



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

“ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD DE LAS
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES PROVENIENTES
DE MÉDULA ÓSEA, SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y
PLACENTA PARA MANTENER LA FORMACIÓN IN VITRO DE
CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS DE
SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. GUADALUPE ROSARIO FAJARDO ORDUÑA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS
MONTESINOS

COMITÉ TUTOR: DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS
DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **FAJARDO ORDUÑA GUADALUPE ROSARIO** con número de cuenta **300284847**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE MÉDULA ÓSEA, SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y PLACENTA PARA MANTENER LA FORMACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL"**, realizada bajo la dirección del: **DR. JUAN JOSÉ MONSTESINOS MONTESINOS**.

Presidente: DR. JESÚS CHIMAL MONROY
Vocal: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
Secretario: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Suplente: DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS
Suplente: DR. ENRIQUE MIRANDA PERALTA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de abril de 2012

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

Agradecimientos

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por todo el apoyo recibido durante este tiempo.
- Al CONACYT, por la beca que me brindó durante los dos años de la maestría y por el apoyo recibido para la realización de este trabajo (SALUD-2008-C01-87183).
- Al Instituto Mexicano del Seguro Social, por el apoyo recibido para la realización de este trabajo (CLAVE: FIS/IMSS/PROT/C2007/062).
- A los miembros del comité tutor conformado por el Dr. Héctor Mayani Viveros y el Dr. Edelmiro Santiago Osorio, por su tiempo y esfuerzo en la asesoría brindada para la realización de este trabajo.

- A todos los integrantes del laboratorio de Células Troncales Mesenquimales de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su apoyo recibido durante la realización de este trabajo.
- A la Dra. Pati Flores por enseñarme el manejo de las células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical y haberme tenido mucha paciencia.
- Al Dr. Mayani, Dra. Kena, Dra. Toni y Dra. Rossana por sus comentarios para mejorar este trabajo y mi formación como estudiante.
- A mi tutor el Dr. Juan José, por haberme apoyado durante la realización del proyecto.

Y gracias...

- A mi esposo Emmanuel Robledo por haberle dado un giro muy grande y sentido a mi vida.
- A mis papás, hermanos y nuevos integrantes de mi hermosa familia por apoyarme en todos momentos, principalmente los más difíciles.
- A mis amigos, por escucharme y confiar en mí.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
1. Células Troncales	5
2. Sistema Hematopoyético	7
3. Sistema Estromal	10
4. Obtención y caracterización de MSCs provenientes de MO	13
5. Papel de las MSCs en el nicho de las HSCs	17
6. Fuentes alternativas para la obtención de MSCs	21
Antecedentes	23
1. Papel de las MSCs en la expansión in vitro de HPCs	23
2. Papel de las MSCs en el TCH	25
Planteamiento del problema	27
Hipótesis	28
Objetivos	29
Metodología	30
1. Obtención de muestras de MO, SCU y PL	30
2. Obtención y cultivo de las MSCs	30
3. Morfología de las MSCs	32
4. Inmunofenotipo de las MSCs	32
5. Capacidad de diferenciación de las MSCs	33
5.1 Inducción osteogénica	33
5.2 Inducción adipogénica	34
5.3 Inducción condrogénica	34
6. Obtención de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU	35
7. Co-Cultivo de las MSCs con la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-	36
8. Análisis de la proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-	37
9. Cuantificación de las HPCs menos primitivas	38

9.1 Ensayo de células formadoras de colonias (CFC)	38
10. Cuantificación de las HPCs más primitivas	38
10.1 Identificación de células CD34+CD38-Lin-	38
10.2 Ensayo de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC)	40
11. Análisis estadístico	41
Resultados	42
1. Obtención y caracterización de MSCs de MO, SCU y PL	42
1.1 Porcentaje de obtención y frecuencia de MSCs en MO, SCU y PL	42
1.2 Morfología de MSCs de MO, SCU y PL	43
1.3 Inmunofenotipo de MSCs de MO, SCU y PL	45
1.4 Capacidad de diferenciación de MSCs de MO, SCU y PL	47
2. Co-cultivos de MSCs con la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- en presencia de contacto celular	49
2.1 Muestras de SCU procesadas y obtención de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-	49
2.2 Proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-	50
2.3 Formación de HPCs menos primitivas	52
2.3.1 Formación de CFC mieloides	52
2.3.2 Formación de CFC eritroides	55
2.4 Formación de HPCs más primitivas	57
2.4.1 Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-	57
2.4.2 Formación de LTC-IC	59
3. Co-cultivos de MSCs con la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- en ausencia de contacto celular	61
3.1 Muestras de SCU procesadas y obtención de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-	61
3.2 Proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-	61
3.3 Formación de HPCs menos primitivas	64
3.3.1 Formación de CFC mieloides	64
3.3.2 Formación de CFC eritroides	65
3.4 Formación de HPCs más primitivas	67
3.4.1 Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-	67

