes HLA incompatibles. Además, los efectos de las CTMs en el sistema inmune pueden ser profundamente influenciados no solo por las interacciones celulares, sino también por factores ambientales que dan forma a su fenotipo y funciones (Ucelli et al, 2006; Chan et al, 2006; Nauta et al, 2006; Eliopoulos et al, 2005). Varias moléculas involucradas en la sinapsis del nicho de CTH (Wilson y Trump, 2006) como Gal-1, angiopoyetina-1, osteopontina y trombospondina-1 y 2 son altamente expresadas por las células mesenquimales que muestran capacidad inmunomodulatoria (Pedemonte et al, 2007).

Las CTMs pueden producir una variedad de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y proteasas que parecen jugar un papel en las funciones inmunomodulatorias y/o de migración (Caplan y Dennis, 2006; Kim et al, 2005; Son et al, 2006). Las CTMs expresan un patrón restringido de receptores de quimiocinas, incluyendo CXCR4, permitiéndoles migrar a los tejidos bajo atractores quimiotácticos específicos (Honczarenko et al, 2006; Ji et al, 2004; Lee et al, 2006; Sordi et al, 2005). Estas características parecen ser la base del homing de CTMs a múltiples órganos donde entran a un programa de diferenciación en tejido específico (Liechty et al, 2000). Las CTMs están profundamente influenciadas por factores microambientales y pueden responder a algunas citocinas inflamatorias como IL-1 β (Groh et al, 2005), IL-7 (Huang et al, 2006) e IFN- γ , todas capaces de afectar de forma significativa su función (Krampera et al, 2006; Figura 5). Bajo ciertas circunstancias el IFN- γ parece potenciar la actividad inmunosupresora de CTMs humanas (Krampera et al, 2006) y en otros casos puede inducir a las CTMs a actuar como Células Presentadoras de Antígeno (APC, por sus siglas en inglés) no convencionales (Chan et al, 2006; Stagg et al, 2006).

Los experimentos *in vivo* e *in vitro* sugieren que el comportamiento funcional de las CTMs es resultado del efecto combinado de factores solubles y mecanismos mediados por el contacto celular.

Las CTMs pueden inhibir la proliferación de células T que han sido cultivadas en reacciones mixtas de linfocitos (MLR) o estimuladas por activadores policlonados (DiNicola et al, 2002) y transplantadas *in vivo* pueden prolongar el injerto de piel en primates no humanos (Bartholomew et al, 2002). La supresión de la proliferación de las células T no requiere restricción de Moléculas de Histocompatibilidad (MHC) y puede ser mediada por las CTMs alogénicas (Krampera et al, 2003; LeBlanc et al, 2003). Experimentos *in vitro* demostraron que las CTMs humanas pueden inducir la generación de células T CD4⁺ con un fenotipo regulador (Treg; Aggarwal y Pittenger, 2005; Maccario et al, 2005). Múltiples experimentos han demostrado que las CTMs inhiben la proliferación de linfocitos B, debido al contacto físico entre las CTMs y las células B y en parte a factores solubles secretados por las CTMs en el sobrenadante del cultivo (Glennie et al, 2005; Augello et al, 2005; Figura 5). Asimismo, se ha publicado que la proliferación de las células NK es inhibida por las CTMs (Krampera et al, 2006; Sotiropoulou et al 2006; Spaggiari et al 2006) y este efecto parcial inhibitorio de las CTMs en el potencial citolítico de las células NK, se observa sobre células blanco que son menos susceptibles a la lisis mediada por células NK (HLA clase I⁺) que las HLA clase I⁻. No obstante, las CTMs son altamente susceptibles a la lisis por células NK activadas por IL-2 (Sotiropoulou et al 2006; Spaggiari et al 2006; Poggi et al, 2005).

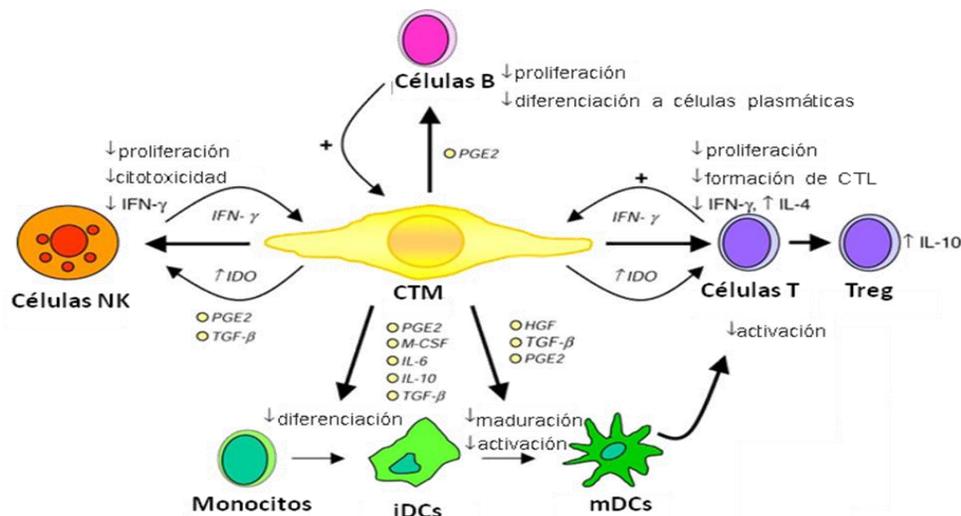


Figura 5. Efectos de las CTMs en las células del sistema inmune (modificado de Nauta y Fibbe, 2007)

El efecto modulador de las CTMs en la respuesta inmune puede afectar la función de las DC y generar células presentadoras de antígeno tolerogénicas, e inhiben la maduración de DC mieloides derivadas de monocitos (Maccario et al, 2005; Beyth et al, 2005; Jiang et al, 2005; Zhang et al, 2004). El mecanismo de inhibición de diferenciación y función de las DC mediado por CTMs parece ser mediado por factores solubles (Aggarwal y Pittenger, 2005; Jiang et al, 2005). La inhibición de la proliferación de linfocitos por CTMs, no es un resultado exclusivo de supresión directa sobre células T, sino también puede estar relacionada a un efecto inhibitorio en la maduración, activación y presentación de antígenos en DC (Ramasamy et al, 2007; Figura 5).

Por otra parte, se ha observado que cuando se introducen CTMs alogénicas en receptores incompatibles estas migran a un amplio rango de tejidos y persisten en el huésped (Liechty et al, 2000; Devine et al, 2003). La introducción intravenosa de CTMs en humanos ha llevado a resultados alentadores en diferentes enfermedades, incluyendo la enfermedad de injerto contra huésped (LeBlanc et al, 2004), cáncer de mama (Koc et al, 2000), osteogénesis imperfecta (Horwitz et al, 2002), leucodistrofia metacromática y síndrome de Hurler (Koc et al, 2002), enfermedades hematológicas (Lazarus et al, 2005) y embolias (Bang et al, 2005). No obstante, en algunos casos se ha observado que la administración de CTMs alogénicas en huéspedes incompatibles resulta en el rechazo de estas células (Eliopoulos et al, 2005), e incluso que la administración de CTMs alogénicas en ratones que reciben trasplante de MO alogénica no previene el rechazo tan eficientemente como en los ratones infundidos con CTMs autólogas (Nauta et al, 2006).

A pesar de los prometedores resultados, el uso clínico de CTMs en enfermedades inmunes requiere datos pre-clínicos y también deben tomarse en consideración los mecanismos inmunológicos específicos de la enfermedad, así como los factores ambientales que pueden afectar significativamente las propiedades biológicas de las CTMs (Ucelli et al, 2006).

5. Aplicación Clínica de las CTMs

Las Células Troncales Mesenquimales (CTMs) han despertado gran interés porque son obtenidas de un pequeño aspirado de Médula Ósea (MO) y pueden ser expandidas hasta 50 doblajes poblacionales en 10 semanas aproximadamente. Actualmente se está probando el potencial de estas células para uso en terapia celular y génica en diferentes enfermedades (Figura 6). Sin embargo, aun hay poca información de su origen, multipotencialidad y localización anatómica. No obstante, se sabe que las CTMs tienen un alto potencial de expansión, estabilidad genética, pueden ser fácilmente colectadas y llevadas del laboratorio al paciente (Giordano et al, 2007). Además son capaces de migrar a sitios en los cuales hay daño de tejido y tienen fuertes propiedades inmunosupresoras que pueden ser explotadas para transplantes autólogos y heterólogos exitosos (LeBlanc y Pittenger, 2005). A continuación se mencionan algunas patologías en las cuales se han empleado las CTMs para favorecer la recuperación de los pacientes.

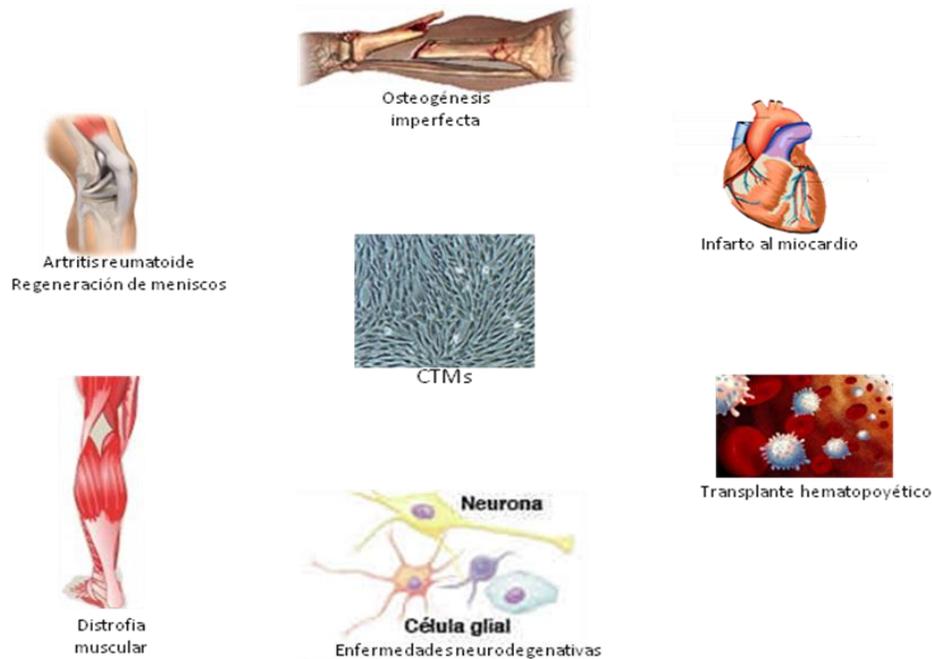


Figura 6. Aplicación clínica de las CTMs. Las células mesenquimales pueden diferenciarse hacia células de origen endodérmico (hígado), mesodérmico (músculo, cartílago, células cardíacas, hueso) y ectodérmico (neuronas); por lo que pueden utilizarse en el tratamiento de diversas enfermedades.

Patologías hematológicas.

El trasplante de Células Troncales Hematopoyéticas (CTH) alogénicas puede ser una terapia efectiva para muchas patologías hematológicas. Sin embargo, puede haber un número de problemas relacionados al tratamiento, como infecciones, hemorragias, falla de injerto y la enfermedad de injerto contra huésped (Armitage, 1994; Tabbara et al, 2002). Las CTMs han demostrado tener propiedades inmunosupresoras y prevenir el rechazo de injerto de piel (DiNicola et al, 2002; LeBlanc y Pittenger, 2005). Además producen citocinas que pueden mantener la hematopoyesis y aceleran la recuperación de la MO después de quimio y/o radioterapia (Koc y Lazarus, 2001; LeBlanc y Pittenger, 2005). Como ejemplo de esto último, podemos mencionar el caso de una mujer de 68 años con anemia aplásica idiopática severa en su fase terminal y que rechazó todos los tratamientos anteriores. Se tomó una biopsia de MO y su análisis indicó que no había tejido hematopoyético, hemorragia intersticial, edema, necrosis adipocítica o de células estromales. La paciente recibió un trasplante alogénico de CTMs y posterior a ello, la mayoría de los trastornos mencionados desaparecieron, aunque no hubo recuperación del tejido hematopoyético. Así, las CTMs alogénicas, pueden ser introducidas con seguridad sin inducir ningún efecto adverso y/o enfermedad de injerto contra huésped. De hecho, algunos estudios sugieren que el co trasplante de CTH y CTMs, pueden producir efectos benéficos en pacientes que sufren patologías hematológicas (Fouillard et al, 2003).

En otro estudio una joven de 20 años con leucemia mieloide, recibió un trasplante de CTH y CTMs alogénicas de su padre haploidéntico. Las CTMs fueron expandidas *in vitro* y se administraron después del trasplante de CTH CD34⁺ purificadas. La paciente mostró injerto rápidamente y no mostró enfermedad de injerto contra huésped (EICH) aguda o crónica. Sin embargo los estudios quiméricos de MO mostraron en un seguimiento de varios meses después del trasplante, que el origen de las CTMs era 100% del receptor, sugiriendo que las CTMs no injertaron. Así, los efectos benéficos de la coin fusión de CTMs aun no se pueden explicar claramente (Lee et al, 2002).

De igual manera en otro estudio Lazarus y cols. eligieron 56 pacientes que habían recibido terapia mieloablativa y que habían respondido al tratamiento o que no presentaban ningún progreso de la enfermedad. Se obtuvieron CTMs y CTH de

hermanos con HLA idénticos. Las CTMs fueron expandidas *in vitro* y fueron administradas, en dosis escalonadas, 4 horas antes de recibir el trasplante de CTH. Estos pacientes presentaron una pronta recuperación hematopoyética y 23 de los 46 pacientes que participaron en todas las fases del estudio, no desarrollaron EICH, aunque 11 pacientes mostraron recaída a largo plazo (Lazarus et al, 2005). Esto demostró que introducir CTMs, expandidas *in vitro*, junto con CTH es un procedimiento seguro que puede reducir las secuelas del trasplante y favorecer la recuperación de la MO después del tratamiento mieloablativo (Lazarus et al, 2005).

Enfermedades del corazón.

La pérdida de cardiomiocitos que sigue al infarto al miocardio, induce una disfunción contráctil del corazón y muerte de células de músculo cardíaco que son reemplazadas por fibroblastos que forman una cicatriz (Ambrose, 2006). Se ha demostrado que la inyección intracoronaria de MO completa o de CTMs puede representar un método simple y exitoso para el tratamiento de enfermedades del corazón. Con referencia a esto Strauer y cols. reclutaron a 20 pacientes que habían sufrido de infarto transmural. Después de una cateterización derecha e izquierda, angiografía coronaria y ventriculografía izquierda, los pacientes recibieron una angiografía con un catéter tipo balón e implantación. Después de 5-9 días del infarto se realizó un aspirado de MO del íleo de 10 pacientes y se obtuvieron las Células Mononucleares (CMN), las cuales fueron transplantadas en la región infartada. Después de 3 meses, la circunferencia de la región infartada disminuyó significativamente, así como el porcentaje de segmentos hipocinéticos, acinéticos y discinéticos (Strauer et al, 2002).

De igual forma Chen y sus cols. realizaron un estudio con terapia celular en pacientes con infarto agudo al miocardio. Seleccionaron 69 pacientes a los que se les realizó angioplastia o angiografía de emergencia en las 12 horas siguientes al infarto. Se realizó un aspirado de 60 ml de MO después de la Intervención Coronaria Percutánea (PCI, por sus siglas en inglés) y se cultivaron las CMN por 10 días para obtener CTMs. Se ocluyó la arteria relacionada al infarto en el borde proximal de la angioplastia previa y se inyectaron las CTMs en la arteria coronaria blanco. El porcentaje de segmentos hipocinéticos, acinéticos y discinéticos disminuyó después de

3 meses. La velocidad en el movimiento de la pared en el área infartada se incremento significativamente al igual que la eyección ventricular izquierda (Chen et al, 2004).

Para su ensayo BOOST (con refuerzo) al azar, Wollert y cols reclutaron 60 pacientes que sufrieron de infarto agudo al miocardio. Después de la PCI se colectaron células nucleadas de MO y después de 4-8 días de la PCI, se inyectaron en la arteria infartada con un catéter balón. Después de 6 meses del trasplante, los pacientes presentaron un incremento en la eyección ventricular izquierda y en el movimiento sistólico de la pared. Según los autores, las células de MO autóloga pueden ser usadas para aumentar la recuperación funcional ventricular izquierda en pacientes que tuvieron infarto agudo al corazón (Wollert et al, 2004). Este estudio demuestra que la terapia celular con células troncales de MO es factible, segura y puede contribuir a la regeneración del tejido al miocardio después del infarto.

Según Katritsis y cols, las CMN provenientes de MO si contribuyen al mejoramiento de la contractilidad del área infartada del corazón, sin embargo, aunque la administración de estas células no purificadas evita los problemas que conlleva la expansión celular *in vitro*, estas contienen solo un pequeño porcentaje de células pluripotentes diluidas en una gran cantidad de células ya comprometidas y diferenciadas (Katritsis et al, 2005).

Se ha demostrado que el trasplante de CTMs tiene un papel anti-inflamatorio, ya que se ha observado la disminución en la expresión de los genes de citocinas inflamatorias TNF- α , IL-1B e IL-6 (Guo et al, 2007). Además inhibe la deposición de colágeno I y III así como la expresión de genes y proteínas de metaloproteinasas de matriz (Xu et al, 2005). Estas observaciones confirman que los mecanismos paracrinos de las CTMs, son responsables de potenciar la sobrevivencia de los miocitos existentes. Por otro lado, las CTMs pueden ser estimuladas a diferenciarse hacia células endoteliales que participan en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y cardiomiocitos en el tejido isquémico.

Osteogénesis imperfecta.

La Osteogénesis Imperfecta (OI) es una enfermedad caracterizada por la producción de colágeno I defectuoso (la proteína principal del hueso). Los pacientes

tienen fracturas dolorosas, retardo en el crecimiento de huesos, así como deformación progresiva. En experimentos preclínicos llevados a cabo en modelos animales, las CTMs transplantadas migraron y se incorporaron en el hueso y el músculo de los animales receptores (Pereira et al, 1995; Ferrari et al, 1998; Onyia et al, 1998). Horwitz y cols. demostraron que los trasplantes de CTMs pueden ser útiles para corregir los defectos asociados a la OI. Las CTMs de la MO transplantada pueden migrar a los huesos en niños con OI y dar origen a osteoblastos, lo que determina mejoría en la estructura ósea (Horwitz et al, 1999). Un estudio en niños con OI severa tipo III, reveló una aceleración en el crecimiento 6 meses después del trasplante de CTMs y aunque el crecimiento siguió siendo lento, fue más acelerado que antes del trasplante. Los efectos positivos fueron atribuidos a la integración de células competentes del donador al linaje osteoblástico de los huesos en desarrollo (Horwitz et al, 2001).

Síndrome de Hurler y Leucodistrofia metacromática.

El síndrome de Hurler es una forma severa de mucopolisacaridosis, una enfermedad inherente autosomal recesiva, en donde la deficiencia de α -L-iduronidasa resulta en la acumulación de heparan sulfato y dermatan sulfato en los lisosomas. Los pacientes muestran hepatoesplenomegalia progresiva, falla cardíaca, enfermedades de los músculos, hidrocefalia y retardo mental. Estos síntomas llevan a la muerte durante la infancia (Peters et al, 1998).

La leucodistrofia metacromática es una enfermedad autosomal recesiva debido a la deficiencia de arisulfatasa A que produce una acumulación de sulfatidas, lo cual causa desmielinización del sistema nervioso central y periférico, esto causa tetraplegia, espasmos, retardo mental y ausencia total o parcial de movimiento voluntario (Koc et al, 2002; Gieselmann, 2003).

Koc y cols administraron CTMs alogénicas en pacientes que sufrían síndrome de Hurler y leucodistrofia metacromática. Después del implante las CTMs pudieron migrar y diferenciarse en tejidos como hueso, cartílago, sistema nervioso y periférico y reparar estos tejidos (Koc et al, 2002).