3.4.2 Formación de LTC-IC	69
4. Comparación de co-cultivos en presencia y ausencia de contacto de MSCs con la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-	71
4.1 Proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-	71
4.2 Formación de HPCs menos primitivas	73
4.2.1 Formación de CFC mieloides	73
4.2.2 Formación de CFC eritroides	75
4.3 Formación de HPCs más primitivas	77
4.3.1 Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-	77
4.3.2 Formación de LTC-IC	79
Discusión	81
1. Co-cultivos de MSCs de MO, SCU y PL con HPCs de SCU	83
1.1 Co-cultivos de MSCs de MO, SCU y PL con HPCs de SCU: en presencia de contacto célula-célula	83
1.2 Co-cultivos de MSCs de MO, SCU y PL con HPCs de SCU: en ausencia de contacto célula-célula	86
1.3 Co-cultivos de MSCs de MO, SCU y PL con HPCs de SCU: comparación de co-cultivos en presencia y ausencia de contacto célula-célula	88
Conclusiones	93
Perspectivas	94
Bibliografía	95

LISTA DE ABREVIATURAS

ALCAM:	molécula de adhesión celular de linfocito activado*
Ang-1:	angiopoyetina-1
CAFC:	células formadoras de áreas de adoquines*
Células CAR:	células reticulares que secretan altos niveles de CXCL12*
CD	grupo de diferenciación*
CFC:	célula formadora de colonias
CFC-E:	célula formadora de colonias eritroides
BFC-E:	célula formadora de explosión eritroide*
CFC-F:	célula formadora de colonias de fibroblastos
CFC-M:	célula formadora de colonias de monocitos
CFC-Mixta:	célula formadora de colonia mixta
CFC-GM:	célula formadora de colonias de granulocitos y monocitos
CMNs:	células mononucleares
EICH:	enfermedad de injerto contra hospedero
FGF:	factor de crecimiento de fibroblastos
Flt-3L:	ligando del receptor tirosina cinasa parecido a c-fms tipo 3*
G-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos*
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos*
HPC:	célula progenitora hematopoyética*
HPP:	progenitores con alto potencial proliferativo*
HSC:	célula troncal hematopoyética*
ICAM:	molécula de adhesión intracelular*
IL:	Interleucina
ISCT:	sociedad internacional de terapia celular*
LFA-3:	antígeno asociado a la función leucocitaria*
Lin:	linaje
LTC-IC:	células iniciadoras de cultivos a largo plazo*
MEC:	matriz extracelular
MO:	médula ósea
MSC:	célula troncal mesenquimal*

PDGFR:	receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas*
SCF:	factor de célula troncal
SDF-1:	factor derivado de célula estromal-1*
SPM:	sangre periférica movilizada
SCU:	sangre de cordón umbilical
TCH:	trasplante de células hematopoyéticas
TGFβ-3:	factor de crecimiento transformante beta 3*
TPO:	trombopoyetina
VCAM:	molécula de adhesión celular vascular*

*Por sus siglas en inglés

RESUMEN

Las células sanguíneas se originan en la médula ósea (MO), mediante el contacto de células troncales hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas (HSCs y HPCs por sus siglas en inglés respectivamente) con células estromales, quienes provienen de una célula multipotencial denominada célula troncal mesenquimal (MSC, por sus siglas en inglés). Las MSCs también favorecen la expansión de HSCs y HPCs in vitro, su homing e injerto dentro de la MO y una recuperación más rápida en el número de células hematopoyéticas en modelos murinos y pacientes con enfermedades hematológicas tratados con trasplante de células hematopoyéticas (TCH). La principal fuente de MSCs es la MO, sin embargo, su número y potencial de proliferación y diferenciación disminuyen al incrementarse la edad del donador y su obtención es un método invasivo para el mismo. Las MSCs provenientes de fuentes extra-embionarias tienen ventajas dado que después del parto son desechos biológicos. Nuestro grupo ha demostrado que MSCs de sangre de cordón umbilical (SCU) y placenta (PL) tienen características biológicas similares a las de MO, sin embargo se desconocía si presentan la misma capacidad de mantener la formación de HPCs que las MSCs de MO.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar y comparar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL para mantener la formación in vitro de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU. La población hematopoyética se cultivó en contacto y sin contacto con MSCs de MO, SCU o PL.

Las MSCs de las tres fuentes expresaron marcadores característicos de MSCs y se diferenciaron hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos. Las MSCs de SCU y PL tuvieron la misma capacidad de incrementar la proliferación y expansión de CFC mieloides y eritroides, células CD34+CD38-Lin- y LTC-IC que las MSCs de MO. La proliferación de HPCs y expansión de CFC mieloides y células CD34+CD38-Lin- fue significativamente mayor cuando estuvieron en contacto con MSCs (de MO, SCU o PL) que cuando se inhibió el mismo.

En conclusión, las MSCs de SCU y PL tienen la misma capacidad de favorecer la proliferación y expansión de HPCs que las MSCs de MO y dicha capacidad se incrementa mediante el contacto MSC-HPC, por consiguiente, las MSCs de SCU y PL al igual que las de MO, pudieran ser utilizadas en TCH.

ABSTRACT

In the bone marrow (BM), mesenchymal stem cells (MSCs) give rise to stromal cells and contribute to supply an appropriate scaffold for hematopoiesis and a complex network of cytokines, adhesion molecules, and extracellular matrix proteins that regulate survival, proliferation, growth, and differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs). Recently, MSCs have been demonstrated to improve expansion of HSCs and hematopoietic progenitor cells (HPCs) in vitro, to enhance engraftment and improvement of hematopoietic recovery. However, decrease of number of MSCs in BM with age makes it necessary to search for alternative sources of MSCs with capacity to support hematopoiesis. Umbilical cord blood (UCB) and placenta (PL) have been suggested as alternatives sources to BM. We have previously reported that UCB- and PL-MSCs have immunophenotypic and biological characteristics similar to BM-MSCs, however, their support expansion of HPCs capacity at the same conditions is unclear. The present study was aimed to isolate human MSCs from BM, UCB and PL and to compare their ability to support the formation of HPCs in vitro. CD34+CD38-Lin- enriched cells from UCB were cultured with or without contact with UCB-, PL- and BM-MSCs in absence or presence of SCF, FL, TPO and IL-6 (seminal coctel) or SCF, FL, TPO, IL-6, IL-3, G-SCF and GM-CSF (mixed coctel). Proliferation of HPCs, number of CD34+CD38-Lin- cells, colony-forming cells (CFC) and long-term culture-initiating cells (LTC-IC) were assessed. MSCs from the three sources were positive for "mesenchymal" antigens and showed osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. In cultures in presence of seminal coctel, MSCs from UCB, PL and BM were able to increase proliferation and expansion of HPCs. In contact with MSCs from three sources, HPCs showed a significant increase in proliferation as well as myeloid-CFC and CD34+CD38-Lin- cells expansion, compared to cultures with no contact. In addition, increase in number of eritroid-CFC and LTC-IC was observed for this condition. In cultures with cytokines of mixed coctel, in contact with MSCs from three sources, HPCs showed the highest expansion of CD34+CD38-Lin- cells.

We concluded that UCB- and PL-MSCs have the same capacity than BM-MSCs to support expansion of HPCs in vitro and this capacity is increased in MSC HPC contact, therefore UCB- and PL-MSCs may be used to improve hematopoietic transplantation.

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales son definidas funcionalmente como células con capacidad de auto-renovación (es decir, capaces de generar células hijas idénticas a la célula madre) y con la habilidad para generar progenie con un potencial de diferenciación más restringido y con funciones específicas (células diferenciadas; Lanza et al, 2009).

Existen distintos tipos de células troncales, definidas por su potencial para originar diferentes células o tejidos. La primera célula troncal es el huevo fertilizado o cigoto, es una célula troncal *totipotencial*, debido a que produce tanto al embrión como a estructuras extraembrionarias, como la placenta, el saco vitelino y el cordón umbilical que son fundamentales para el desarrollo del embrión. Hasta el estadio de mórula (8 células), cada célula es idéntica a las otras, es decir, todas son células troncales totipotenciales (Figura 1; Pelayo et al, 2011).