Seis pacientes con Síndrome de Hurler y cinco con leucodistrofia metacromática, que previamente habían recibido trasplante de MO exitoso de hermanos con HLA

idéntico fueron elegidos para trasplante de CTMs. Estas fueron expandidas en cultivo e introducidas vía intravenosa. No se observó toxicidad relacionada a la administración celular. En cuatro pacientes con leucodistrofia metacromática hubo una mejoría significativa en la velocidad de conducción de los nervios. Sin embargo, no se presentaron cambios clínicos aparentes tales como mejoría significativa en el estado mental o de la condición física. Por lo anterior, los autores concluyeron que se requieren evaluaciones posteriores para definir si el trasplante de CTMs es efectivo en el tratamiento de la mucopolisacaridosis (Koc et al, 2002).

Enfermedades neurológicas.

El trasplante de CTMs de MO en roedores disminuye el déficit funcional en varias enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) y en las lesiones de la médula espinal (Deng et al, 2006; Wislet-Gendebien et al, 2005; Tseng et al, 2007; Tropel et al, 2006). Las CTMs pueden ser inducidas a formar células neuronales funcionales, las cuales son transplantadas a modelos animales con desordenes neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Parkinson e isquemia cerebral, resultando en la integración exitosa de las células transplantadas y una mejoría en los animales receptores (Dezawa et al, 2005). Estas observaciones han generado interés en el potencial uso de CTMs para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y traumas. Así, en un estudio se reclutaron 21 pacientes con daño completo en la médula espinal (SCI, por sus siglas en inglés), los cuales recibieron trasplante de células de MO autóloga de 10 a 467 días después del trauma que causó la lesión (Sykova et al, 2006). Las células se administraron vía intravenosa e intra-arterial en grupos de pacientes agudos (10-30 días post-SCI, n=7) y crónicos (2-17 meses post-SCI, n=13). Se observó una mejoría en las funciones motoras y/o sensoriales en los 3 meses siguientes en 5 de 6 pacientes que recibieron una aplicación intra-arteria, en 5 de 7 pacientes agudos y en 1 de 13 pacientes crónicos. Se observó que el trasplante en las 3-4 semanas siguientes a la lesión, parece jugar un papel importante en la recuperación. Aunque no se puede confirmar que los efectos benéficos observados son completamente debidos a la terapia celular, el trasplante de MO parece ser seguro ya que se realizó el seguimiento a 11 pacientes por mas de 2 años (Sykova et al, 2006).

Por otro lado, en un modelo de rata 6-hidroxidopamina (6-OHDA por sus siglas en inglés) con enfermedad de Parkinson las CTMs transplantadas injertaron mejor en el

lado lesionado con 6-OHDA que en el lado sin lesión. Estas migraron a través del cuerpo calloso para poblar el estriado, el núcleo talámico y el área de la sustancia nigra (Hellman et al, 2006). Debido a que la enfermedad de Parkinson involucra la degeneración de neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas, se deben resolver muchos problemas antes de la aplicación clínica de las CTMs.

Enfermedades del hígado.

Actualmente el trasplante de hígado está limitado por la disponibilidad de donadores adecuados. Lee y cols. ya han demostrado que las CTMs provenientes de MO pueden ser inducidas hacia el linaje hepático (Lee et al, 2004). Las células que obtuvieron en este estudio tienen una morfología cuboidal y funciones características de células hepáticas tales como producción de albúmina, secreción de urea, almacenamiento de glucógeno, absorción de lipoproteínas de baja densidad y actividad del citocromo 450 inducida por fenobarbital. En otros estudios, las CTMs humanas transplantadas en hígado de ratas tratadas con alcohol (Sato et al, 2005), así como en ratones inmunodeficientes Pfp/Rag2 (Aurich et al, 2007), fueron capaces de diferenciarse en hepatocitos humanos sin fusión celular. Por lo tanto, las CTMs humanas de MO son capaces de diferenciarse en hepatocitos funcionales y pueden ser útiles como una alternativa al trasplante de hígado en el tratamiento de diversas enfermedades hepáticas. En un modelo de rata con fibrosis inducida por CCl₄, las CTMs mostraron un potencial efecto terapéutico contra el proceso fibrótico mediante la inhibición de la deposición de colágeno, además de su capacidad para diferenciarse en hepatocitos (Abdel et al, 2007; Zhao et al, 2005). Estos estudios demuestran que el trasplante de células troncales de MO puede llevar a la regresión de la fibrosis en el hígado. Mohamadnejad y cols. han completado la fase I de un estudio en el cual 4 pacientes con cirrosis fueron transplantados con CTMs de MO, el procedimiento mostró ser seguro, factible y hasta el momento se han obtenido resultados prometedores (Lee et al, 2008). Actualmente se está llevando a cabo la fase II de este estudio.

Compañías que desarrollan Biotecnología con CTMs para su aplicación en Terapia Celular.

Algunas compañías se han enfocado en desarrollar y comercializar biotecnología de células troncales humanas, para su aplicación en el campo de la medicina regenerativa, con la finalidad de tratar la degeneración de los órganos más importantes.

Osiris Therapeutics, Inc. (www.osiristx.com) tiene 3 productos en pruebas clínicas, basados en CTMs: Prochymal, Provacel y Chondrogen. Con Prochymal se evalúa la seguridad y eficacia en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped. Los estudios clínicos con Provacel evaluarán su seguridad y eficacia en el tratamiento del daño al miocardio después de un infarto agudo. Chondrogen ha mostrado beneficios en modelos animales de menissectomía.

Mesoblast (www.mesoblast.com) es una compañía australiana dedicada a la producción de células troncales para ser usadas en estudios clínicos piloto y en pacientes con enfermedades ortopédicas y cardiovasculares. La tecnología de Mesoblast permite la extracción, obtención y expansión de CTMs a las que han llamado Células Precursoras Mesenquimales (MPC, por sus siglas en inglés). Están llevando a cabo estudios clínicos basados en inyecciones artroscópicas de MPC para la regeneración de cartílago. También están desarrollando terapia celular para la reparación del hueso. Han dicho que tienen la tecnología que puede generar hueso de novo y nuevos vasos sanguíneos. El mismo tipo de terapia está siendo desarrollada para enfermedades arteriales periféricas y falla cardíaca.

BrainStorm Cell Therapeutics, Inc. (www.brainstorm-cell.com) en Israel ha desarrollado NurOwn que contiene CTMs adultas y será utilizado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Los científicos de esta compañía han transplantado astrocitos derivados de CTMs en modelos de ratas con la enfermedad de Parkinson. Dos semanas después del trasplante celular, han observado una mejoría significativa en el comportamiento característico de la enfermedad, incluyendo más del 50% de reducción en los movimientos rotacionales.

6. Fuentes alternativas de células troncales mesenquimales

Hasta el momento se ha demostrado que las Células Troncales Mesenquimales (CTMs) pueden ser obtenidas de diferentes tejidos además de la Médula Ósea (MO), la cual, sin embargo, es la fuente primaria para la obtención de estas (Prockop, 1997; Bianco y Gehron Robey, 2000; Jori et al, 2005; Beyer Nardi y daSilva Meirelles, 2006; Sethe et al, 2006). No obstante, estas células, constituyen solo un pequeño número del total de las células presentes en la MO. Según Pittenger solo del 0.001% al 0.01% de

las células mononucleares obtenidas por un gradiente de densidad (Ficoll/Percoll) dan origen a células adherentes tipo fibroblastoide (Pittenger et al, 1999). El número de CTMs obtenidas de este tejido puede variar en términos de cantidad y calidad, aun cuando las células son del mismo donador (Phinney et al, 1999).

Además de la MO, las CTMs también se localizan en otros tejidos del cuerpo humano (Figura 7). Hay un gran número de reportes que describen su presencia en tejido adiposo (Gronthos et al, 2001), sangre de cordón umbilical, vello coriónico de la placenta (Igura et al, 2004), fluido amniótico (Tsai et al, 2004), sangre periférica (Zvaifler et al, 2000), hígado fetal (Campagnoli et al, 2001), pulmón (in't Anker et al, 2003, Sabatini et al, 2005), pulpa dental (Miura et al, 2003; Shi et al, 2005), periostio (De Bari et al, 2001a; De Bari et al, 2001b), membrana sinovial (De Bari et al, 2001a), músculo esquelético (Bosch et al, 2000; Wada et al, 2002; Qu-Petersen et al, 2002; Adachi et al, 2002), hueso trabecular (Noth et al, 2002) y cordón umbilical humano (Romanov et al, 2003), sugiriendo que las CTMs esta distribuidas diversamente *in vivo*.

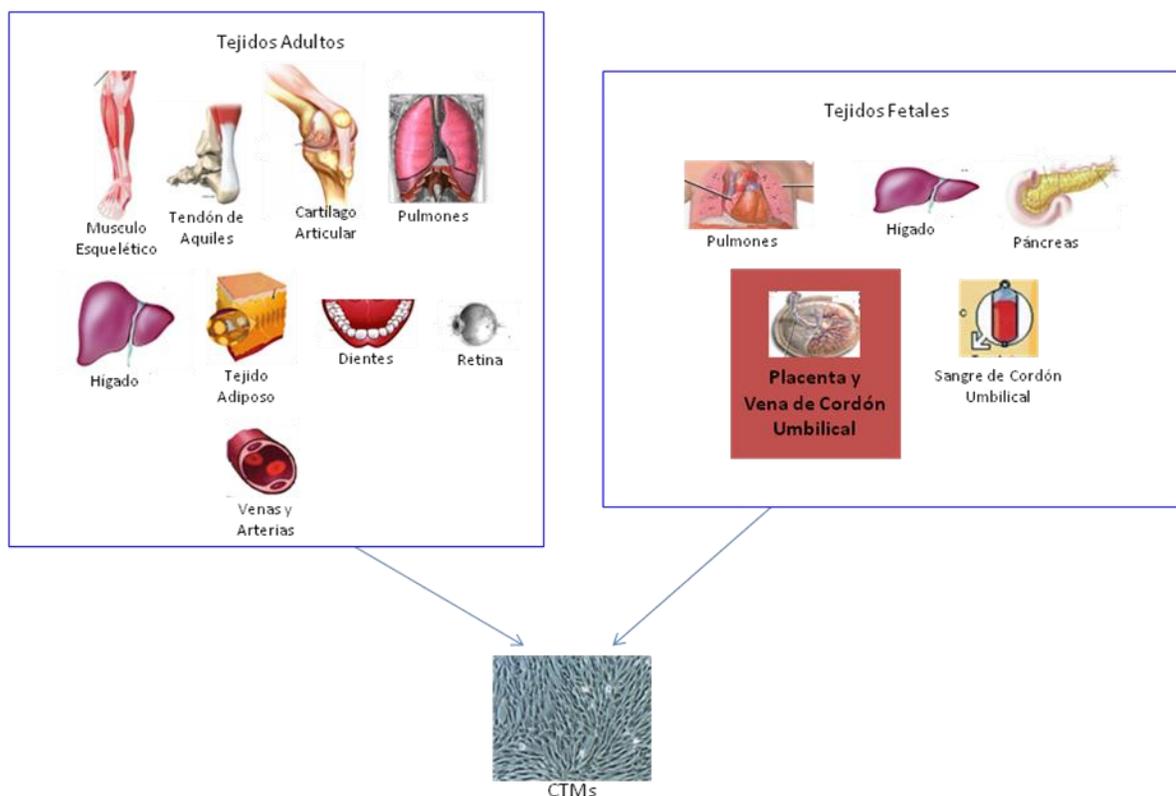


Figura 7. Fuentes alternativas de CTMs. Se ha demostrado que se pueden obtener células mesenquimales de tejidos tanto fetales como adultos

A la fecha hay algunas comparaciones directas de CTMs obtenidas de diferentes tejidos. Kern y cols hicieron recientemente una comparación donde se presenta una correlación de CTMs obtenidas de tres fuentes y expandidas en condiciones de cultivo idénticas. Las CTMs no demostraron ninguna diferencia significativa en cuanto a morfología e inmunofenotipo. Sin embargo se observaron diferencias en la tasa de obtención, capacidad de proliferación y diferenciación (Kern et al, 2006).

En el presente trabajo estudiaremos a las CTMs provenientes de Placenta (PL) y Vena de Cordón Umbilical (VCU), debido a ello en las siguientes secciones mencionaremos algunas características biológicas de ambas fuentes.

7. Placenta y Vena de Cordón Umbilical

La Placenta (PL) es el sitio principal de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto. Es un órgano fetomaterno con dos componentes: una porción fetal, que se desarrolla a partir del saco coriónico y una porción materna, que se deriva del endometrio (Figura 8). Tiene tres funciones principales: metabolismo, transporte de gases y nutrientes y secreción endocrina. Estas son esenciales para conservar la gestación y promover el desarrollo normal del feto. Tanto la PL como el cordón umbilical funcionan como un sistema de transporte para el paso de sustancias entre la madre y el feto. Los nutrientes y el oxígeno pasan de la sangre materna a la fetal, y los materiales de desecho y el dióxido de carbono de la sangre fetal a la materna, a través de la placenta. Las membranas fetales y la placenta llevan a cabo las siguientes funciones y actividades: protección, nutrición, respiración, excreción y producción de hormonas (More y Persaud, 1999)

La porción fetal de la PL (corion velloso) se une con la porción materna de la PL (decidua basal) por la concha citotrofoblástica, la capa externa de células trofoblásticas en la superficie materna. Las vellosidades coriónicas en tallo (vellosidades de fijación) se unen firmemente con la decidua basal a través de la concha citotrofoblástica y fija el saco coriónico a la decidua basal. Las arterias y venas endometriales pasan a través de hendiduras de la concha citotrofoblástica y se abren hacia el espacio intervelloso. Se aplica el término decidua (*L. deciduus* desprendimiento) al *endometrio de la gravidez* (capa funcional del endometrio en una mujer embarazada). El nombre indica que esta

parte del endometrio se separa (“se desprende”) del resto del útero durante el *parto* (nacimiento). La decidua tiene tres regiones que se denominan según su relación con el sitio de implantación: la parte en la profundidad del concepto que forma el componente materno de la PL se denomina decidua basal, la porción superficial que recubre el concepto se conoce como decidua capsular y el endometrio restante se denomina decidua parietal (decidua verdadera). El aspecto característico en guijarros de la superficie materna depende de áreas vellosas ligeramente abultadas –los cotiledones- que están separadas por surcos que en el inicio ocuparon los tabiques placentarios. La superficie de los cotiledones se recubre por fragmentos grisáceos, delgados de decidua basal que se separaron de la pared uterina cuando se expulsa la PL, los cuales pueden identificarse en cortes de PL que se examinan con microscopio. En forma temporal, casi toda la decidua se retiene y se elimina con la hemorragia uterina subsecuente (More y Persaud, 1999).

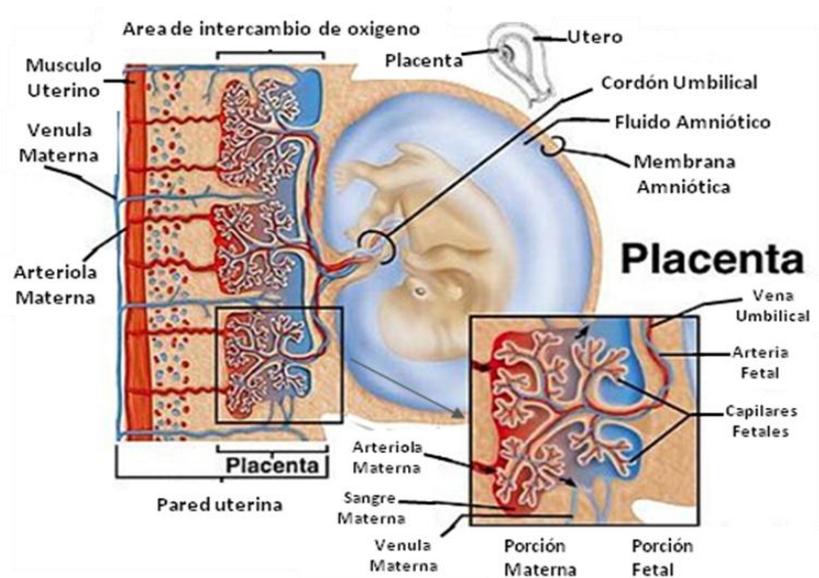


Figura 8. La placenta consta principalmente de dos porciones: la porción materna o cotiledones y la porción fetal o corion vellosos. (Modificado de Somkuti, 2008)

Desarrollo placentario.

El embrión empieza a implantarse en la semana 1. Esto ocurre como resultado de la producción de sustancias que lesionan al endometrio, lo que causa que el embrión sea completamente embebido en la pared endometrial; estas sustancias son producidas por el sincitiotrofoblasto. El sincitiotrofoblasto también lesiona las paredes de los vasos sanguíneos maternos y las glándulas endometriales, formando lagunas. Así, los fluidos maternos están en contacto directo con el tejido embrionario. En la semana 2, se

empiezan a formar las membranas fetales y el embrión se embebe completamente en la pared uterina. Durante la semana 3 se inicia la circulación placentaria y las estructuras extraembrionarias y fetales están bien establecidas. En la semana 4 puede iniciarse la organogénesis (Sweeney, 1998).

El corion que es la parte fetal de la PL, se forma de las capas trofoblásticas y el mesodermo extraembrionario. Se desarrolla una cavidad coriónica en el mesodermo embrionario. El corion permanece conectado al feto mediante un tallo de conexión del mesodermo que formara el cordón umbilical. La estructura de la PL madura empieza a desarrollarse en el primer mes. Las capas trofoblásticas forman proyecciones que posteriormente invaden el endometrio uterino. Ya que estas capas son la parte coriónica de la PL, son llamadas vello coriónico. Este desarrolla en estadios. El contenido de las lagunas esta en contacto directo con la capa más externa del sincitiotrofoblasto. Ya que el sincitiotrofoblasto es siempre la capa fetal más externa, esta en contacto directo con el endometrio materno y sus secreciones. La parte materna de la PL es la decidua y esta formada por una porción del endometrio uterino. El estadio inicial de la proyección vellosa consiste del sincitiotrofoblasto cubriendo una capa del citotrofoblasto. Esto se llama vello primario. Se vuelve secundario cuando el mesodermo extraembrionario lo invade para formar una capa de tejido conectivo. Se vuelve terciario en la semana 3 cuando los vasos sanguíneos umbilicales invaden el tejido conectivo. Las lagunas en las cuales se recolecta la sangre y secreciones maternas ahora se llaman espacios intervellosos. La maduración del vello ocurre a través del desarrollo fetal. El vello terciario se desarrolla en un vello troncal principal, anclado a los lados materno y fetal de la PL y el vello "libre" que se extiende desde el lado fetal hasta los espacios intervellosos. El tejido coriónico del lado fetal de la PL, se condensa en la placa coriónica cuyos tallos principales de los vasos umbilicales están distribuidos por todo el vello. La placa coriónica esta cubierta por amnion en la superficie de la cavidad amniótica. Durante el curso del embarazo, el vello coriónico se vuelve más delgado, proveyendo una barrera mínima para la difusión, mientras que el número de capilares fetales en este se incrementa. El citotrofoblasto y el núcleo del tejido conectivo se vuelven más delgados y envuelven a los capilares fetales, así que, al comienzo del 6to mes, los capilares fetales están separados de los fluidos maternos, solo por el sincitiotrofoblasto y una capa delgada de citoplasma. Esto incrementa la eficiencia del transporte (Figura 10; Sweeney, 1998).

El cordón umbilical suele unirse con la superficie fetal y su epitelio se continúa con el amnios, que se adhiere a la superficie fetal de la PL (Figura 9). La superficie fetal de una PL recién expulsada es lisa y brillante porque esta recubierta por el amnios. Los vasos coriónicos que irradian hacia el cordón umbilical y desde el mismo se ven con claridad a través del amnios transparente y liso. Los vasos umbilicales se ramifican en la superficie fetal para formar vasos coriónicos, que penetran en las vellosidades coriónicas. La fijación del cordón umbilical, que conecta embrión o feto con la PL, suele encontrarse casi en el centro de la superficie fetal de este órgano fetomaterno, pero puede situarse en cualquier punto. El cordón umbilical suele tener de 1 a 2 cm. de diámetro y 30 a 90 cm. de largo (promedio 55 cm.; More y Persaud, 1999).