Conforme avanza el desarrollo, el embrión alcanza un estadio de blastocisto, en el que cada célula que forma parte de la masa celular interna es capaz de formar células de cualquier tejido del organismo, de ahí que se les considere células troncales *pluripotenciales*. Dichas células troncales embrionarias (ESC por sus siglas en inglés) son incapaces de dar origen a las estructuras extraembrionarias (Figura 1; Odorico et al, 2001).

A partir de las ESCs se producen diferentes células troncales somáticas, incluyendo aquellas que dan origen al sistema nervioso, la sangre, el hígado, el músculo, etc. Estas células troncales son consideradas *multipotenciales* ya que pueden generar diferentes linajes celulares dentro de un mismo tejido (Figura 1). A partir de las ESCs, se producen también un tipo diferente de células troncales no somáticas: las células troncales germinales, que migran a las gónadas en desarrollo (crestas genitales) y eventualmente dan lugar a los gametos (Pelayo et al, 2011).

La frecuencia de las células troncales presentes en los tejidos es muy baja y no poseen características morfológicas que puedan utilizarse para su identificación, por lo tanto, actualmente la forma de reconocer a estas células incluye tanto análisis inmunofenotípico (es decir, la expresión de moléculas de membrana o intracelulares),

como la expresión de genes que pueden actuar como marcadores. Sin embargo, son los ensayos funcionales, tanto in vivo como in vitro, los que determinan la identidad de toda célula troncal (Pelayo et al, 2011).

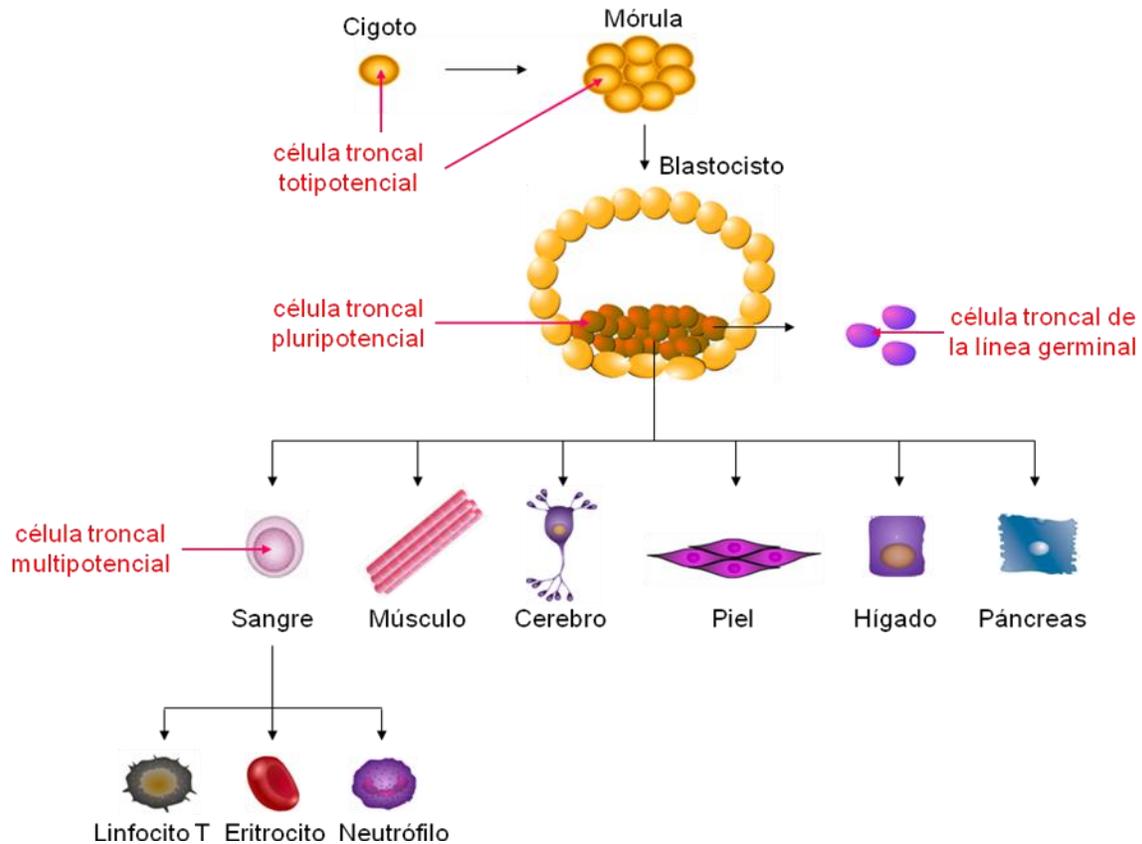


Figura 1. Células troncales. El cigoto es una célula troncal totipotencial (origina al embrión y a las estructuras extraembrionarias). Al autoreplicarse, genera células idénticas a ella que constituyen el estadio de mórula. En el estadio de blastocisto, las células de la masa celular interna corresponden a células troncales embrionarias pluripotenciales (pueden formar células de cualquier tejido embrionario); dichas células, dan lugar a células troncales de la línea germinal y a células troncales multipotenciales de las tres capas embrionarias: Mesodermo (ej. sangre y músculo), Ectodermo (ej. cerebro y piel) y Endodermo (ej. hígado y páncreas), Modificado de Pelayo et al, 2001.

En la mayoría de los tejidos, entre las células troncales y su progenie totalmente diferenciada, existen poblaciones intermedias de células progenitoras y precursoras

que no son capaces de auto-renovarse, poseen capacidad de proliferación y un restringido potencial de diferenciación. Una de las principales funciones de estas poblaciones intermedias es incrementar el número de células diferenciadas por cada división de las células troncales (Pelayo et al, 2011).

La viabilidad, auto-renovación, proliferación y diferenciación de las células troncales, son procesos extremadamente complejos, que dependen de diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Los primeros comprenden una variedad de moléculas reguladoras, presentes en la célula de acuerdo al tejido o linaje al que pertenece; los segundos, incluyen a todos los tipos celulares y sus productos que forman parte del microambiente en el que la célula se desarrolla. En otras palabras, la función de las células troncales depende de factores reguladores intrínsecos que son modulados por señales externas (Pelayo et al, 2011).

Un ejemplo claro de la regulación de las células troncales por su microambiente, es el caso de las células troncales hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) en la médula ósea (MO). Este órgano en etapa post-natal está compuesto por dos sistemas celulares principales: el sistema hematopoyético y el sistema estromal, quienes co-existen y trabajan conjuntamente (Bianco et al, 2001).

2. SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

Antes de comenzar a describir el sistema hematopoyético, es necesario definir algunos términos utilizados en este y los siguientes apartados. La *proliferación* se refiere al incremento en el número de células totales (Figura 2). Otros términos pueden involucrar a la proliferación, sin embargo, hacen referencia a una población celular particular. Por ejemplo, el *mantenimiento* indica la conservación del número de células con características semejantes a las células que las originaron, la *expansión* se refiere al incremento de una población celular con características semejantes a las células que las originaron, mientras que *pérdida* indica la disminución o desaparición de células con características semejantes a las células que las originaron (Figura 2; Flores-Guzmán, 2006).

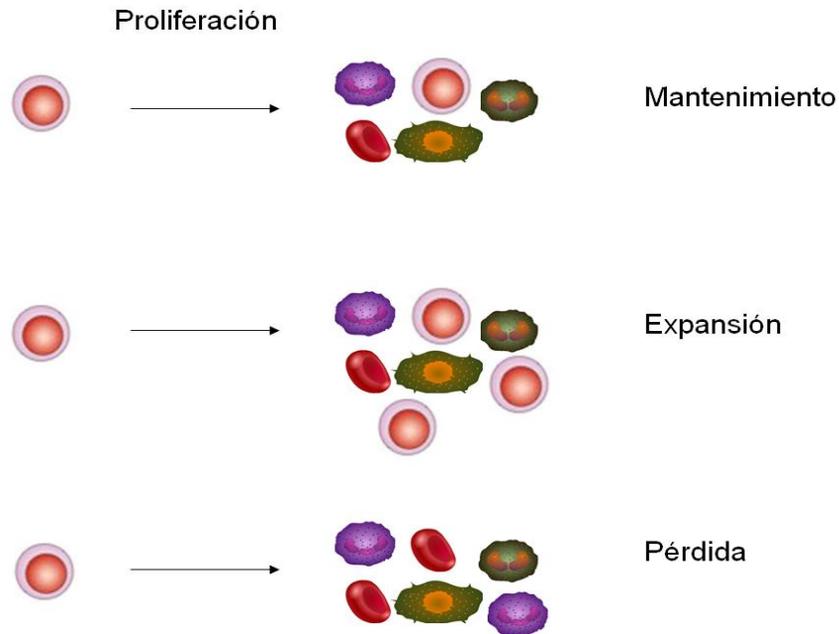


Figura 2. Definición de los conceptos de mantenimiento, expansión y pérdida celular. En todos los casos, se implica una proliferación (incremento en el número celular); sin embargo, puede existir un mantenimiento de la población con características semejantes a la que le dio origen. Una segunda posibilidad, es que esta población se incremente (expansión) o bien, que ocurra una pérdida de la misma en la nueva generación de células originadas. Modificado de Flores-Guzman, 2006.