Figura 9. El cordón umbilical. Consta de dos arterias umbilicales y una vena umbilical, las cuales están cubiertas por tejido conectivo mucoide llamado Gelatina de Wharton. (Modificado de Vorvick y Storck, 2008)

Desarrollo del cordón umbilical.

El embrión se une a la PL mediante una estructura llamada tallo de conexión. Este tallo de conexión alrededor del saco vitelino forma la capa del cordón umbilical. El mesodermo extraembrionario alrededor del saco vitelino se confina a un tallo de mesodermo, como una cavidad coriónica formada en la capa mesodermal extraembrionaria. Este tallo mesodermal forma la capa del cordón umbilical, la cual contiene el tallo de vitelo externo. Al final de la semana 3, la alantoides crece dentro del tallo, donde se forma la estructura epitelial alrededor del cual el mesodermo extraembrionario forma los vasos umbilicales. También se forma una estructura central endodermal alrededor de la cual las células endodermales forman islas sanguíneas. Estas islas sanguíneas forman canales vasculares que crecen juntos para formar la

línea de los vasos sanguíneos, que formarán las dos arterias umbilicales maduras y una vena. El tallo de conexión madura en cordón umbilical, mientras se forman los vasos umbilicales (Figura 10). Mientras la membrana amniótica se expande, se plastifica con el mesodermo del tallo de conexión, formando su cubierta. Durante el período fetal, el intestino delgado se hernia fuera del cuerpo en el núcleo del cordón umbilical (Sweeney, 1998). El cordón umbilical conecta al embrión tardío con el corion, o al feto con la PL. Durante el desarrollo del cordón umbilical se distinguen 3 etapas: embrionaria temprana (3-6 semanas), embrionaria tardía (9-11 semanas) y fetal (Jirasek, 2004). El cordón umbilical se forma cuando, gracias al plegamiento del embrión, se acercan uno al otro el pedículo de fijación y el pedículo vitelino para luego fusionarse (Gómez, 2003).

El cordón suele tener dos arterias y una vena rodeados por tejido conectivo mucoide (gelatina de Wharton; Figura 9). Como los vasos umbilicales son más largos que el cordón, por lo regular se doblan o retuercen (More y Persaud, 1999).

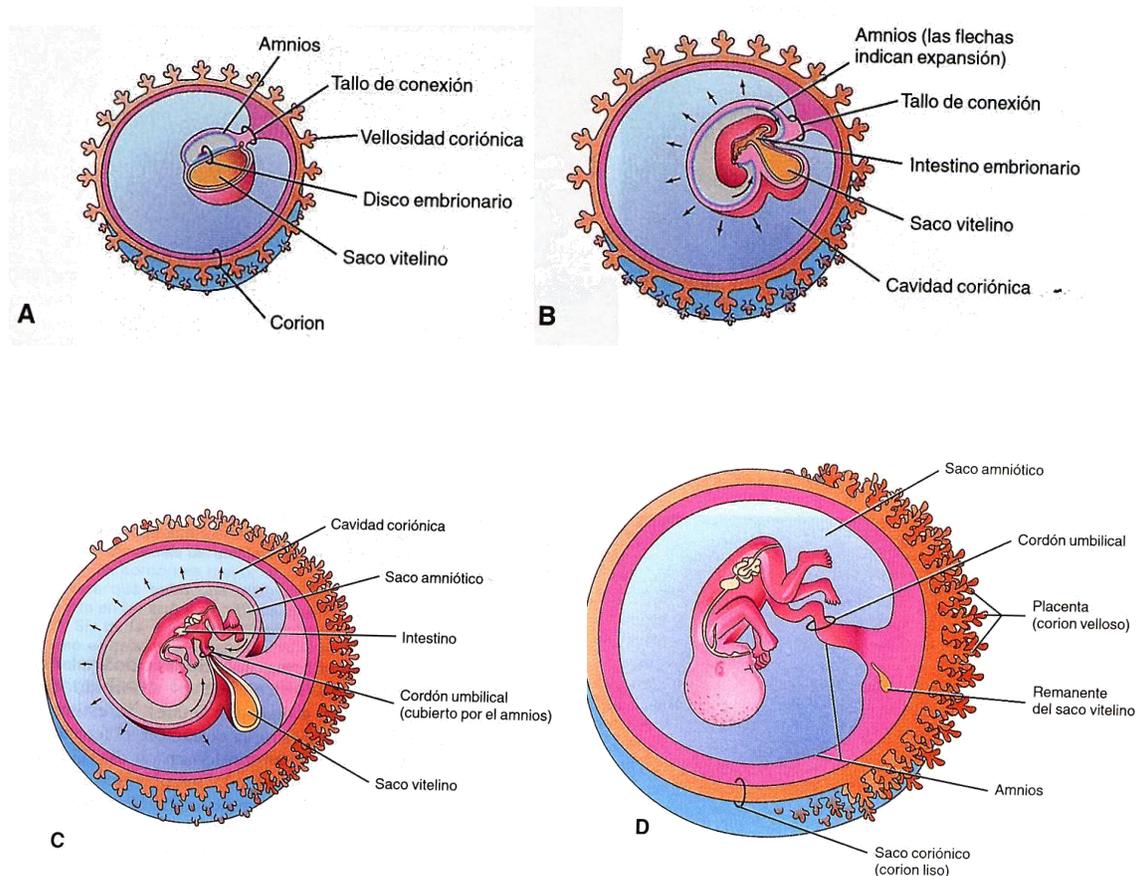


Figura 10. Desarrollo de la placenta y el cordón umbilical. A. Formación de las vellosidades coriónicas primarias y secundarias. B. Formación de las vellosidades coriónicas terciarias. C. Formación del primordio del cordón umbilical. D. Placenta y cordón umbilical. (Tomado de Moore y Persaud, 1999)

Se ha propuesto que las células troncales obtenidas de la PL después del parto de un embarazo a término tienen una variedad de ventajas. Aunque no tienen el potencial de diferenciación y proliferación de las células troncales embrionicas, las células derivadas de la PL aun son de origen fetal y pueden ser superiores a las células troncales adultas en muchos aspectos. No se requieren procedimientos invasivos para obtener el órgano, ya que este es expulsado después del nacimiento. No se generan conflictos éticos ya que el órgano será desechado de cualquier manera. Usando este órgano fácilmente accesible y libre de controversia se ha aislado una población de células multipotentes de la PL humana posparto a término (Yen et al, 2005).

Las células mesenquimales derivadas de la PL, se han obtenido y expandido en medio suplementado solo con suero fetal bovino o con aminoácidos y antioxidantes sin cambios morfológicos y característicos. Por lo tanto, la PL puede ser una atractiva y rica fuente de células troncales mesenquimales (Fukuchi et al, 2004). Según el Primer Taller sobre Celulas Troncales derivadas de Placenta existen cuatro regiones de la misma: amniótica epitelial, amniótica mesenquimal, coriónica mesenquimal y tejido trofoblástico coriónico; siendo esta ultima la región con la cual se llevo a cabo el trabajo de la presente tesis. De acuerdo a lo anterior existen al menos cuatro poblaciones celulares con características troncales o progenitoras: Células Amnióticas Epiteliales humanas (hAEC, por sus siglas en inglés), Células Estromales Amnióticas Mesenquimales humanas (hAMSC, por sus siglas en inglés), Células Estromales Coriónicas Mesenquimales humanas (hCMSC, por sus siglas en inglés) y Células Trofoblásticas Coriónicas humanas (hCTC, por sus siglas en inglés; Parolini et al, 2008). Algunos estudios señalan que las CTMs provenientes la parte fetal de la PL tienen un período de vida media menor que aquellas CTMs obtenidas de la parte materna o decidua (D-MSc, por sus siglas en ingles; Portman-Lanz et al, 2006; Soncini et al, 2007; Okamoto et al, 2007). A pesar de que existen diversos estudios donde se obtienen CTMs de PL aun no se han reportado características como el porcentaje de obtención y la frecuencia en la cual se encuentran estas células, solo se ha reportado la morfología fibroblastoide y aunque hay estudios que indican la capacidad de diferenciación neural no se sabe si estas células son capaces de expresar marcadores de tipo neural antes de ser cultivadas en medio inductor.

Algunos estudios realizados sugieren que las CTMs están presentes en la capa

subendotelial de la Vena del Cordón Umbilical (VCU) humano y que pueden ser obtenidas, cultivadas y expandidas mediante técnicas rutinarias. El cultivo primario inicial consiste de dos tipos principales de células: células endoteliales positivas vWF y PECAM-1 y CTMs positivas para ASMA (Romanov et al, 2003).

Los resultados de los estudios morfológicos y de inmunofenotipo de CTMs de VCU sugieren que estas células están relacionadas con las CTMs obtenidas de MO y otras fuentes. La morfología fibroblastoide, la ausencia de marcadores endoteliales y de leucocitos, la expresión de ASMA y las moléculas de adhesión típicas de estroma que soporta la mielopoyesis apoyan la idea de que son CTMs. Los resultados preliminares de los estudios sobre potencialidad muestran que un número predominante de células con morfología fibroblastoide que provienen de VCU acumulan lípidos o expresan fosfatasa alcalina cuando se exponen a condiciones de cultivo apropiadas (Romanov et al, 2003). Aunque los estudios morfológicos de CTMs de VCU señalan que estas son fibroblastoides, no se ha reportado si existen otros tipos o subtipos morfológicos, tampoco se han buscado marcadores neurales en ausencia de estímulo y en el caso del porcentaje de obtención solo Secco y cols. han reportado el 100% de obtención de CTMs provenientes de VCU (Secco et al, 2008).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fuente principal de Células Troncales Mesenquimales (CTMs) es la Médula Ósea (MO), tanto en estudios experimentales como de aplicación clínica. Sin embargo, los estudios señalan una disminución significativa en el número de CTMs según aumenta la edad (Rao y Mattson, 2001), esto sumado a lo invasivo del procedimiento de obtención de MO y a la dificultad para encontrar donadores compatibles, hace necesaria la búsqueda de fuentes alternativas de estas células.

Se ha demostrado la presencia de CTMs en Placenta (PL) y Vena de Cordón Umbilical (VCU), sin embargo se desconoce el porcentaje de obtención y la frecuencia de CTMs en ambas fuentes e incluso tampoco es claro si presentan la misma morfología, inmunofenotipo y potencial de diferenciación que aquellas provenientes de MO.

Por todo esto, en este trabajo se pretende establecer el porcentaje de obtención y frecuencia de CTMs provenientes de PL y VCU, en nuestras condiciones de cultivo. Además, se evaluará la morfología, inmunofenotipo y capacidad de estas células para diferenciarse *in vitro* hacia adipocitos, osteoblastos, condrocitos y células neurales y realizar una comparación con aquellas provenientes de MO.

III. HIPOTESIS

Nuestro grupo de trabajo ha establecido la técnica para cultivar CTMs a partir de Médula Ósea (MO), si nosotros empleamos las mismas condiciones de cultivo, obtendremos Células Troncales Mesenquimales (CTMs) de Placenta (PL) y Vena de Cordón Umbilical (VCU) con las mismas características respecto a porcentaje de obtención, frecuencia, morfología e inmunofenotipo que aquellas provenientes de MO. Asimismo, hemos establecido las condiciones de inducción de diferenciación de las CTMs de MO, si nosotros empleamos las mismas condiciones de diferenciación, podremos inducir a las CTM de PL y VCU hacia la diferenciación adipogénica, osteogénica, condrogénica y neural, al igual que las CTMs de MO.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General.

Realizar un estudio comparativo de la morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación de las células troncales mesenquimales de Médula Ósea y aquellas provenientes de Placenta y Vena de Cordón Umbilical.

2. Objetivos Particulares.

- Obtención y cultivo de Células Troncales Mesenquimales provenientes de Médula Ósea, Placenta y Vena de Cordón Umbilical.
- Determinar el porcentaje de obtención y frecuencia de Células Troncales Mesenquimales en muestras de Médula Ósea, Placenta y Vena de Cordón Umbilical.
- Evaluar la morfología de las Células Troncales Mesenquimales obtenidas a partir de los cultivos de Médula Ósea, Placenta y Vena de Cordón Umbilical.
- Evaluar el inmunofenotipo de las Células Troncales Mesenquimales obtenidas a partir de los cultivos de Médula Ósea, Placenta y Vena de Cordón Umbilical.
- Determinar la capacidad de diferenciación de las Células Troncales Mesenquimales obtenidas de Médula Ósea, Placenta y Vena de Cordón Umbilical, hacia células adipocíticas, osteoblásticas, condrogénicas y neurales.

V. METODOLOGIA

1. Obtención de muestras.

Las muestras de cordón umbilical y placenta se obtienen de partos o cesáreas de embarazos a término en el Hospital Regional de Zona 2^a, Troncoso del IMSS. La médula ósea de sujetos sanos, se obtiene de donadores de MO para trasplante alogénico, mediante la toma de un aspirado en la cresta iliaca postero-superior previa anestesia local, en el Hospital de Especialidades del CMN SXXI, IMSS.

2. Obtención y cultivo de células mesenquimales.

Para obtener las células mesenquimales de los aspirados de MO se usa un kit comercial basado en la selección negativa de la población (Stem Cell Technologies, Rosette Sep®). Se toman de uno a dos ml del aspirado de MO y se incuban a temperatura ambiente por 20 min con un cóctel de anticuerpos que incluye CD14, CD19, CD38 y CD66b. Las células se someten a una separación con Ficoll (Ficoll-Hypaque Plus) durante 25 min a 300 gravedades. Se obtiene la interfase y se lava con PBS. Para obtener el botón celular se centrifuga por 7 min a 1200 rpm. El conteo celular se realiza mediante una dilución con azul de tripano (Gibco) y el uso de un hemocitometro. Las células se cultivan en placas de 24 pozos (Corning) tratadas para permitir el crecimiento de células adherentes. Se cultivan a una densidad de entre 50,000 a 300,000 cel/ml en un medio comercial específico para células mesenquimales Mesencult™ (Stem Cell Technologies) suplementado con 15% de Suero Fetal Bovino (SFB) 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Las células se siembran en botellas de cultivo de 25 cm² y se mantienen en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda al 5%, los cambios posteriores se realizan cada tercer día. Una vez que han llegado a confluencia se colectan utilizando una solución de 0.5% tripsina-0.02% EDTA (Gibco) durante 7 min y se lavan con PBS y se centrifugan por 9 min a 1200 rpm. El botón celular obtenido se resuspende en medio y se cultiva en placas de 6 pozos (Corning) a una densidad de 20,000 cel/pozo en 3 ml.

Para obtener las CTMs de PL se toma una muestra de aproximadamente 5 cm de diámetro de la región fetal y se coloca en una caja petri donde se lava con buffer de fosfatos (PBS, Gibco) para quitar el exceso de sangre. Se pasa a otra caja en donde se corta en pedazos de aproximadamente 3 mm, posteriormente se coloca en un matraz Erlenmeyer y se agrega una solución de 0.5% tripsina-0.2% EDTA (Gibco, BRL) hasta

cubrir el tejido, se cubre el matraz con una gasa estéril y se incuba a 37°C en agitación constante para realizar una disgregación enzimática y mecánica al mismo tiempo. Se hace pasar el disgregado por un a malla de nylon, se colecta la suspensión celular y se centrifuga durante 9 min. a 1200 rpm. Se resuspende el botón celular en Medio Eagle Modificado por Dulbecco bajo en glucosa (DMEM-LG, por sus siglas en ingles; Gibco), suplementado con 15% de SFB, (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina y las células se siembran en una botella de 25 cm². Se cultivan a una densidad de siembra de 5,000,000 a 6,500,000 cel /ml en medio específico para células mesenquimales antes mencionado.

De las muestras de cordón umbilical se obtienen las CTMs de acuerdo al método HUVEC. Brevemente, se colocan cánulas por los extremos de la vena del cordón umbilical y se lava haciendo pasar 10 ml de solución HEPES. Se hace un amarre por uno de los extremos del cordón umbilical y se llena con colagenasa al 0.1% en medio 199 suplementado con antibióticos. El cordón se coloca en un contenedor con HEPES y se incuba a 37°C por 20 min. Se colecta la suspensión celular y se lava la vena con 10 ml de solución PBS. La suspensión celular se centrifuga por 9 min a 1200 rpm y se resuspende en DMEM-LG suplementado con 15% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Las células se siembran en botellas de cultivo de 25 cm² y se mantienen en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda al 5%, los cambios posteriores se realizan cada tercer día. Cuando los cultivos se encuentran al 80% de confluencia se colectan las células utilizando una solución de 0.5% tripsina-0.2% EDTA y se resiembra a una nueva botella de cultivo a una densidad de 20,000 cel/ml.

3. Detección de Unidades Formadoras de Colonias (CFU-F).

Las CFU-F de MO se detectan mediante la inoculación de 1.5×10^4 CTMs obtenidas de la fracción enriquecida mediante Rosette Sep® en cajas petri de 35 mm con DMEM bg al 10% SFB. Los cultivos se incuban a 37°C al 5% CO₂. Después de 3 días se retiran las células no adherentes y se cambia el medio. Se incuba por 7 días mas. Posteriormente se desecha el medio y se tiñen las células con Wright-Giemsa. Los clones con >50 células se cuentan como CFU-F.

Las CFU-F de PL y VCU se detectan mediante el cultivo de las CMN obtenidas

de la digestión enzimática. De la misma forma que para las CFU-F de MO los clones con >50 células se cuentan como CFU-F.

4. Morfología de las CTMs.

Para determinar la morfología de las CTMs, se siembran 6×10^4 en una caja petri de 100 mm (Cell Culture Dish, Corning) y cuando las células llegan a una confluencia del 70% se desecha el medio, se adiciona PBS por 10 min y se tiñe con Azul de Toluidina durante 40 min. La caja se lava con agua destilada y se deja secar. Posteriormente se observa bajo el microscopio y se cuentan los diferentes tipos celulares de acuerdo a su morfología.

5. Inmunofenotipo de las células mesenquimales.

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

6. Capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.

Para inducir la diferenciación osteogénica, se usan células mesenquimales de la 2da resiembra las cuales se cultivan en medio osteogénico (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) y en cámaras con base desmontable para ser usadas como laminilla (Lab-Tek II Chamber Slide System, Nalgueen Nunc Inter) durante 4 semanas y con cambios de medio 3 veces por semana. Para la detección de depósitos de calcio con Von Kossa, se incuba con PBS por 10 min a temperatura ambiente, se adiciona

nitrate de plata al 5% y se incuban en la luz por 3 h, se lava con agua destilada y se adiciona hiposulfito de sodio por 2 min, se lava con agua destilada y se contrasta con azul de toluidina, se deshidrata y se monta con xileno.

Para inducir la diferenciación condrogénica se usan células de 2da resiembra, las cuales se colocan en un tubo de polipropileno de 15 ml y se centrifugan a 1000 rpm por 5 min para obtener un botón celular (del cual se forma la micromasa en presencia de TGF- β 1, que induce la síntesis de fibras de fibronectina y otros proteoglicanos presentes en la matriz extracelular), se agrega medio condrogénico y se cultiva durante 4 semanas. Se realizan cambios de medio 3 veces por semana. El medio condrogénico consiste en DMEM alta glucosa suplementado con 0.1 μ M de dexametasona, 50 μ g/ml AsA, 100 μ g/ml de piruvato de sodio, 40 μ g/ml de prolina, 10 ng/ml de TGF- β 1 y 50 mg/ml de ITS⁺ premix (Beckton-Dickinson; 6.25 μ g/ml de insulina, 6.25 μ g/ml transferina, 6.25 ng/ml de acido selénico, 1.25 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) y 5.35 mg/ml de ácido linoleico). Para evaluar la diferenciación condrogénica se fijan las micromasas en formaldehído al 4% y posteriormente se deshidratan en diluciones seriales de etanol y se incluyen en bloques de parafina. Los bloques se cortan en listón y se tiñen con azul de toluidina para la detección de mucopolisacáridos y Tricrómico de Masón para determinar la presencia de colágeno.