El sistema hematopoyético se conforma de cuatro compartimentos celulares, determinados de acuerdo al estadio de maduración de las células. El primero es el de las HSCs, capaces de auto-renovarse y de generar a todos los linajes hematopoyéticos in vivo, así como de sostener la producción de estas células a lo largo de la vida de un individuo. Las HSCs de humano expresan los antígenos CD34, CD90, CD117 y CD133 y se pueden identificar mediante ensayos de reconstitución de la médula ósea en ratones inmunodeficientes (Figura 3; Szilvassy, 2003; Wognum et al, 2003; Mayani et al, 2007).

En el segundo compartimento se encuentran las células progenitoras hematopoyéticas (HPCs por sus siglas en inglés), que se originan a partir de las HSCs y que han perdido su capacidad de autorrenovación, poseen un alto potencial de proliferación y pueden ser multipotenciales (origina a todos los linajes

hematopoyéticos), bipotenciales (restringida a dos linajes hematopoyéticos) ó monopotenciales (restringida a un linaje hematopoyético). Las HSCs y HPCs comparten la expresión del antígeno CD34, sin embargo las HSCs y las HPCs más primitivas no expresan CD38, mientras que las HPCs menos primitivas expresan este antígeno y marcadores celulares particulares de acuerdo al linaje al que pertenecen (Mayani et al, 1993; Mayani et al, 2007). Las HPCs más primitivas se pueden identificar in vitro mediante ensayos de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC por sus siglas en inglés) mientras que las HPCs menos primitivas, a través de ensayos de células formadoras de colonias (CFC, Figura 3; Flores-Guzmán et al, 2009).

SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

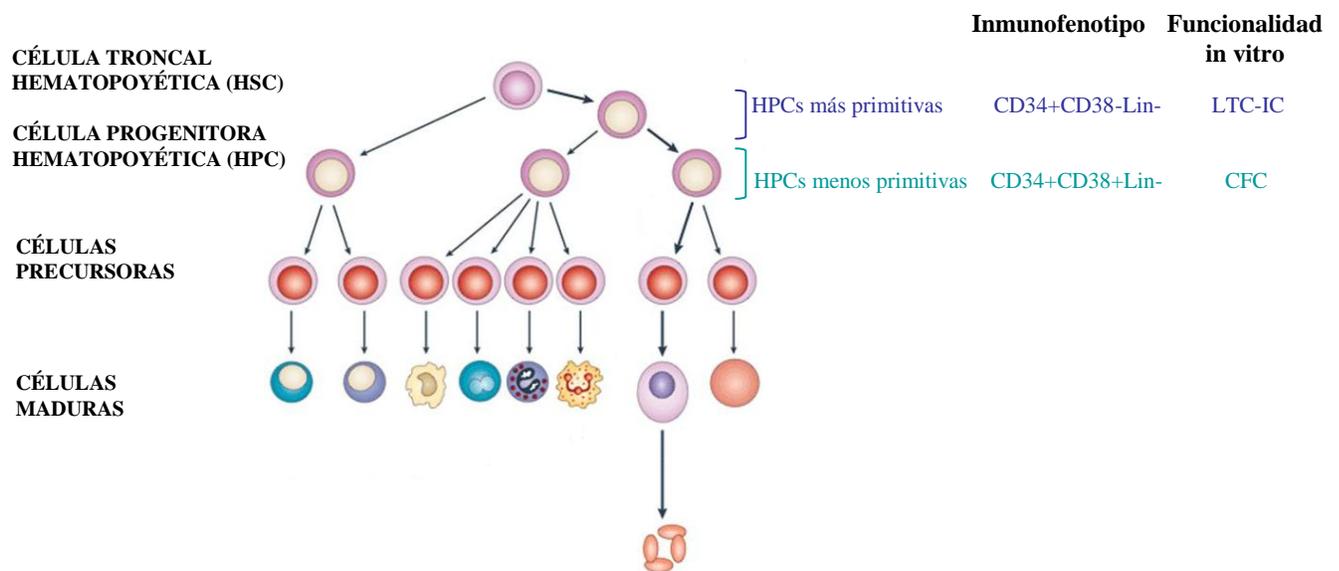


Figura 3. Sistema hematopoyético. Presencia de cuatro compartimentos celulares determinados por el grado de madurez de las células. Se indican el inmunofenotipo y el ensayo de funcionalidad in vitro para identificar a las HPCs. LTC-IC, del inglés *long-term-culture-initiating cell*; CFC, célula formadora de colonia.