Para inducir la diferenciación adipogénica se usan también células de la 2da resiembra, las cuales son cultivadas en medio adipogénico (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) durante 4 semanas. Se realizan cambios de medio 3 veces por semana. Para evaluar la diferenciación adipogénica, se incuban las cajas durante 10 minutos con PBS y la capa celular se fija con formalina buffer al 10% durante 1 hora. Se adiciona isopropanol al 60% durante 5 min, y posteriormente se agrega Rojo Oleoso durante 20 min. Se lava con agua destilada y se contrasta con hematoxilina de Harris por 1 min. Las laminillas se montan con propilenglicol, se dejan secar y se observan bajo el microscopio. Los lípidos se tiñen de rojo.

7. Inducción Neural y Expresión de Proteínas Neurales.

Para la inducción neural se siembran 1×10^4 CTMs se cultivan en cámaras Lab-Tek II (Chamber Slide System, Nalgen Nunc Inter) y en medio DMEMbg suplementado con 10% de SFB o en presencia de medio de diferenciación neural Neurocult (NS-A

basal medium with NS-A differentiation supplements; STI; StemCells Technologies) durante 10 días, con dos cambios de medio, retirando la mitad del medio por cada cambio. Posteriormente las células se fijan con acetona y se lavan en PBS con 1% de Triton X-100. Las cámaras se incuban con PBS-Triton suplementado con 10% de suero de caballo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se incuban toda la noche con uno de los siguientes anticuerpos mono- o policlonales (Mo Abs o Po Abs, respectivamente): anti-Nestina, anti-NF-200Kd, anti-Map2, anti-NeuN (todas Mo Ab, Chemicon, Int. CA, USA) y anti-GFAP (PoAb, DAKO, Carpinteria, CA). Las cámaras se lavan con PBS-Tritón y se incuban por dos horas con uno de los siguientes anticuerpos secundarios: cabra anti-conejo IgG-FITC (Chemicon) y cabra anti-ratón IgG-Alexa 450 (Molecular Probes). Para teñir los núcleos se utiliza yoduro de propidio. Las cámaras se montadas con medio para montar Vectashield (H-1000; Vector Laboratory, Burlingame, CA). Los análisis se realizan usando un microscopio Axiovert 100 M y un sistema de análisis confocal LSM 510 Zeiss. Los fluoroforos se excitan con láser de ion argón de 488 nm y láser de Ion HeNe de 543 nm. La emisión de fluorescencia se monitorea con el paso a bandas de 505-530 nm ó el paso a filtros de 650 nm de longitud.

8. Análisis Estadístico.

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

VI. RESULTADOS

1. Obtención de CTMs de MO, PL y VCU.

En el presente estudio fue posible obtener CTMs a partir de las tres fuentes estudiadas: aspirados de MO, muestras de la región trofoblástica de PL y de VCU.

2. Porcentaje de Obtención y Frecuencia de CTMs en MO, PL y VCU.

Se procesaron 9 muestras de MO (Tabla 1), 8 muestras de tejido placentario de la región trofoblástica (Tabla 1) y 59 muestras de VCU (Tabla 2) de partos y cesáreas de embarazos a término, de los cuales, se obtuvieron CTMs en 9, 8 y 6 de las muestras procesadas respectivamente, lo que resulta en un 100% de obtención tanto de MO como de PL y un 10% de VCU (Tabla 3).

Muestra MO	No inicial de CMN en MO	No de CFU-F en MO
1	400,000	14
2	108,288	1
3	275,372	6
4	109,000	39
5	1,292,500	6
6	ND	ND
7	ND	ND
8	ND	ND
9	ND	ND
Muestra PL	No inicial de CMN en PL	No de CFU-F en PL
1	800,000	1
2	247,000	3
3	64,000,000	7
4	30,400,000	3
5	8,400,000	2
6	39,200,000	4
7	34,500,000	3
8	90,000,000	10

Tabla 1. Número de Células Mononucleares (CMN) y número de Unidades Formadoras de Colonias (CFU-F) obtenidas inicialmente por muestra en Médula Ósea (MO) y Placenta (PL).

Muestra VCU	No inicial de CMN en VCU	No de CFU-F en VCU	Muestra VCU	No inicial de CMN en VCU	No de CFU-F en VCU	Muestra VCU	No inicial de CMN en VCU	No de CFU-F en VCU
1	ND	ND	21*	ND	22	41	ND	-
2	ND	ND	22	ND	ND	42	ND	-
3	1,400,000	-	23	ND	-	43	ND	-
4	30,500	-	24	ND	-	44	ND	-
5	285,000	-	25*	ND	6	45	ND	-
6	600,000	-	26*	ND	2	46	ND	-
7	576,000	-	27	ND	ND	47	ND	-
8	206,250	-	28*	ND	2	48	ND	-
9	279,000	-	29	ND	-	49	ND	-
10	375,000	-	30	ND	-	50	ND	-
11	125,000	-	31	ND	-	51*	ND	4
12*	50,000	29	32	ND	-	52	ND	-
13	150,000	-	33	ND	-	53	ND	-
14	ND	-	34	ND	-	54	ND	-
15	ND	-	35	ND	-	55	ND	-
16	ND	ND	36	ND	-	56	ND	-
17	ND	-	37	ND	-	57	ND	-
18	ND	-	38	ND	-	58	ND	-
19	ND	-	39	ND	-	59	ND	-
20	ND	-	40	ND	-			

Tabla 2. Número de Células Mononucleares (CMN) y número de Unidades Formadoras de Colonias (CFU-F) obtenidas inicialmente por muestra en Vena de Cordón Umbilical (VCU). *Muestras en las que se obtuvieron CTMs.

La frecuencia de CTMs en MO se obtuvo mediante el conteo de CFU-F de acuerdo a lo descrito en metodología, así obtuvimos 1 CTM en 0.031×10^6 CMN y en PL fue de 1 CTM en 8×10^6 CMN, lo que nos indica que las CTMs son más frecuentes en MO que en PL (Tabla 3). Con respecto a la frecuencia de CTMs en VCU, esta no pudo ser determinada ya que el método de obtención usado permite el desprendimiento de la matriz de la vena procesada y en dicha matriz quedan embebidas muchas células al momento de la obtención, lo cual hace que el conteo celular sea muy variable en cada muestra y por lo tanto no sea confiable. Los resultados obtenidos nos indican que se obtienen más frecuentemente CTMs en MO que en PL.

Tipo de Muestra	No de Muestras Procesadas	No de muestras Positivas	% de Obtención	No de CMN $\times 10^6$	Frecuencia de CTMs/CMN
MO	9	9	100	22.7-200 ^a	$1/0.03 \times 10^6$ ^b
PL	8	8	100	8.4-90 ^a	$1/8 \times 10^6$ ^b
VCU	59	6	10	ND	ND

Tabla 3. Porcentaje de obtención y frecuencia de CTMs en muestras de MO, PL y VCU. (a) Rango de CMN obtenidas en las muestras positivas para CTMs, (b) Promedio de los valores obtenidos de CMN en las muestras positivas para CTMs.

3. Morfología de CTMs de MO, PL y VCU.

Se establecieron capas de CTMs de MO, PL y VCU las cuales fueron teñidas con azul de toluidina al llegar a una confluencia del 70% para analizar la morfología celular (Figura 1A).

En los cultivos de CTMs de MO se identificaron cuatro tipos celulares morfológicamente distintos, los cuales fueron nombrados de la siguiente forma de acuerdo a su tamaño y características: grande, células con el citoplasma muy extendido; fibroblastoide, células alargadas; neural, células con extensiones citoplásmicas parecidas a dendritas y pequeña, células con el citoplasma reducido (Figura 1B).

Al analizar la morfología de las CTMs provenientes de MO, se observó que el 8.3% correspondió a las células grandes (Figura 1B). Por su parte, el tipo celular más común fue el que presentó morfología fibroblastoide con un 69.9% y más aún, dentro de esta población celular se identificaron cinco tipos morfológicamente distintos y sin diferencias significativas en los porcentajes obtenidos entre ellos: romboide, célula con el citoplasma extendido en forma de rombo; lamelopodia-lamelopodia, célula alargada en los dos extremos anchos; lamelopodia-filopodia, célula alargada con un extremo ancho y un extremo en punta; filopodia-filopodia, célula alargada con los dos extremos en punta y triangular, célula con el citoplasma extendido en forma de triángulo (Figura 1C). Las células con morfología neural conformaron el 6.2% de las CTMs de MO. Mientras las células pequeñas correspondieron al 15.5% de las células en cultivo (Figura 1B). Se encontraron diferencias significativas entre las células que presentaron morfología neural y pequeña (Figura 1B).

En lo que se refiere a la morfología de las CTMs obtenidas de PL y VCU también se encontraron los mismos cuatro tipos morfológicos celulares.

En PL las células grandes conformaron el 9.6% de la población total. De la misma forma que en MO, la morfología fibroblastoide fue la más frecuente con el 73.7% (Figura 1B) y se observaron los cinco tipos celulares morfológicamente distintos presentes en cultivos de MO y de igual forma sin diferencias significativas en los porcentajes entre ellos.

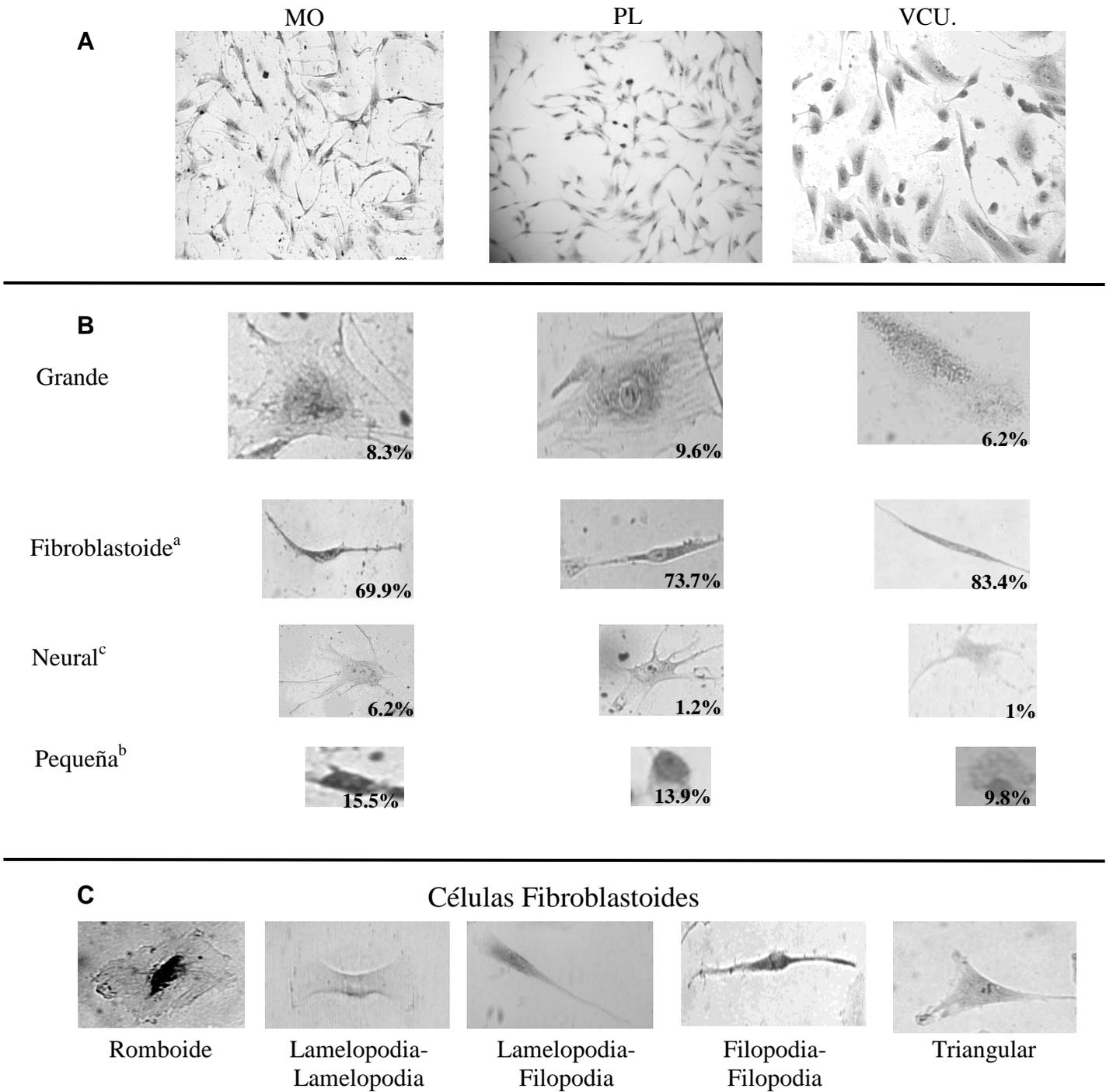


Figura 1. Morfología de CTMs de MO, PL y VCU. Se observaron diferentes tipos morfológicos en los cultivos celulares a partir de las tres fuentes. Cada tipo celular fue nombrado según las características morfológicas observadas, los resultados se presentan en porcentajes de cada tipo celular y corresponde a la media de los valores a partir de experimentos separados (MO n=9; PL n=5; VCU n=5). (A) Cultivo de CTMs de MO, PL y VCU teñidos con Azul de Toluidina, 10x. (B) Tipos celulares morfológicamente distintos; grande ($93 \pm 21 \mu$ de longitud); fibroblastoide ($45 \pm 25 \mu$ de longitud); Neural ($73 \pm 5.2 \mu$ de longitud) y células pequeñas ($12 \pm 2.7 \mu$ de longitud), 20X. (C) Tipos celulares morfológicamente distintos, encontrados dentro de la morfología fibroblastoide, 20X. (a) Significativamente mayor a todos los demás tipos celulares dentro de los cultivos de MO, PL y VCU. (b) Significativamente mayor a células con morfología neural dentro de los cultivos de MO, PL y VCU ($p < 0.05$). (c) Significativamente mayor en cultivos de MO con respecto a PL y VCU ($p < 0.05$).

El 1.2% de las células en cultivo correspondieron a las células con morfología neurítica y el 13.9% a células pequeñas, valores significativamente diferentes.

En los cultivos de CTMs provenientes de VCU, las células grandes representaron el 6.2% del total de la población celular. De la misma forma que en cultivos de CTMs de MO y PL, el tipo celular más frecuente fue el fibroblastoide con el 83.4%. Igualmente se observaron los cinco tipos celulares morfológicos en la población fibroblastoide, sin diferencias significativas en los porcentajes entre ellos. Se observaron diferencias significativas en los porcentajes obtenidos entre células pequeñas (9.8%) y neuríticas (1%).

Al comparar los porcentajes obtenidos en la morfología de las CTMs (cuatro tipos celulares) entre las tres fuentes evaluadas, no se observaron diferencias significativas entre los valores para células grandes, fibroblastoides y pequeñas, sin embargo el porcentaje de células neuríticas fue mayor en los cultivos de CTMs de MO en comparación con aquellos de PL y VCU (Figura 1B).

Todo lo anterior nos indica que en los cultivos de CTMs de las tres fuentes analizadas se presentan distintos tipos celulares con diferente morfología y que el porcentaje de ellos es similar en dichas fuentes. No obstante, se debe destacar que se encontró un mayor porcentaje de células con morfología neurítica en los cultivos de CTMs provenientes de MO que en aquellos de PL y VCU.

4. Inmunofenotipo de CTMs de MO, PL y VCU.

Con el fin de conocer el inmunofenotipo de las CTMs provenientes de MO, PL y VCU, se analizó la expresión de distintos antígenos de superficie mediante citometría de flujo (Figura 2). Las células de las tres fuentes fueron negativas para marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34 y CD45, así como para CD62L (receptor de CD34) y HLA-DR (Tabla 4; Figura 2). También fueron negativas para el marcador endotelial CD31.

Las CTMs de MO, PL y VCU expresaron moléculas de adhesión como CD29, CD44, CD49b, CD58 y CD166 (Tabla 4). En el caso de CD49b se observaron diferencias significativas entre las CTMs provenientes de MO y aquellas de PL y VCU, ya que en la primera observamos una expresión media, mientras que en las dos últimas la expresión fue alta (Tabla 4). El resto de los marcadores de superficie celular no presentaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de expresión entre las diferentes fuentes celulares, sin embargo, las CTMs de las tres fuentes presentaron fluctuaciones en la expresión de CD29 ($46\pm 32\%$, $81\pm 23\%$ y $81\pm 17\%$ para MO, PL y VCU, respectivamente; Tabla 4). En el caso de CD44 solo las CTMs de MO y PL mostraron expresión variable entre las muestras analizadas ($90\pm 13\%$ y $86\pm 29\%$, respectivamente), a diferencia de aquellas provenientes de VCU ($95\pm 3\%$; Tabla 4). Con respecto a CD58, en las muestras de CTMs de las tres fuentes, su expresión fue muy variable entre ellas ($75\pm 32\%$, $72\pm 20\%$ y $88\pm 13\%$ para MO, PL y VCU, respectivamente; Tabla 4). Por su parte MO y PL presentaron una expresión alta y uniforme de CD166 a diferencia de VCU (Tabla 4).

Las células provenientes de las tres fuentes presentaron positividad para los marcadores propuestos como característicos de CTMs CD73, CD90 y CD105 (Dominici et al, 2006). En el caso de CD73 las células provenientes de MO, PL y VCU presentaron una expresión alta, aunque se encontró variación en VCU ($81\pm 18\%$), a diferencia de MO y PL donde se observó una expresión mas uniforme (97 ± 3 y 97 ± 6 , respectivamente; Tabla 4). Por otro lado, en la expresión de CD90 en MO, PL y VCU se observaron fluctuaciones de $85\pm 15\%$, $57\pm 21\%$ y $67\pm 29\%$, respectivamente (Tabla 4). En lo que se refiere a CD105 se observó una alta expresión en CTMs de MO y PL (90 ± 13 y 92 ± 8 , respectivamente), mientras que en VCU los valores fueron muy variables ($59\pm 35\%$; Tabla 4).

Antígeno	MO	PL	VCU
CD105	90±13	92±8	59±35 ^b
CD73	97±3	97±6	81±18 ^b
CD90	85±15 ^b	57±21 ^b	67±29 ^b
CD13 ^c	98±1	98±1	94±3
CD44	90±13	86±29 ^b	95±3
CD166	92±12	90±12	73±18 ^b
HLA-ABC	94±9	94±10	81±18 ^b
CD29	46±32 ^b	81±23 ^b	81±17 ^b
CD49b ^a	58±14	98±2	97±5
CD58	75±32 ^b	72±20 ^b	88±13 ^b
CD10	32±53 ^b	3±2	31±35 ^b
c-kit	8±11	14±18	2±2
CD133	2±1	4±4	0
CD14	2±2	1±1	1±1
CD31	1±1	1±1	1±1
CD34	0	0	0
CD62L	0	0	1±2
CD45	1±1	3±5	1±2
HLA-DR	3±3	1±1	1±1
CD54 ^a	23±11	73±21	71±21
PDGFR-β	97±11	63±25 ^b	29±7

Tabla 4. Expresión de marcadores de superficie de las CTMs de MO, PL y VCU determinado por citometría de flujo. Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para los distintos marcadores y corresponde a la media de los valores a partir de experimentos separados (MO n=9; PL n=5; VCU n=6). (a) Se encontraron diferencias significativas. (b) No se encontraron diferencias significativas con las otras fuentes, sin embargo, su expresión fue distinta entre las muestras. (c) La expresión es homogénea y uniforme en las tres fuentes.

Las tres fuentes fueron positivas para HLA-ABC y CD13. En el caso de CD13 MO, PL y VCU presentaron una expresión alta y homogénea en todas las muestras analizadas ($98\pm 1\%$, $98\pm 1\%$ y $94\pm 3\%$, respectivamente). Se debe mencionar que este fue el antígeno en el que se observó una menor variación en su expresión, entre las muestras de las tres fuentes (Tabla 4).

Para el antígeno CD54 se observaron diferencias significativas entre las CTMs de MO y aquellas provenientes de PL y VCU, ya que detectamos una menor expresión en la primera ($23\pm 11\%$) con respecto a las dos últimas ($73\pm 21\%$ en PL y $71\pm 21\%$ en VCU; Tabla 4).

Con respecto a PDGFR- β no se observaron diferencias significativas en los patrones de expresión entre CTMs de MO (97 ± 11) y PL (63 ± 25), aunque en esta última su expresión fue variable entre muestras, sin embargo en CTM de VCU se observó una expresión menor ($29\pm 7\%$) con respecto a aquellas de MO. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD10, c-kit y CD133 entre las tres fuentes (Tabla 4).

Los resultados anteriores nos muestran que las CTMs provenientes de PL y VCU tienen un patrón similar al de MO en la expresión de antígenos de superficie celular, sin embargo la expresión diferencial en algunos marcadores, sobre todo aquellos considerados como característicos de CTMs, indica que pueden existir mas diferencias entre las CTMs de MO y aquellas de VCU, que entre las de MO y de PL.

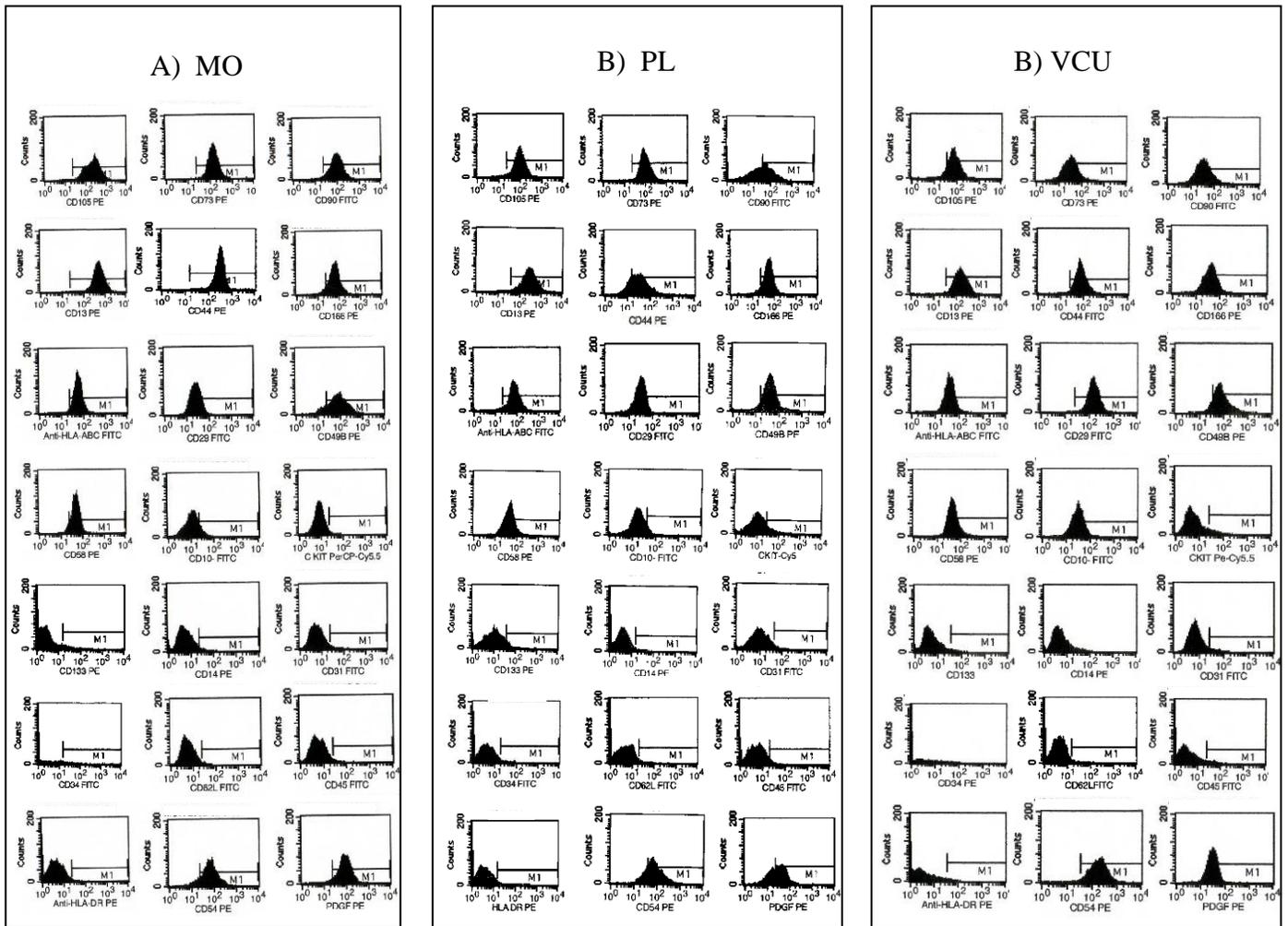


Figura 2. Citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie de las CTMs provenientes de A) Médula Ósea, B) Placenta y C) Vena de Cordón Umbilical.

5. Capacidad de Diferenciación de CTMs de MO, PL y VCU.

Se analizó la capacidad de diferenciación de las CTMs provenientes de MO (n=5), PL (n=5) y VCU (n=3), después de haber sido cultivadas en condiciones particulares que favorecieron la diferenciación osteogénica, adipogénica, condrogénica y neural, con sus respectivos controles en ausencia de medios inductores.

5.1 Capacidad de Diferenciación Osteogénica.

La capacidad de diferenciación osteogénica de las CTMs de MO, PL y VCU fue determinada después de haber inducido los cultivos celulares con medio inductor durante cuatro semanas. En todas las muestras de MO se observó mineralización, la cual fue comprobada por la positividad a la tinción con Von Kossa que tiñe los depósitos de calcio. Estos fueron observados en el 56% de la capa celular (Figura 3B), además, las células que fueron cultivadas en ausencia de medio inductor también presentaron depósitos de calcio evidenciados por la tinción con Von Kossa en un 16% (Figura 3A).

En los cultivos de PL con medio de inducción osteogénica también se observó mineralización y positividad para la tinción con Von Kossa en el 60% de la capa celular (Figura 3C) y de la misma forma que en MO, las células que fueron cultivadas en ausencia de medio inductor, fueron positivas para esta tinción en un 25% de la capa celular (Figura 3D).

Con respecto a las CTMs de VCU cultivadas en presencia de medio inductor también se observaron depósitos de calcio que indicaban mineralización y que fueron positivos para Von Kossa en un 35% de las células presentes en cultivo (Figura 3E), de igual manera que en MO y PL se observó mineralización y tinción positiva para Von Kossa en las capas celulares cultivadas en ausencia de medio osteogénico en un 20% (Figura 3F).

Los resultados anteriores nos indican que las CTMs provenientes de PL y VCU tienen la capacidad de diferenciarse hacia el linaje osteogénico de la misma manera que las CTMs de MO, ya sea en presencia o en ausencia de medio inductor osteogénico.

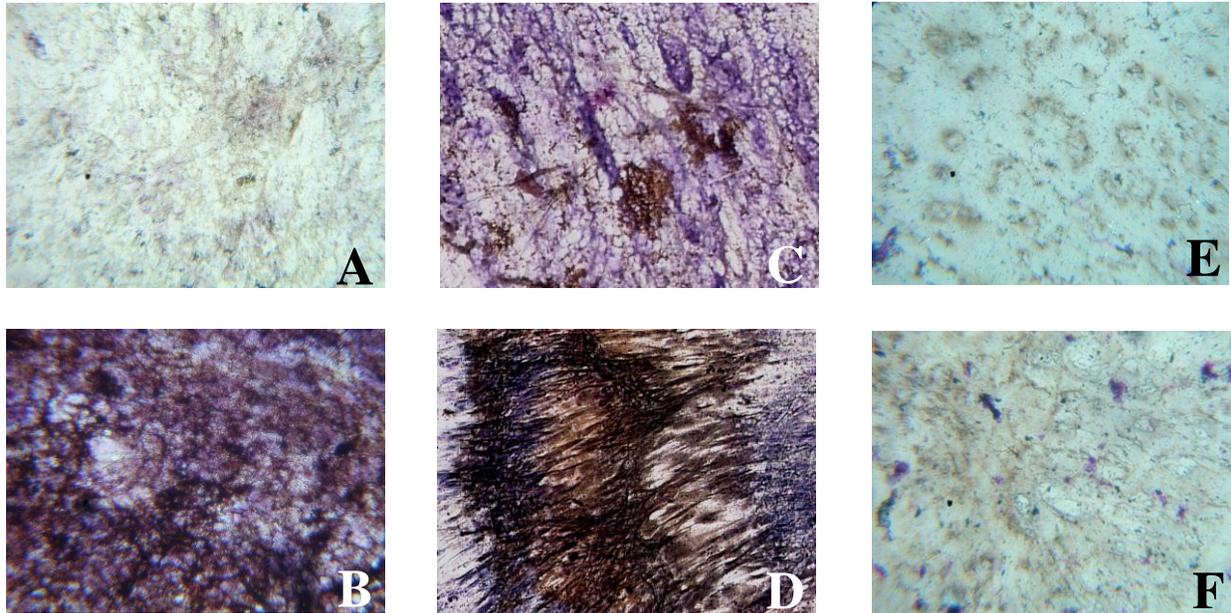


Figura 3. Diferenciación osteogénica de CTMs de MO, PL y VCU. La diferenciación osteogénica se indica por la presencia de depósitos de calcio positivos para la tinción con Von Kossa, la positividad se observa en color café y negro (A, C y E). Diferenciación a osteoblastos sin medio inductor MO, PL y VCU respectivamente 20x (B, D y F). Diferenciación hacia osteoblastos en presencia de medio inductor de MO, PL y VCU respectivamente 20x. (Imágenes representativas).

5.2 Capacidad de Diferenciación Adipogénica.

Se determinó la capacidad de diferenciación adipogénica de las CTMs de MO, PL y VCU, después de inducir las capas celulares con medio de diferenciación adipogénica durante cuatro semanas. Se observó la formación de adipocitos con vacuolas lipídicas en los cultivos de CTMs de MO, en un 25% de las células que fueron inducidas, las mismas que fueron positivas para la tinción con Rojo Oleoso (Figura 4B). Las células de MO cultivadas en ausencia de medio inductor no presentaron la formación de vacuolas lipídicas ni positividad para la tinción con Rojo Oleoso (Figura 4A).

Las CTMs de PL cultivadas con medio adipogénico se observó la formación de adipocitos en dos de las cinco muestras que fueron analizadas y las tres restantes no presentaron la formación de adipocitos aunque se puede observar la presencia de vacuolas lipídicas las cuales fueron positivas para la tinción con Rojo Oleoso, esto se observó en un 30% de las células presentes en el cultivo, lo cual indica la diferenciación adipogénica (Figura 4D). Al igual en la MO las capas celulares cultivadas en ausencia de medio inductor no presentaron la formación de adipocitos y fueron negativas para la tinción con Rojo Oleoso (Figura 4C).

En las capas celulares de VCU cultivadas con medio de inducción adipogénica se observó positividad para Rojo Oleoso en el 33% de las CTMs en el cultivo (Figura 4F). De la misma forma que en MO y PL no se observó formación de adipocitos con vacuolas lipídicas en las células cultivadas en ausencia de medio de inducción (Figura 4E).

Estos resultados nos indican que las CTMs de PL y VCU son capaces de formar adipocitos con vacuolas lipídicas después de haber sido estimuladas con medio de inducción adipogénica, al igual que las CTMs de MO. También pudimos observar que ninguna de las CTMs cultivadas en ausencia de medio de inducción adipogénica se diferenció hacia el linaje adipogénico.

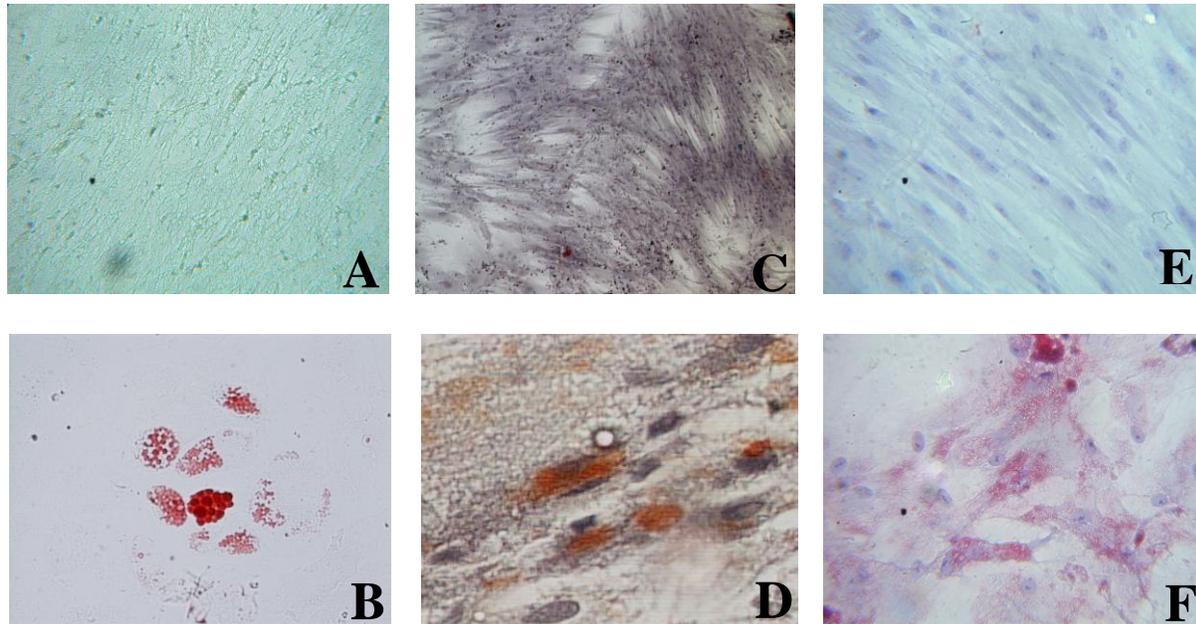


Figura 4. Diferenciación adipogénica de CTMs de MO, PL y VCU. La diferenciación es evidenciada por la positividad a la tinción de Rojo Oleoso (A, C y E). Cultivo celular de MO, PL y VCU sin inducción adipogénica, negativo para Rojo Oleoso 20x (B, D y F). Formación de adipocitos positivos para Rojo Oleoso en cultivos de MO, PL y VCU en presencia de medio inductor 20x. (Imágenes representativas)

5.3 Capacidad de Diferenciación Condrogénica.

Para la diferenciación condrogénica de las CTMs de MO, PL y VCU se realizaron cultivos en sistema de micromasa y en presencia de TGF- β . Lo que originó una masa celular rica en matriz, en multicapas y con la acumulación de proteoglicanos. Las CTMs de MO se diferenciaron hacia condrocitos, capaces de producir mucopolisacaridos (proteoglicanos sulfatados) los cuales se pudieron identificar con la tinción de Azul Alciano (Figura 5A).

Se realizó la tinción de Tricrómico de Masón, para identificar el tipo de cartílago (hialino y fibroso) formado en las micromasas. Cuando se observaron bajo el microscopio, los cortes de micromasas formadas por las CTMs de MO, fue posible identificar la presencia de cartílago hialino en un 90%, el cual se caracterizó por la formación de pequeños grupos localizados en una misma área y rodeados por matriz extracelular, mostrando una coloración grisácea con la tinción de Tricrómico de Masón (Figura 5B). De la misma forma se pudo observar la diferenciación hacia cartílago fibroso en un 10%, el cual se caracterizó por la formación de fibras de colágeno (Figura 5B). Las CTMs de MO cultivadas en ausencia de medio inductor no fueron capaces de crecer en sistema de micromasa y no pudieron diferenciarse hacia el linaje condrogénico.

Al igual que las CTMs de MO, aquellas provenientes de PL también se diferenciaron hacia condrocitos, produciendo mucopolisacaridos, que fueron evidenciados por la tinción positiva de Azul Alciano (Figura 5C). Al realizar la tinción con Tricrómico de Masón se observó en los cortes de micromasas la formación de cartílago hialino en un 85% y un 15% de cartílago fibroso (Figura 5D). De la misma forma que en MO, cuando las CTMs de PL fueron cultivadas en ausencia de medio inductor estas no pudieron crecer en micromasa y no fueron capaces de diferenciarse hacia condrocitos.

Las CTMs de VCU fueron capaces de diferenciarse hacia condrocitos y de la misma forma que las CTMs provenientes de MO y PL también produjeron mucopolisacaridos los cuales fueron identificados con la tinción de Azul Alciano (Figura 5E). Al observar los cortes de micromasa se encontró la formación de cartílago hialino en un 80% y un 20% de cartílago fibroso con la tinción de Tricrómico de Masón (Figura

5F). En estas células tampoco se observó la formación de micromasa en ausencia de medio de inducción condrogénico y por lo tanto no hubo diferenciación hacia el linaje condrogénico.

Estos resultados indican que las CTMs de PL y VCU tienen la capacidad de crecer en forma de micromasa y diferenciarse hacia el linaje condrogénico al ser cultivadas en medio inductor de la misma manera que las CTMs de MO, además el tipo de cartílago se presenta en proporciones similares en CTMs provenientes de las tres fuentes.

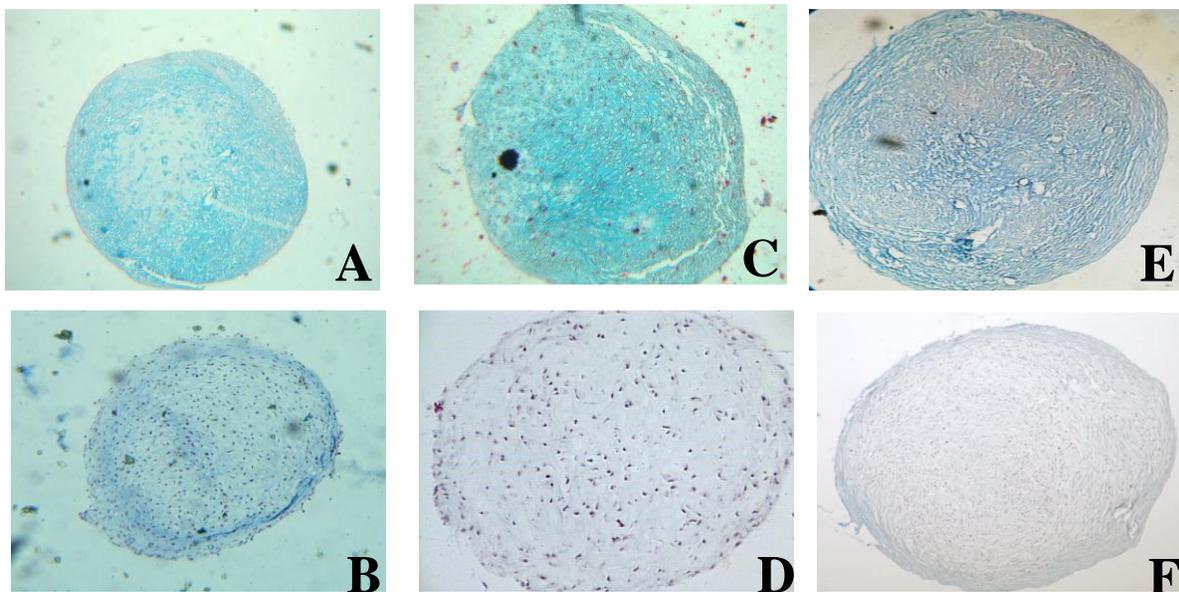


Figura 5. Diferenciación condrogénica de las CTMs de MO, PL y VCU. Se indica la diferenciación condrogénica por la presencia de mucopolisacáridos evidenciados por la positividad a Azul Alciano en MO, PL y VCU (A, C y E, respectivamente) 20x. El tipo de cartílago fue analizado por la morfología celular y el colágeno producido en las micromasas de CTMs a partir de MO, PL y VCU (B, D y F, respectivamente) 20x. (Imágenes representativas).