Las HPCs dan lugar a las células precursoras (tercer compartimento), comprometidas hacia un linaje determinado, con capacidad de proliferación limitada y se pueden reconocer por su morfología observándolas bajo el microscopio. Por último,

en el cuarto compartimento se encuentran las células maduras circulantes, originadas a partir de las células precursoras (Figura 3; Mayani et al, 2007).

Las células hematopoyéticas tienen un tiempo de vida finito, por lo que mantener sus números en condiciones estándar o de amplificación en respuesta a estrés hematológico, requiere de una actividad hematopoyética constante y experimentar una serie de divisiones clonales a lo largo de la vida del individuo (Szilvassy, 2003).

Las células hematopoyéticas residen dentro de la MO en un microambiente especializado que modula la quiescencia, autorrenovación, proliferación y compromiso de las HSCs y la expansión, maduración y apoptosis de las HPCs. La regulación de estos mecanismos es a través de interacciones físicas y bioquímicas que ocurren entre las células hematopoyéticas y el sistema estromal (Mayani et al, 1992; Hubin et al, 2005; Panoskaltis et al, 2005; Adams y Scadden, 2006).

3. SISTEMA ESTROMAL

El sistema estromal es una red de células estromales que producen moléculas de la matriz extracelular, moléculas de adhesión y citocinas que regulan la hematopoyesis (Figura 4). El sistema estromal consiste de cinco tipos de células: macrófagos, células endoteliales, células reticulares, adipocitos y osteoblastos (Mayani et al, 1992). A continuación se mencionan algunas características de las células que conforman el sistema estromal.

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

CÉLULAS ESTROMALES Y FORMACIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS EN LA MO