6. Capacidad de Diferenciación Neural y Expresión de Proteínas Neurales en CTMs de MO, PL y VCU.

Previamente se ha reportado la presencia de genes neurales en células troncales estromales no diferenciadas (Tremain et al, 2001; Woodbury et al, 2002). Además la expresión de proteínas neuronales ha sido detectada en CTM no inducidas (Tondreau et al, 2004). En el presente estudio se detectó un tipo celular adherente con extensiones citoplásmicas tipo neurita que correspondió a un 1%-6.2% de células mesenquimales en cultivos de las tres fuentes. Este hallazgo sugirió la presencia de subpoblaciones mesenquimales con características neurales.

Para determinar la capacidad de expresión de proteínas neurales de CTMs de MO, PL y VCU se cultivaron estas células en ausencia o presencia de medio de diferenciación neural Neurocult (Battula et al, 2007) por 10 días. La expresión de proteínas neurales se evaluó por medio de inmunofluorescencia y microscopia confocal. Las proteínas analizadas fueron: Nestina, que se expresa en células neurales inmaduras; Neurofilamento-200 (NF-200), Proteína 2 Asociada a Microtúbulos (MAP2) y Proteína de Núcleo Neuronal (NeuN), todas expresadas en células neuronales maduras; y Proteína Ácida Glial Fibrilar (PAGF), proteína expresada por astrocitos.

En las CTMs de MO se expresaron las 5 proteínas neurales en un rango del 2% al 4% de las células cultivadas en ausencia de medio inductor. Cuando las células fueron estimuladas con medio de inducción neural, el porcentaje de células que expresaron las proteínas se incremento de forma significativa, siendo del 24% para Nestina, 58% para NF, 35% para MAP2 y 24% para NeuN, exceptuando a PAGF el cual solo se expresó en el 3% de las células (Figura 6).

También en las CTMs provenientes de PL se expresaron las 5 proteínas neurales en un rango del 3% al 6% cuando las células fueron cultivadas en ausencia de medio de inducción neural. De la misma forma que en MO, cuando las células son cultivadas en medio inductor se incrementa el porcentaje de células que expresan estas proteínas, 15% para Nestina, 27% para NF, 32% para MAP2, 10% para NeuN y 15% para PAGF (Figura 6).

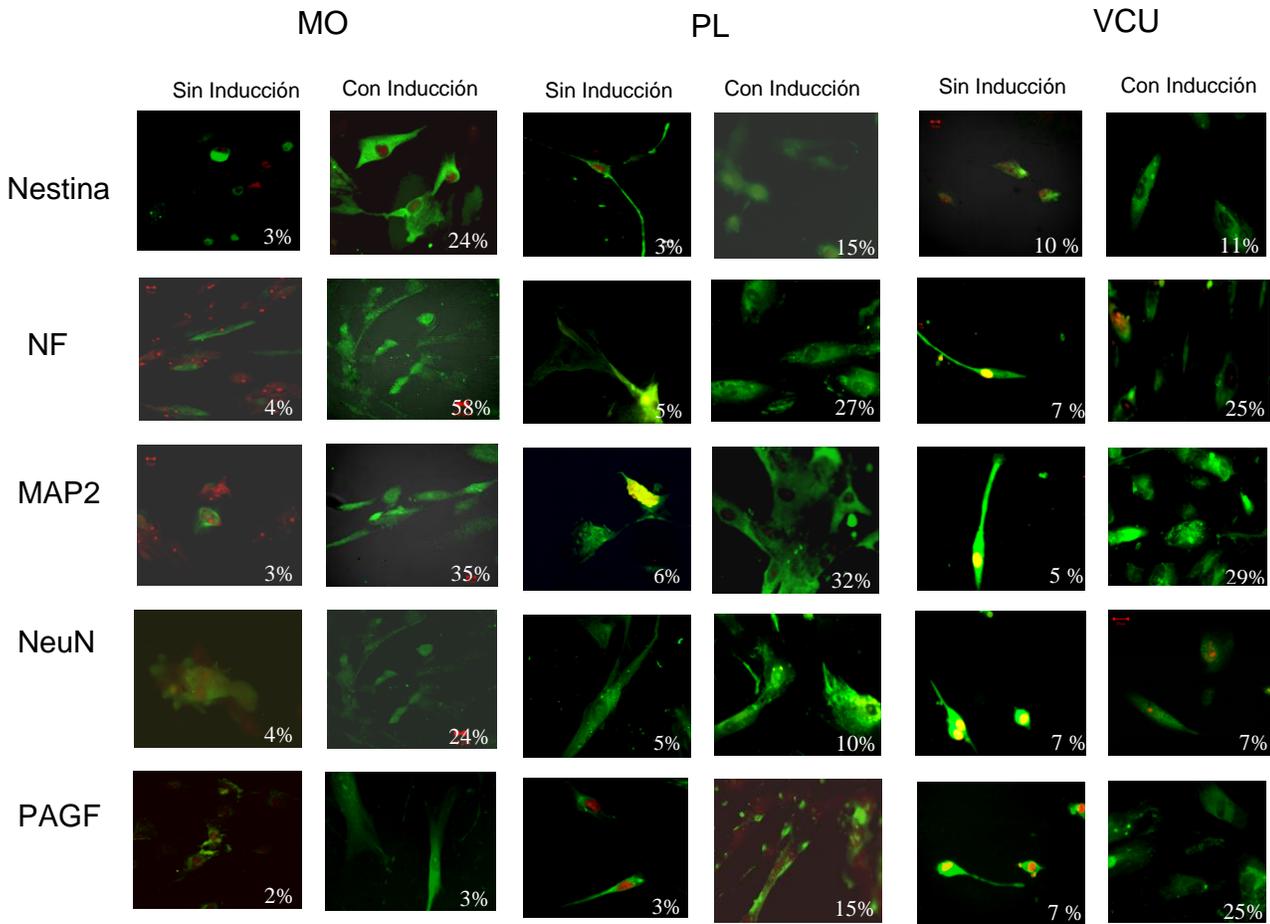


Figura 6. Expresión de proteínas neurales en CTMs de MO, PL y VCU. Las CTMs fueron teñidas con anti-Nestina, anti-NF-200 Kd, anti-NeuN y anti-MAP2 (todas para células neurales) y como anticuerpo secundario se uso un IgG-Alexa 450 cabra anti-ratón. La expresión de GFAP (marcador de astrocitos) se realizó con anticuerpo anti-GFAP y como anticuerpo secundario se uso un IgG-FITC cabra anti-conejo. Para analizar las células se contratiñó con yoduro de propidio y se analizó con un filtro de rodamina (rojo). Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para las proteínas correspondientes en ausencia o presencia de medio inductor (20X). (Imágenes representativas).

En los cultivos de CTMs de VCU sin inducción se observó la expresión de las 5 proteínas neurales analizadas en un rango de 5% al 10%. Al igual que en aquellas provenientes de MO y PL cuando se estimulan las células con medio inductor se observó un incremento en la expresión de las proteínas, 11% para Nestina, 25% para NF, 29% para MAP2 y 25% para PAGF, excepto en NeuN en la cual no se observó ningún incremento ya que se mantuvo el 7% observado en aquellas células que no fueron inducidas (Figura 6).

En las tres fuentes se observó un incremento en la expresión de las proteínas neurales analizadas, con excepción de PAGF en CTMs provenientes de MO la cual solo se incremento en un 1%, Nestina en CTMs de VCU, que al igual que aquellas de MO solo presentaron un incremento de 1% y en el caso de NeuN la cual no presentó ningún incremento ya que se mantuvo el mismo porcentaje de expresión tanto en células no inducidas como en células inducidas. Para Nestina se observó un incremento más significativo en MO (de 3% a 24%) que en PL y VCU (de 3% a 15% y de 10 a 11% respectivamente). En el caso de NF se observó un mayor aumento en su expresión en CTMs de MO (de 4% a 58%) que en aquellas de PL y VCU (de 5% a 27% y de 7% a 25% respectivamente); en MAP2 el incremento fue similar tanto para las células provenientes de MO como para las de PL y VCU (de 3% a 35%, de 6% a 32% y 5% a 29% respectivamente); en NeuN el incremento fue mayor en CTMs de MO (de 4% a 24%) que en aquellas provenientes de PL (de 5% a 10%) y VCU (sin incremento), sin embargo el incremento en GFAP fue significativamente mayor en PL y VCU (de 3% a 15% y de 7% a 25% respectivamente) que en MO (de 2% a 3%; Figura 6). Estos datos nos indican diferencias entre las CTMs de MO, PL y VCU en la capacidad de inducción hacia células neurales. En las células cultivadas en ausencia de medio inductor no se encontraron diferencias significativas entre las tres fuentes.

Los resultados obtenidos muestran que las CTMs provenientes de MO, PL y VCU son capaces de expresar proteínas neurales en ausencia de inductores y de incrementar la expresión de dichas proteínas cuando se exponen a un medio inductor neurogénico adecuado.

VII. DISCUSIÓN

En los últimos 10 años las células mesenquimales han generado gran expectativa tanto en el área biológica como clínica. Esta población no solo es ideal para el estudio de mecanismos moleculares que llevan a cabo la diferenciación celular sino que representan una alternativa potencial para el tratamiento de desordenes metabólicos y condiciones en las cuales se requiere de reparación en algún tejido, área en la cual ya están siendo aplicadas como en infarto al miocardio y osteogénesis imperfecta (Yang et al, 2007; Horwitz et al, 2002).

Debido a que la Médula Ósea (MO) es la fuente principal de Células Troncales Mesenquimales (CTMs), son éstas las que más se han estudiado. Existen evidencias de la presencia de células mesenquimales en Placenta (PL) y Vena de Cordón Umbilical (VCU; in't Anker et al, 2004; Lee et al, 2004; Soncini et al, 2007; Covas et al, 2003; Panepucci et al, 2004), sin embargo, aún no esta claro en que difieren de las células provenientes de MO, especialmente en términos biológicos, debido a que aquellas de MO ya se encuentran en uso clínico. Es por esta razón que en la presente tesis se obtuvieron CTMs de las tres fuentes distintas - MO, PL y VCU - y se realizó un estudio comparativo de morfología, inmunofenotipo y potencial de diferenciación.

Las CTMs derivadas de MO se obtuvieron mediante el método de selección negativa (RosetteSep®;STI), el cual es superior a aquellos en los que solo se utiliza un gradiente de Ficoll o Percoll (Pittenger et al, 1999; Colter et al, 2000; Flores-Figueroa et al, 2008), dado que pudimos obtener capas de CTMs en el 100% de las muestras procesadas. Asimismo, el porcentaje de obtención de CTMs en PL fue del 100% al igual que en MO y aunque la frecuencia de CTMs en PL fue menor que en MO, la podríamos considerar como una fuente adecuada de este tipo células. Por su parte, nuestros datos señalan un bajo porcentaje de obtención de CTMs en VCU (10%), no obstante hay publicaciones en donde indican un porcentaje de obtención del 100% (Secco et al, 2008) aunque su método de obtencion es similar al nuestro probablemente el hecho de que los lavados de la VCU se realizaron con DMEM-BG 10% SFB fue crucial en el proceso ya que en tanto en nuestra metodología como en la de otros grupos estos lavados se realizan ya sea con soluciones salinas o con distintos medios de cultivo no adicionados con SFB, sin embargo otros investigadores al igual que

nosotros reportan porcentajes bajos (Lu et al, 2006) y algunos no reportan esta característica (Romanov et al, 2003) la cual es importante en el análisis de las características biológicas de esta fuente alternativa. Estos resultados en conjunto, apoyan los reportes previos de la presencia de CTMs en tejidos de origen fetal, además de aquellos que indican su localización en vasos sanguíneos (Covas et al, 2003; Covas et al, 2005; in't Anker et al, 2004; Soncini et al, 2007).

En lo que se refiere a la frecuencia, nuestros resultados coinciden con los reportes previos que señalan que se encuentran de 1 a 20 CTMs por cada 10^5 CMN (Castro-Malaspina et al, 1980; Simmons y Torok-Storb, 1991) en MO, y en este estudio se obtuvo 1 CTM/ 0.030×10^5 CMN. Sin embargo, en el caso de PL y VCU no existen reportes en cuanto a la frecuencia de CTMs; en el presente trabajo se encontró que para PL la frecuencia es de 1 CTM/ 8×10^6 CMN y en el caso de VCU no fue posible evaluar esta característica ya que la técnica utilizada desprende la matriz de la vena del cordón umbilical en la cual se encuentran embebidas las células por lo que el conteo celular no es confiable. Para las resiembras posteriores se sembraron 20,000 CTMs/ml o 2,000 CTMs/cm² en los cultivos de las tres fuentes analizadas.

Se ha observado que las CTMs proliferan con mayor rapidez y además de retener su potencialidad cuando se cultivan a bajas densidades (Sekiya et al, 2001). La densidad óptima de siembra es de 1×10^3 a 0.4×10^6 CTMs/cm² (Friedenstein et al, 1970; McBride et al, 2003), por lo que la densidad de siembra utilizada en el presente estudio es ideal (2,000 CTMs/cm²).

En los experimentos realizados en la presente tesis se utilizó un medio de cultivo que constaba de DMEM-LG suplementado con 15% de SFB 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina y se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda al 5%, las cuales son condiciones usadas comúnmente para CTMs provenientes de MO y PL y que han arrojado resultados favorables en cuestiones de expansión de CTMs de estas dos fuentes; en el caso de VCU, algunos autores señalan el uso de distintos factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF; Covas et al, 2003) esto para que las células obtenidas de la vena de cordón umbilical sean capaces de adherirse y expandirse, otras no refieren el uso de factores de crecimiento adicionales a los ya presentes en el medio de cultivo y

sin embargo reportan un 100% en el porcentaje de obtención (Secco et al, 2008), en el caso de las CTMs obtenidas de VCU en este estudio el porcentaje de obtención fue bajo (10%) como se había mencionado anteriormente y aunque fuimos capaces de expandir las CTMs provenientes de esta fuente, probablemente se deben hacer algunas variaciones en el método de obtención (como el uso de un medio enriquecido para realizar los lavados de la VCU después del tratamiento enzimático) o la adición de factores de crecimiento en el medio de cultivo.

No obstante las evidencias mostradas, hoy en día tanto PL como VCU aún son consideradas fuentes controversiales de CTMs debido a que no se conoce con exactitud su biología y de que manera difieren de aquellas provenientes de MO, aunque en el caso de la PL hay estudios que indican que las CTMs son la principal fuente de células maduras (tanto hematopoyéticas como de otros tipos) durante el desarrollo placentario (Gude et al, 2004; Demir et al, 2006), por lo que seguramente persisten a lo largo de la gestación. Además, durante el desarrollo de la PL hay varias transiciones de células epiteliales a mesenquimales y viceversa, las cuales son esenciales para la migración celular durante el desarrollo placentario (Vicovac y Aplin, 1996), lo que apoya las teorías de transdiferenciación y rediferenciación de las CTMs y que confirma que este tipo celular es capaz de retener su troncalidad una vez que está diferenciada y/o comprometida hacia determinado linaje, además de que responden al estímulo y necesidades del microambiente en el que se encuentran (Song y Tuan, 2004; Baskh et al, 2004).

La presencia de CTMs en VCU puede deberse a que son parte importante del proceso de formación del cordón umbilical y probablemente están presentes a lo largo del desarrollo embrionario (Jirasek, 2004). Sin embargo, existe la polémica que han causado los llamados “pericitos” localizados en los vasos sanguíneos y a partir de los cuales se ha propuesto la teoría de que todas las CTMs son pericitos, pero no todos los pericitos son CTMs, lo cual apoyaría la hipótesis que supone que las CTMs están adheridas a las paredes de los vasos sanguíneos y que migran hacia los distintos tejidos respondiendo a estímulos específicos (da Silva Meirelles et al, 2008). Para confirmar lo anterior, se han realizado estudios donde se purifican pericitos con el inmunofenotipo $CD146^+CD34^+CD45^-CD56^-$, se expanden e inducen hacia los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico in vitro (Caplan, 2007).

De igual forma, otros estudios indican un claro nexo entre las CTMs y los pericitos ya que ambos tipos de células presentan características similares de inmunofenotipo y potencial de diferenciación (Caplan, 2007; Crisan et al, 2008). En uno de estos estudios se realizó una búsqueda de células que presentan características tanto de pericitos como de CTMs en distintos tejidos adultos y fetales; se obtuvieron células con el inmunofenotipo CD146⁺NG2⁺PDGFRβ⁺ALP⁺CD34⁻CD45⁻vWF⁻CD144⁻, el cual es característico de pericitos, y estas fueron capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos, condrocitos y cardiomiocitos además de ser positivas para los marcadores característicos de CTMs CD73, CD90 y CD105. Además para descartar que los marcadores estudiados hayan sido adquiridos en cultivo, se realizó un análisis de estos mismos antígenos en células recién obtenidas y se observó que dichas células también expresaban estos antígenos; los resultados anteriores apoyan la hipótesis de que todas las células mesenquimales son pericitos (Crisan et al, 2008).

Como se ha mencionado antes se cree que no todos los pericitos son CTMs, lo cual supone que los primeros tienen un origen mesenquimal y por lo tanto, aquellos pericitos con inmunofenotipo característico de CTMs y capaces de diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos son los más inmaduros y aquellos que no muestran estas características son los más maduros (Nehls y Drenckhahn, 1993). En este mismo contexto se debe mencionar que las CTMs son capaces de diferenciarse hacia células endoteliales y secretan factores angiogénicos como VEGF y Angiopoyetina-1 (Phinney, 2007), lo cual junto con el soporte de vasos y capilares sanguíneos son las principales funciones de las células periciticas.

La morfología presente en los cultivos de CTM de MO, PL y VCU fue analizada en detalle y se observó la presencia de tres tipos celulares distintos, los cuales fueron nombrados dependiendo de sus características morfológicas principales: grande o larga, fibroblastoide y neurítica. Trabajos previos reportan la existencia de los tipos celulares grande y fibroblastoide (Marcov et al, 2007), lo cual indica una heterogeneidad en la morfología, sin embargo, no se había reportado la presencia de células con morfología neural en cultivos de CTMs provenientes de PL y VCU. Investigaciones realizadas en este laboratorio ya habían señalado la presencia de al menos dos subpoblaciones en los cultivos de CTM provenientes de MO: una que consiste de células muy delgadas y en forma de huso y otras granulares y más grandes (Flores-

Figuroa et al, 2005). Otros autores ya habían hecho las mismas observaciones (Prockop et al, 2001; Colter et al, 2001). Además también se distinguieron cinco subtipos morfológicos entre las células fibroblastoides: romboide, lamelopodia-lamelopodia, lamelopodia-filopodia, filopodia-filopodia y triangular, sin embargo aún no se sabe si estos tipos morfológicos tienen alguna relación con la funcionalidad celular.

Respecto al inmunofenotipo de las CTMs de las diferentes fuentes, no detectamos la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD34, CD45, CD62L, CD14) y del marcador endotelial CD31. Sin embargo, se detectaron algunas diferencias en el perfil de expresión de antígenos entre las CTMs de MO y aquellas de PL y VCU. Los marcadores característicos de CTMs CD73, CD90 y CD105 no presentaron diferencias significativas, aunque en el caso de CD90 las CTM provenientes de PL y VCU presentaron una variación de 35% a 78% y de 38% a 96% respectivamente, por lo que probablemente este marcador no debería ser considerado como característico de CTMs de estas dos fuentes. En lo que se refiere a CD105 las células de VCU presentaron una variación aun mayor que va desde 24% a 94% por lo que al menos en VCU este marcador tampoco debería ser considerado característico. De manera interesante en las células provenientes de las tres fuentes, se observó una expresión alta y homogénea del marcador CD13. Al respecto, un estudio realizado en nuestro laboratorio también indicó que las CTMs de Sangre de Cordón Umbilical (SCU) presentan una expresión alta y uniforme de este marcador, por lo que sugerimos que CD13 se puede considerar como un antígeno característico de CTMs, ya que hemos detectado su expresión alta y homogénea en las cuatro fuentes que analizamos en este laboratorio (MO, PL, VCU y SCU). Además una de las funciones biológicas de CD13 es controlar el crecimiento y diferenciación celular, por lo que probablemente tiene un papel clave durante el proceso de maduración de las células mesenquimales hacia los diferentes linajes dado el alto potencial que estas poseen.

Otro antígeno que presentó una expresión alta (aunque no homogénea) fue CD44, el cual es el receptor del ácido hialurónico que se asocia con la migración y proliferación de células mesenquimales no diferenciadas, además es regulador de tejidos conectivos como tendones y cartílagos los cuales tienen un origen mesenquimal, no se observaron diferencias significativas en la expresión de este antígeno entre las diferentes fuentes aunque las CTMs de PL presentaron variación alta ($86\pm 29\%$). Otro

antígeno con una expresión alta fue CD166, involucrado en la extensión de neuritas y que además actúa como molécula de adhesión en el sistema nervioso, puede estar relacionado con el potencial neural de las CTMs. Por su parte CD58 que se expresa en células endoteliales, epiteliales y fibroblastos (tipos celulares hacia los cuales son capaces de diferenciarse las CTMs), presentó una expresión variable en MO y PL, lo cual sugiere capacidades distintas en el potencial de diferenciación entre las CTMs de estas fuentes para diferenciarse hacia los tipos celulares mencionados.

Se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD49b y CD54, ya que se detectó una expresión más alta en PL y VCU que en MO en ambos casos. Ambas moléculas están involucradas en la angiogénesis por lo que podemos decir que tanto PL como VCU, probablemente tienen mayor capacidad de diferenciación endotelial y esto coincide con la ubicación de ambas, ya que las CTMs de PL participan en la angiogénesis y vasculogénesis a lo largo del desarrollo placentario (Demir et al, 2006) y en el caso de VCU se confirman las teorías que señalan que todas las CTMs son pericitos pero no viceversa y que su nicho principal son las paredes de los vasos sanguíneos (da Silva Meirelles et al, 2008), ya que CD54 también es un marcador característico de pericitos. Por otro lado la expresión de CD54 es constitutiva en células epiteliales, lo que coincide con las transiciones celulares de epitelio a células mesenquimales y viceversa durante el desarrollo placentario (Vicovac y Aplin, 1996). Además se ha descrito que este antígeno es capaz de inhibir la respuesta inmune (Buckley y Simmons, 1997), por lo que se podría pensar que CTMs de PL y VCU pudieran tener una mayor capacidad inmunosupresora que aquellas provenientes de MO.

Con respecto a PDGFR- β , el cual es un marcador involucrado en el proceso de vasculogénesis, no se encontraron diferencias significativas entre las CTMs provenientes de MO y PL, sin embargo, las muestras de PL presentaron grandes variaciones y en el caso de VCU se observó una expresión baja, lo que indica que aunque las CTMs provenientes de VCU tienen una alta capacidad angiogénica, no son capaces de inducir la formación de vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, esto debido probablemente a que la VCU es solo provisional y una vez formadas tanto la vena como las arterias umbilicales, no se requiere de la formación de nuevos capilares

o vasos sanguíneos a partir de estos durante la gestación, a diferencia de aquellas de MO y PL, las cuales quizá deban formar nuevos vasos sanguíneos durante la gestación, sobre todo en el caso particular de PL o bien sean requeridas para la reparación de vasos o capilares sanguíneos durante la vida adulta en el caso de MO, razón por la cual las CTMs de estas fuentes presentan una mayor expresión de este marcador, que aquellas provenientes VCU.

En el caso de CD10 no se observaron diferencias significativas entre CTMs de MO y VCU, pero si de ambas con aquellas de PL, dichas diferencias pudieran ser explicadas debido a la localización de las CTMs en las tres fuentes, dado que CD10 es un marcador de células endoteliales vasculares relacionadas con la vena umbilical y el nicho vascular en MO a diferencia PL cuyas células probablemente se encuentran alrededor de todo el tejido y no solo en sitios vasculares.

c-kit es un antígeno característico de CTH (Ashman et al, 1991) y células embrionarias (Galli et al, 1994); regula la proliferación, diferenciación y adhesión celular además de la apoptosis (Adachi et al, 1992, Ashman, 1999; Tsuura et al, 1994). Respecto a este antígeno se observó una expresión más alta en CTMs de PL (hasta 32%) que en aquellas de MO (hasta 19%) y las provenientes de VCU (hasta 4%) mismas que presentaron la menor expresión de este marcador. Lo anterior nos sugiere que las CTMs de PL podrían ser más primitivas que las células de MO y VCU. Por su parte CD133 se encontró en una expresión baja en CTMs provenientes de las tres fuentes, lo que coincide con el hallazgo de células con morfología neural (de 1 a 6%), ya que este es un marcador usado para obtener células troncales neurales (Uchida et al, 2000; Tamaki et al, 2002), lo que probablemente indica la presencia de una subpoblación celular comprometida hacia este linaje positiva para este marcador.

Aunque existen reportes que señalan que STRO-1 es un marcador de CTMs (Simmons y Torok-Storb, 1991) este no es considerado como antígeno general de dichas células debido a que no se conoce su contraparte murina; la expresión de STRO-1 no es exclusiva de CTMs, ya que también se expresa en eritrocitos, su expresión en CTMs se pierde durante la expansión en cultivo (Gronthos et al, 2003) y

se ha observado que su capacidad de migración esta relacionada a la expresion de este marcador: las CTMs negativas son capaces de injertar en la MO y mantienen la hematopoyesis y aquellas positivas para STRO-1 migran e injertan en tejidos distintos a la MO tales como músculo y pulmón (Bensidhoum et al, 2004); es debido a lo anterior que en la presente tesis no se analizó la presencia de este antígeno.

A pesar de los estudios que demuestran un nexo entre los pericitos y las CTMs (Caplan, 2007; Crisan et al, 2008; da Silva Meirelles et al, 2008), aún existe controversia entre estos dos tipos de células y el origen de ambas así como si forman parte del mismo linaje o tienen la misma capacidad de diferenciación, uno de los principales marcadores para células periciticas es CD146 y no obstante aquellas células positivas para este marcador han mostrado tener características de tipo mesenquimal (morfología fibroblastoide; positividad para CD70, CD93 y CD105 así como capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica) aún existe controversia sobre si este marcador debe ser usado en la caracterización de CTMs debido a que se ha observado que se pierde durante la expansión en cultivo (Delorme et al, 2008) y además se expresa solo en subpoblaciones de CTMs (Purton et al, 1996) por lo que no se determinó este antígeno en el presente trabajo.

El análisis inmunofenotípico realizado en este estudio puede ser un comienzo para la descripción mas detallada de las CTMs y su biología, además de proporcionar una noción mas clara del tipo de terapia en el que pueden ser usadas las células de cada una de las diferentes fuentes, ya que estas han recibido cierta influencia del microambiente del tejido del cual fueron obtenidas.

Con respecto a la caracterización funcional, se determinó la capacidad de diferenciación de CTMs de las tres fuentes en adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de diferenciación hacia los tres linajes de las CTMs de las fuentes estudiadas. En el caso concreto de la adipogéneis se observó que de las cinco muestras de PL que fueron cultivadas con medio adipogénico solo se formaron adipocitos en dos de las muestras analizadas y aunque en el resto de las muestras no se observó la presencia de adipocitos si fuimos capaces

de observar vacuolas lipídicas en las mismas, las cuales se evidenciaron con la tinción positiva para Rojo Oleoso y que coincide con lo que otros autores han encontrado (Igura et al, 2004; Battula et al, 2007). En particular las CTMs de las tres fuentes fueron homogéneas con respecto a la formación de cartílago, ya que todas formaron en su mayoría cartílago hialino (indicado por la presencia de un mayor número de células que de fibras de colágeno en la tinción con Tricrómico de Masón), lo que nos puede dar una idea del tipo de terapia para la que pueden ser utilizadas las CTMs provenientes de MO, PL y VCU, ya que, la función principal del cartílago hialino es de soporte a los tejidos óseos. Aún no se sabe a ciencia cierta si esta capacidad de trilineaje es intrínseca de todas las poblaciones mesenquimales o si existen ciertas subpoblaciones comprometidas hacia uno o dos linajes, además se ha propuesto que las células mesenquimales provenientes de cualquier fuente tienen una marcada tendencia hacia el linaje osteogénico, aún cuando no reciben ningún estímulo de esta clase (Pittenger et al, 1999), lo cual también pudimos observar en este estudio, ya que los cultivos de CTMs de las tres fuentes que no fueron expuestos al medio osteogénico fueron capaces de depositar calcio.

En los cultivos de CTMs provenientes de las tres fuentes, se observó una subpoblación de células con morfología neurítica. La presencia de estas células sugiere que probablemente esta subpoblación puede tener características neurales aún sin haberse expuesto a ningún tipo de inducción. Para apoyar esta noción se analizó la presencia de marcadores neuronales (nestina, neurofilamentos, MAP2 y NeuN) y de astrocitos (PAGF) en las CTMs de todas las fuentes y se demostró la expresión de dichos marcadores tanto en células en ausencia de estímulo neural, como en aquellas cultivadas en presencia de inductores. Estudios previos en CTMs provenientes de MO ya habían demostrado la presencia de genes neurales y la expresión de proteínas aún en ausencia de algún inductor neural (Tondreau et al, 2004; Minguel et al, 2005; Blondheim et al, 2006), sin embargo en el presente estudio demostramos además su expresión en CTMs provenientes de PL y VCU.

La MO está inervada por tejido nervioso y terminales nerviosas eferentes que se anclan al basamento de la membrana adyacente a las células adventicias peri-arteriales (las cuales pueden ser CTMs) y terminan directamente en las células adventicias

reticulares. Estas células estromales se comunican mediante uniones gap formando un circuito llamado “complejo neuro-reticular” mediante el cual las células pueden interpretar las señales del sistema nervioso que regula la hematopoyesis (Weiss, 1976; Yamazaki y Allen, 1990). La homeostasis del tejido óseo también es controlada por hormonas y neuropéptidos (Lemer, 2002) y es regulada de manera circadiana por el sistema nervioso simpático (Fu et al, 2005). Por lo tanto, la asociación íntima del hueso y la MO con el sistema nervioso provee una razón para la expresión de varias clases de proteínas neuro-reguladoras (Phinney, 2007). Además estas proteínas mantienen la integridad del sistema nervioso *in vivo* y el crecimiento de las fibras nerviosas en el hueso y la MO durante el crecimiento y la remodelación del tejido, asimismo las neurotrofinas afectan el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas (Matsuda et al, 1988; Simone et al, 1999; Schuhmann et al, 2005). También se ha comprobado que el GM-CSF es capaz de inducir y potenciar la diferenciación neural (Lin et al, 2007). Estudios en ratones demuestran que la microglía es continuamente repoblada por células estromales de la MO (Davoust et al, 2008). Asimismo existen reportes que indican que las células estromales expresan constitutivamente NGF y Factor de Crecimiento Derivado de Cerebro (BDNF; Yaghoobi y Mahani, 2008). Además se ha observado que la administración intravenosa de células estromales de MO en ratones después de un trauma cerebral incrementa la expresión de NGF y BDNF, lo cual probablemente contribuye a la mejoría en las funciones neurológicas de estos animales. También se ha postulado que las células tipo mesenquimal provienen de aquellas células neuroepiteliales positivas para Sox originarias de la cresta neural en un estado de desarrollo intermedio y no del mesodermo como se había planteado (Takashima et al, 2007). Estas células son reemplazadas por CTMs en etapas posteriores del desarrollo. Nagoshi y cols. demostraron que las células derivadas de la cresta neural migran a través del torrente sanguíneo a la MO (Nagoshi et al, 2008). Todo lo anterior indica claramente que las CTMs presentes en la MO están expuestas continuamente a estímulos neurales, por lo que probablemente pueden estar de alguna forma más predispuestas hacia el linaje neural que aquellas provenientes de PL y VCU, aunque antes de la inducción no hayamos podido detectar un alto porcentaje en la expresión de proteínas neurales, después de la exposición al medio neurogénico se observó un aumento más significativo en esta expresión en las CTMs de MO (excepto en PAGF, la cual solo aumentó en un 1%) que en las provenientes de PL y VCU.

Por los resultados obtenidos en estudios anteriores y en el presente, se ha postulado la posible existencia de distintas subpoblaciones en los cultivos de CTMs, las cuales pudieran estar comprometidas a un linaje en particular o bien tener características de multipotencialidad, que con el estímulo adecuado pueden ser diferenciadas hacia varios linajes dependiendo de los factores de inducción presentes en el medio.

Lo anterior evidencia que las poblaciones de CTMs son heterogéneas con respecto a su capacidad de autorenovación y potencial de diferenciación ya que se ha propuesto que (al menos en MO), la población de CTMs no solo contiene Células Troncales Mesenquimales “putativas” sino también contiene varias subpoblaciones en distinto estado de diferenciación. Según este modelo las CTMs constituyen una población primitiva de células troncales; estas células multipotenciales tienen una capacidad limitada de autorenovación y dan origen a tipos celulares específicos con un fenotipo completamente diferenciado. Así, las CTMs multipotentes son eventualmente depletadas de la población mesenquimal durante un cultivo a largo plazo debido a su baja frecuencia en relación a los fenotipos más diferenciados, los cuales tienen una mayor presencia (Baksh et al, 2004). Con la finalidad de dilucidar este fenómeno, se deben llevar a cabo estudios que involucren tanto análisis inmunofenotípicos, como de ADN y de diferenciación en poblaciones mesenquimales que hayan sido previamente sometidas a selección positiva para marcadores específicos de los distintos linajes.

A pesar de que varios autores han reportado la presencia de CTMs en PL y VCU aun existe controversia, debido a que se han utilizado distintos métodos de obtención y de cultivo, además la mayoría de los estudios en los cuales se han obtenido CTMs de VCU no indican el porcentaje de obtención, por lo que es urgente estandarizar los métodos de obtención y cultivo de estas células en ambas fuentes ya que probablemente no es posible hacer comparaciones en estas condiciones.

En el caso de la PL se ha reportado que el comportamiento en cultivo de las células provenientes de este tejido depende del método de obtención, ya que solo es posible aislar CTMs de PL usando disgregación tanto enzimática como mecánica así como disgregación enzimática en dos fases con el uso de dos enzimas diferentes (Rus et al, 2011). Sin embargo, en los estudios realizados anteriormente y la presente tesis

se ha observado que la disgregación enzimática (con una sola enzima) y la disgregación mecánica son suficientes para obtener CTMs del tejido placentario.

En el presente trabajo se ha confirmado la presencia de CTMs en PL y VCU como fuentes alternativas a la MO. Es interesante que aunque ambos tejidos son de origen fetal, el porcentaje de obtención de CTMs en VCU sea significativamente más baja que en PL, lo que sugiere que la PL es una fuente más adecuada que VCU para obtener este tipo de células. Aún faltan estudios, principalmente en biología básica, para concluir que las CTMs de PL y VCU son una alternativa a las de MO, sin embargo debido a que estos tejidos son accesibles y su obtención no representa ningún tipo de riesgo para el donador son ideales como fuentes de CTMs en lugar de la MO.

VIII. CONCLUSIONES

Se obtuvieron Células Troncales Mesenquimales (CTMs) de Placenta (PL) y Vena de Cordón Umbilical (VCU) como fuentes alternativas a la Médula Ósea (MO), lo que contribuye a la caracterización biológica de estas células en forma comparativa a partir de las tres fuentes.

Las CTMs de PL presentaron el mismo porcentaje de obtención que la MO aunque se encontraron en menor frecuencia. En lo que respecta a las CTMs de VCU estas presentaron un porcentaje de obtención menor que la MO y la PL y no fue posible determinar la frecuencia, ya que el método no permite realizar un conteo celular confiable.

Se observó la presencia de subpoblaciones celulares morfológicamente distintas dentro de la población total de CTMs provenientes de MO, PL y VCU.

La expresión de CD90 y CD105 no fue homogénea en CTMs de VCU, a diferencia del antígeno CD13 el cual presentó una expresión alta y homogénea en las tres fuentes, por lo que se puede proponer a este marcador como característico de CTMs de las tres fuentes estudiadas.

Las CTMs de PL y VCU presentaron una capacidad de diferenciación similar a la de la MO, así como también fueron capaces de formar el mismo tipo de cartílago durante la diferenciación condrogénica.

Las CTMs provenientes de MO, PL y VCU expresaron proteínas neurales tanto en presencia como en ausencia de un medio inductor neural, lo que sugiere la existencia de una subpoblación comprometida hacia el linaje neural aún antes de ser inducidas hacia este linaje.

Por todo lo anterior se puede considerar que PL es una fuente alternativa de CTMs más adecuada que VCU.

IX. PERSPECTIVAS

En el presente estudio se obtuvieron Células Troncales Mesenquimales (CTMs) de Médula Ósea (MO), Placenta (PL) y Vena de Cordón Umbilical (VCU), aunque el porcentaje de obtención en VCU fue menor que en las otras dos fuentes, probablemente se deba usar una segunda disgregación enzimática o una enzima con mayor capacidad catalítica que la que usamos, ello con el fin de romper el mayor número de uniones celulares y la cantidad de matriz extracelular, para incrementar el número de células obtenidas. Además sería interesante analizar las CTMs obtenidas tanto de VCU como de MO y PL con marcadores específicos de pericitos para confirmar las hipótesis que señalan que todas las CTMs son pericitos.

También se encontraron subpoblaciones celulares morfológicamente distintas tanto en los cultivos de CTMs de MO como de PL y VCU, por lo que se podrían clonar células de los distintos tipos morfológicos a partir de las tres fuentes estudiadas para analizar sus características biológicas por separado y saber si hay alguna relación entre la morfología y el potencial biológico de las CTMs. Con respecto a las células pequeñas hay algunos estudios en los que se ha observado que CTMs de tamaño pequeño presentan un alto potencial de proliferación (Colter et al, 2000; Colter et al 2001; Smith et al, 2004; Lee et al, 2006; Marcov et al, 2007). Tomando en cuenta estas referencias y de acuerdo a nuestros resultados, sería interesante realizar cinéticas de proliferación de las células pequeñas y de las células con morfología fibroblastoide y grande, y analizarlas de manera comparativa entre ellas.

En el análisis de expresión de marcadores de superficie celular de las CTMs, se encontraron diferencias significativas en la expresión de rPDGF (marcador involucrado con la proliferación celular) y de CD54 (marcador altamente expresado en células endoteliales). Sin embargo, no se sabe la relevancia biológica de las diferencias significativas observadas en la expresión de estos dos marcadores, por lo que, para analizar estas diferencias, podríamos cultivar CTMs de las tres fuentes en presencia de PDGF y analizar de manera comparativa su potencial de proliferación. Respecto a la expresión diferencial de CD54, se podría analizar, también de manera comparativa, la capacidad de diferenciación hacia células endoteliales entre CTMs de MO, PL y VCU.

En este estudio se encontró la presencia de una subpoblación celular con la capacidad de expresar proteínas neurales en ausencia de medio inductor neural dentro de la población de CTMs provenientes de MO, PL y VCU, así como un incremento significativo en el porcentaje de células que expresan estas proteínas neurales después de ser estimuladas con medio de diferenciación, sin embargo, para analizar la capacidad funcional de las CTMs con potencial neural antes y después de estimularlas con medio inductor, sería interesante purificar dichas subpoblaciones con base en su morfología neural o mediante la expresión de antígenos relacionados con células neurales como el CD133 (Padovan et al, 2003), y posteriormente injertarlas en un modelo *in vivo*, como se plantea en el modelo de lesión medular en rata, en donde se emplean CTMs de MO para revertir el daño medular (Kim et al, 2006; Deng et al, 2006), comprobando de esta forma su capacidad de diferenciación hacia algún tipo de célula neural *in vivo*, esto de manera comparativa entre las CTMs de MO, PL y VCU; además también existen estudios que señalan que las CTMs provenientes de MO sin previa inducción son capaces de regenerar algunas funciones de pacientes con Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, de hecho hay un estudio con ratones a los cuales se les daña la función cerebral para que fueran hemi-parkinsonianos, a los que posteriormente se les inyectaron CTMs de VCU que presentaron una mejoría significativa en los movimientos involuntarios que causa esta enfermedad (Weiss et al, 2006).

X. BIBLIOGRAFIA

Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Hasan NM. Therapeutic potential of bone marrow derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007; 40: 893-9.

Adachi S, Ebi Y, Nishikawa S, Hayashi S, Yamazaki M, Kasugai T, Yamamura T, Nomura S, Kitamura Y. Necessity of extracellular domain of W (c-kit) receptors for attachment of murine cultured mast cells to fibroblasts. *Blood* 1992; 79: 650

Adachi N, Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han CW, Niyibizi C, Huard J. Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J Rheumatol* 2002; 29: 1920-1930.

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

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-1822.

Ambrose JA. Myocardial ischemia and infarction. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: D13-17.

Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330: 827-838.

Ashman LK, Cambareri AC, To LB, Levinsky RJ, Juttner CA. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 1991; 78: 30.

Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor ckit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1037-51.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1482-1490.

Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007; 56: 405-15.

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow cell implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3908

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

Bang O, Y Lee, JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005; 57: 874-882.

Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal

stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001a; 268:189-200.

Barry F, Boyton 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* 2001b; 289: 519-524.

Barry FP, Murphy JM, English K, Mahon BP, Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft, *Stem Cells Dev*, 2005, 14(3): 252-265.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30: 42-48.

Battula VL, Bareiss PM, Treml S et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 2007; 75: 279-91.

Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D, Lopez M. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 2004; 103(9): 3313-9.

Berardi A, Wang A, Levine J, Lopez P, Scadden D. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 1995; 267: 104-108

Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 249-282.

Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105: 2214-2219.

Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* 2003; 287: 98-105.

Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105: 1663-1668.

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

Blair A, Thomas DB. Preferential adhesion of fetal liver derived primitive haemopoietic progenitor cells to bone marrow stroma. *Br J Haematol* 1997; 99: 726-731

Blazsek I, Delmas MB, Legras S, Marion S, Machover D, Misset JL. Large-scale recovery and characterization of stromal cell-associated primitive haematopoietic progenitor cells from filter-retained human bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 647-657

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

Bloom, Fawcett. A textbook of histology. 12th Ed. Chapman and Hall USA. 1994.

Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS, Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004; 93: 1210-1230.

Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD, Huard J. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 2000; 18: 933-944.

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; 64: 278-294.

Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80: 985-996.

Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998; 16: 155-162.

Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 655-663.

Buckley CD, Simmons DL. Cell adhesion: a new target for therapy. *Mol Med Today*. 1997; 3(10): 449-56.

Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono LL, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cell in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 2001; 98: 2396-2402.

Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1076-1084.

Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007; 213: 341-347.

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56: 289-301.

Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, Rameshwar P.

Antigen presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferongamma. *Blood* 2006; 107: 4817-4824.

Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94: 92-95.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3213-3218.

Colter 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 USA* 2001; 98: 7841-7845.

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

Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(9): 1179-1183.

Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Exp Cell Res* 2005; 309: 340-344.

Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 2008; 36(5): 642-54.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhrin HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 301-13.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(9): 2287-99.

Davoust N, Vauillat C, Androdias G, Nataf S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol.* 2008; 29(5): 227-34.

De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 2001a; 44: 85-95.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP: Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001b; 44: 1928-1942.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-884.

Delorme B, Ringe J, Gallay N et al. Specific plasma membrane protein phenotype of

culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 2008; 111: 2631-2635.

Demir R, Kayisli UA, Cayli S, Huppertz B. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta* 2006; 27(6-7): 535-9.

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

Deschaseaux F, Charbord P. Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol* 2000; 184: 319-325.

Deryugina E, Müller-Sieburg A. Stromal cells in long-term cultures: keys to the elucidation of hematopoietic development? *Crit Rev Immunol* 1993; 13: 115-150.

Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into non-human primates. *Blood* 2003; 101: 2999-3001.

Dezawa M, Hoshino M, Ide C. Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 427-35.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture. A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107: 275-281.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.

Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Ann Rev Immunol* 1990; 8: 111-137.

Eisenberg LM, Eisenberg CA. Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. *Birth Def Res Part C Emb Today* 2003; 69: 209-218.

Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 2005; 106: 4057-4065.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 2000; 109(1): 235-242.

Ferrari G, Cusella-De Anelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.

Filshie RJ, Zannettino AC, Makrynika V, Gronthos S, Henniker AJ, Bendall LJ, Gottlieb DJ, Simmons PJ, Bradstock KF. MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of haematological malignancies. *Leukemia* 1998; 12: 414-421.

Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutierrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res* 2005; 29: 215-224.

Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Gutiérrez-Espíndola G, Arana-Trejo RM, Castillo-Medina S, Pérez-Cabrera A, Hernández-Estévez E, Arriaga L, Mayani H. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Res* 2008; 32(9): 1407-16.

Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A, Gorin NC. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 2003; 17: 474-476.

Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Sache A, Bouchet S, Thierry D, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006; 24: 1020-1029.

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; 3: 393-403

Friedenstein AJ. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17: 331-340.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-274.

Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* 2005; 122:803-15.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. *Stem Cells* 2004; 22: 649-658.

Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993; 82: 66-76.

Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Ferrara GB,

Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R, Quarto R. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 1999; 27: 1460-1466

Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 1994; 55:1
Gieselmann V. Metachromatic leukodystrophy: Recent research developments. *J Child Neurol* 2003; 18: 591-594.

Giordano A, Galders U, Marino RI. From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An Update on Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Physiol* 2007; 211: 27-35.

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105: 2821-2827.

Gomez C. *Embriología Humana. Atlas y Texto*. El Ateneo, Argentina, 2003.

Gordon MY. Extracellular matrix of the marrow microenvironment. *British J Haematol* 1988; 70: 1-4.

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

Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 2005; 33: 928-934.

Gronthos S, Simmons PJ. The growth factors requirements of STRO-1+ human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions. *Blood* 1995; 85: 929-940.

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; 189: 54-63.

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

Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King R. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research* 2004; 114: 397-407.

Guo J, Lin GS, Bao CY, Hu ZM, Hu MY. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation* 2007; 30: 97-104.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass, *Nature* 2003; 423: 349-355.

Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrafi MD, Band L, Metcalf D. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose. *J Biol Chem* 1986; 261: 12665-12674.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived

mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996; 166: 585-592.

Hellmann MA, Panet H, Barhum Y, Melamed E, Offen D. Increased survival and migration of engrafted mesenchymal bone marrow stem cells in 6-hydroxydopaminelesioned rodents. *Neurosci Lett* 2006; 395: 124-8.

Heymann D, Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 2000; 12: 1455-1468.

Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 2006; 24: 1030-1041.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5: 309-313.

Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001; 97: 1227-1231.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8932-8937.

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

Huang W, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17A: A T-cell derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 1512-1518.

Hubin F, Humblet Ch, Belaid Z, Lambert CH, Boniver J, Thiry A, Defrense M-P. Murine bone marrow stromal cells sustain in vivo the survival of hematopoietic stem cells and the granulopoietic differentiation of more mature progenitors. *StemCells* 2005; 23: 1626-1633.

Ignotz RA, Massague J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261: 4337-4345.

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

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

2003; 88: 845-852.

in 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Groot-Swings GM, Claas FH, Willem E, Fibbe WE, Kanhaia HH. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells* 2004; 22: 1338-1345.

Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006; 99: 1285-1597.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.

Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105: 4120-4126.

Jirasek JE. The encyclopedia of visual medicine series. An atlas of human prenatal developmental mechanics: Anatomy and Stanging. Taylor and Francis, London and New York 2004.

Jori FP, Napolitano MA, Melone MA, Cipollaro M, CascinoA, Altucci L, Peluso G, Giordano A, Galderisi U. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J Cell Biochem* 2005; 94: 645-655.

Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95: 209-14.

Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, Vوريدis EM, Papamichail M. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005; 65: 321-329.

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

Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, Yang YS, et al. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* 2005; 31: 119-126.

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

Kleber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 681-687.

Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and

culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 307-316.

Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 215-222.

Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: Heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 235-239.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 204.

Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E. and Dazzi, F., Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-3729.

Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarasci V. et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 386-398.

Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J. Bone Miner Res* 1997; 12: 1335-1347.

Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 389-398.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003; 57: 11-20

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363: 1439-1441.

Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: Progress toward promise. *Cytotherapy* 2005; 7: 36-45.

Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-84.

Lee KD. Applications of mesenchymal stem cells: an updated review. *Chang Gung Med J* 2008; 31(3): 228-36.

Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent

mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669-1675.

Lee RH, Hsu SC, Munoz J, Jung JS, Lee NR, Pochampally R, Prockop DJ. A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice. *Blood* 2006; 107: 2153-2161.

Lee ST, Jang JH, Cheong JW, Kim JS, Maemg HY, Hahn JS, KoYW, Min YH. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol* 2002; 118: 1128-1131.

Lemer UH. Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002; 2: 440-7.

Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6: 1282–1286.

Lin X, Zhang Y, Dong J, Zhu X, Ye M, Shi J, Lu J, Di Q, Shi J, Liu W. GM-CSF enhances neural differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport* 2007; 16: 18(11): 1113-7.

Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006; 91: 1017-1026

Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005; 90: 516-525.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66.

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

Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 2000b; 9: 841-848.

Marcov V, Kusumi K, Tadesse M, William D, Hall D, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen R, Rappaport E, Saitta B. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials and gene expression profiles. *Stem Cells and Develop* 2007; 16: 53-73.

Matikainen T, Laine J, Placenta – an alternative source of stem cells, *Toxicol Appl*

Pharmacol, 2005, 207(2 Suppl): 544-549.

Matsuda H, Coughlin MD, Bienestock J, Denburg JA. Nerve growth factor promotes human hematopoietic colony growth and differentiation. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:6508-12.

Mayani H, Guilbert L, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. Eur J Hematol 1992; 49: 225-233.

McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. Dev Cell 2004; 6: 483-495.

McBride C, Gaupp D, Phinney DG. Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real-time PCR. Cytotherapy 2003; 5: 7-18.

McCulloch EA. Stem cell renewal and determination during clonal expansion in normal and leukemic hemopoiesis. Cell Prolif 1993; 26: 399-425.

Mendoza JF, Cáceres JR, Santiago E, Mora LM, Sánchez L, Corona TM, Machuca C, Zambrano IR, Martínez RD, Weiss Steider B. Evidence that G-CSF is a fibroblast growth factor that induces granulocytes to increase phagocytosis and to present a mature morphology, and that macrophages secrete 45-kd molecules with these activities as well as with G-CSF-like activity. Exp Hematol. 1990; 18(8): 903-10.

Metcalf D. Hemopoietic colonies. In vitro cloning of normal and leukemic cells. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag 1977; 227.

Metcalf D. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. Stem Cells 2003; 21: 5-14.

Minguell JJ, Fierro FA, Epanan MJ, Erices AA, Sierralta WD. Nonstimulated human uncommitted mesenchymal stem cells express cell markers of mesenchymal and neural lineages. Stem Cells Dev 2005; 14: 408-414.

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

More K, Persaud T. Embriología Clínica, 6a. Edición. McGraw-Hill Interamericana, México 1999.

Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. J Cell Sci 2000; 113: 1161-1166.

Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, *et al.* Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. Cell Stem Cell 2008; 2(4): 392-403.

Nauta AJ, Westershuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a non-myeloablative setting. Blood 2006; 108(6): 2114-20.

Nauta A, Fibbe W, Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110: 3499-3506.

Nehls V, Drenckhahn D. The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle. *Histochemistry* 1993; 99: 1-12.

Nicola NA. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 45-77.

Niyibizi C, Wang S, Mi Z, Robbins PD, The fate of mesenchymal stem cells transplanted into immuno- competent neonatal mice: implications for skeletal gene therapy via stem cells, *Mol Ther*, 2004, 9(6): 955-963.

Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002; 20: 1060-9.

Ogawa M, Porter P, Nakahata T. Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells: and interpretative review. *Blood* 1983; 61: 823-829.

Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A: Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res* 2007; 313: 2550-2562.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 191-220.

Onyia JE, Clapp DW, Long H, Hock JM. Osteoprogenitor cells as targets for ex vivo gene transfer. *J Bone Miner Res* 1988; 13: 20-30.

Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat. Immunol* 2002; 3: 323-328.

Owen ME, Cave J, Joyner CJ. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CRU-F. *J Cell Sci* 1987; 87: 731-738.

Owen ME. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988; 10: 63-76.

Padovan CS, Jahn K, Birnbaum T, Reich P, Sostak P, Strupp M, Straube A. Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells. *Cell Transplant* 2003; 12: 839- 848.

Panepucci RA, Siufi JLC, Silva WA, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, Zago, MA. Comparison of Gene Expresión of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2004; 22: 1263-1278.

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

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; 26:300-311.

Pedemonte E, Benvenuto F, Casazza S, et al. The molecular signature of therapeutic mesenchymal stem cells exposes the architecture of the hematopoietic stem cell niche synapse. *BMC Genomics* 2007; 8: 65.

Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4857–4861.

Peters C, Shapiro EG, Krivit W. Hurler syndrome: Past, present, and future. *J Pediatr* 1998; 133: 7-9.

Phinney DG, Kopen G, Rigther W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 1999; 75: 424-436.

Phinney DG. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle*. 2007; 6(23): 2884-9.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143.

Poggi A, Prevosto C, Massaro AM, Negrini S, Urbani S, Pierri I, Saccardi R, et al. Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: Role of NKp30 and NKG2D receptors. *J Immunol* 2005; 175: 6352–6360.

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; 194:664-673.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.

Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* 2001; 3: 393-6.

Purton LE, Lee MY, Torok-Storb B. Normal human peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte colony stimulating factor have increased osteoclastogenic potential compared to nonmobilized blood. *Blood* 1996; 87: 1802-8.

Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002; 157: 851-864.

Rafii S. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hemopoietic progenitor cell adhesion. *Blood* 1994; 84: 10-19.

Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 2007; 83(1): 71-6.

Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 713-734.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 105-11.

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

Rus CD, Sorițău O, Sușman S, Pop VI, Mișu CM. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. *Rom J Morphol Embryol.* 2011; 52(3): 803-8.

Russell S. Human osteoblast support human hematopoietic progenitor cells in in vitro bone marrow cultures. *Blood* 1996; 87: 518-523.

Russell S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood.* 2005; 105: 2631-2639.

Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005; 85: 962-71.

Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005; 106: 756-63.

Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells* 2008; 26(1): 146-50.

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

Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 2006; 5: 91-116.

Schuhmann B, Dietrich A, Sel S, Hahn C, Klingenspor M, Lommatzsch M, Gudermann T, Braun A, Renz H, Nockher WA. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol* 2005; 163: 15- 23.

Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of

mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8: 191-9.

Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells. *Arch of Med Res* 2003; 34: 565-571.

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

Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Ohta S, Graves SE. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res* 1994; 389: 271-280.

Simone MD, De Santis S, Vigneti E, Papa G, Amadori S, Aloe L. Nerve growth factor: A survey of activity on immune and hematopoietic cells. *Hematol Oncol* 1999; 17:1-10.

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

Somkuti SG. *Obstetrics and Gynecology Board Review Pearls of Wisdom*, 3rd Ed. McGraw Hill USA 2008.

Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 2006; 24: 1254-1264.

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; 1: 296-305.

Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J* 2004; 18: 980-982.

Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005; 106: 419-427.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006; 24: 74-85.

Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006; 107: 1484-1490.

Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gammastimulated marrow

stromal cells: A new type of nonhematopoietic antigenpresenting cell. *Blood* 2006; 107: 2570-2577.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow celltransplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-1918.

Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3584-3588.

Sweeney LJ. *Basic Concepts en Embryology*. Mc Graw Hill, USA, 1998.

Sykova E, Homola A, Mazanec R, Lachmann H, Konradova SL, Kobylka P, Padr R, Neuwirth J, Komrska V, Vavra V, Stulik J, Bojar M. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant* 2006; 15: 675-87.

Sykova E, Jendelova P, Urdzikova L, Lesny P, Hejcl A. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels—two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26: 1113-29.

Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Complications and results. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1558-1566.

Takashima Y, Era T, Nakao K, *et al.* Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007; 129(7): 1377-88.

Tamaki S, Eckert K, He D, Sutton R, Doshe M, Jain G, Tushinski R, Reitsma M, Harris B, Tsukamoto A, Gage F, Weissman I, Uchida N. Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res.* 2002; 69(6): 976-86.

Tamir A, Petrocelli T, Stetler K, Chu W, Howard J, St Croix B, Slingerland J, Ben-David Y. Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: A role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest. *Cell Growth Differ* 2000; 11:269–277.

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542–545.

Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E, Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months, *Curr Opin Immunol*, 2000, 12(6): 731–737.

Till JE, McCulloch EA. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochem Biophys Acta* 1980; 605: 431-459.

Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before

any differentiation. *Differentiation* 2004; 72, 319-326.

Tremain N, Korkko J, Ibberson D et al. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells* 2001; 19: 408-18.

Tropel P, Platet N, Platel JC, Noel D, Albrieux M, Benabid AL, Berger F. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 2868-76.

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

Tseng PY, Chen CJ, Sheu CC, Yu CW, Huang YS. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 95- 102.

Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 413-419.

Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K et al. preferential localization of c-kit product in tissue mast cell, basal cell of the skin, epithelial cell of breast, small cell lung carcinoma, and seminoma/ dysgerminoma in humans: immunohistochemical study of formalin-fixed, paraffin- embedded tissues. *Virchows Arch* 1994; 424:131-41.

Ucelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2566-2573.

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:14720-1425.

Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 502-508.

Vicovac L, Aplin JD. Epithelial—mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat (Basel)* 1996; 156: 202-16.

Vorvick L, Storck S. Placenta. *Medical Encyclopedia*. A.D.A.M. Inc. NIH 2008

Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* 2002; 129: 2987-2995.

Waddington RJ, Roberts HC, Sugars RV, Schonherr E. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur Cell Mater* 2003; 6: 12- 21.

Wang QR, Yang ZJ, Wolf NS. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the growth of murine bone marrow CFU-F. *Exp Hematol* 1990; 18: 341-347.

Weiss L. The hematopoietic microenvironment of bone marrow: An ultra structural study

of the stroma in rats. *Anat Rec* 1976; 186: 161-84.

Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao MS, Velagaleti G, Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*. 2006; 24(3):781-92.

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 93-106.

Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 2005; 23: 392- 402.

Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 2002; 69: 908-917.

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364:141-148.

Xu X, Xu Z, Xu Y, Cui G. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis* 2005; 16: 245-55.

Yaghoobi MM, Mahani MT. NGF and BDNF expression drop off in neurally differentiated bone marrow stromal stem cells. *Brain Res* 2008; 1203: 26-31.

Yamazaki K, Allen TD. Ultra structural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: The "neuro-reticular complex". *Am J Anat* 1990; 187: 261-76.

Yang J, Zhou W, Zheng W, Ma Y, Lin L, Tang T, Liu J, Yu J, Zhou X, Hu J. Effects of myocardial transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction. *Cardiology* 2007; 107: 17-29.

Yen BL, Huang HI, Chien Ch, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun ChT, Yen M, Lee M, Chen Y. Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta. *Stem Cells* 2005; 23: 3-9.

Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545–548.

Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine FGF2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 2412-2419.

Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RC. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004; 13: 263–271.

Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, Tang P, Mao N, Human placenta-derived

mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture- initiating cells from cord blood CD34+ cells, *Exp Hematol*, 2004, 32(7): 657–664.

Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3431-40.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burguer JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2: 477-488.