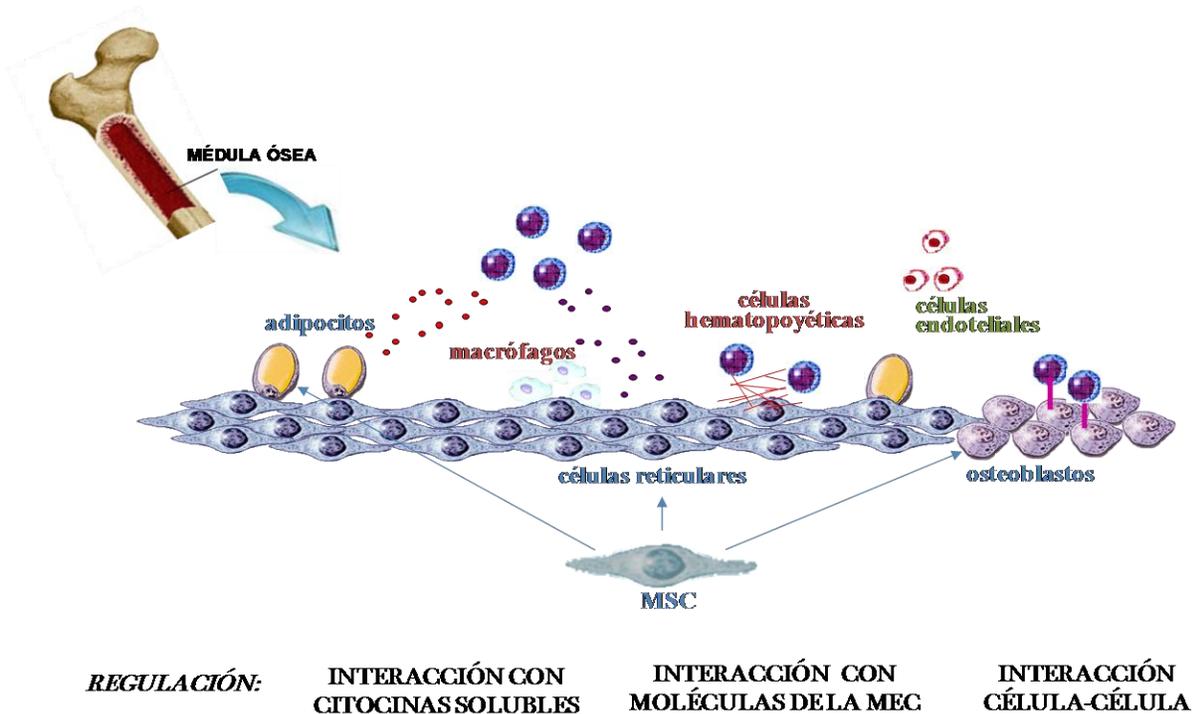


Figura 4. Células que conforman el sistema estromal de la MO. Macrófagos de origen hematopoyético; osteoblastos, adipocitos y células reticulares de origen mesenquimal y células endoteliales. La interacción de las células hematopoyéticas con las células estromales se llevan a cabo mediante tres tipos de interacciones: interacción con citocinas solubles, interacción con moléculas de la MEC e interacción célula-célula mediante moléculas de adhesión; MEC, moléculas de la matriz extracelular. Modificado de Mayani et al, 2007.

Las células endoteliales se originan de una célula progenitora endotelial. La red vascular medular está cubierta por una capa de células endoteliales que se encuentran en contacto estrecho con las células hematopoyéticas maduras que salen hacia la circulación (Bianco et al, 2001), lo que sugiere que las células endoteliales pueden modular los últimos estadios de maduración de las células hematopoyéticas y su liberación hacia torrente sanguíneo. Se ha reportado que las células endoteliales expresan moléculas que regulan la adhesión, homing

(capacidad de dirigirse hacia diferentes tejidos), injerto después de trasplante y posiblemente la proliferación de las HSCs (Jung et al, 2007; Rafii et al, 1997).

Las células reticulares son el mayor componente celular del estroma de la MO (Mayani et al, 1992; Bianco y Boyde, 1993). Se ha reportado la presencia de células reticulares que secretan altos niveles de CXCL12 (quimiocina conocida también como el factor derivado de célula estromal-1, SDF-1 por sus siglas en inglés, molécula esencial para el homing, quiescencia y sobrevivencia de las HSCs; Sugiyama et al, 2006; Le´vesque et al, 2010) alrededor de los sinusoides venosos. Estas células llamadas células CAR (del inglés: CXCL12-abundant reticular cells), también son el mayor productor del factor de célula troncal (SCF por sus siglas en inglés) en la MO, esencial para el mantenimiento y quiescencia de las HSCs (Omatsu et al, 2010). La mayoría de las células CAR tienen el potencial para diferenciarse hacia adipocitos y osteoblastos y son requeridas para la proliferación de células progenitoras eritroides y de células B, así como para el mantenimiento de las HSCs en un estado indiferenciado (Sugiyama et al, 2006; Omatsu et al, 2010).

Los adipocitos aumentan en la MO cuando se presenta una patología o cuando se reduce la actividad hematopoyética debido al incremento en la edad del individuo (Bianco et al, 1999). Se ha reportado que una manera indirecta en que los adipocitos regulan la hematopoyesis es mediante la secreción de leptina, debido a que sus niveles están relacionados con el número de células blancas (Wilson et al, 1997), de la misma manera, la secreción de adiponectina incrementa la proliferación de las HSCs manteniéndolas en un estado funcionalmente inmaduro (DiMascio et al, 2007).

Los osteoblastos producen CXCL12 y osteopontina, involucrados en la retención y mantenimiento de las HSCs, así como angiopoyetina-1 (Ang-1), SCF y trombopoyetina (TPO) quienes mantienen a las HSCs en un estado quiescente (Nagasawa et al, 2011). Se sabe que el número de HSCs incrementa conforme aumenta el número de osteoblastos y que HSCs se localizan adjuntas a células osteoblásticas sobre la superficie del hueso (Zhang et al, 2003).

Los adipocitos, osteoblastos y células reticulares se originan a partir de una célula multipotencial denominada célula troncal mesenquimal (Figura 4; MSC por sus siglas en inglés; Dazzi et al, 2006; Nagasawa et al, 2011).

4. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MSCs PROVENIENTES DE MO

La presencia de MSCs en la MO fue documentada por primera vez por Goujon en 1869, quien observó el potencial osteogénico de algunas células en trasplantes heterotópicos de MO de conejo (Goujon et al, 1869), lo cual fue confirmado un año después por Biakow (1870). Hasta 1960 fue que Danis volvió a mostrar que dentro de la MO hay células que tienen un potencial osteogénico y no sólo factores inductores hacia este linaje, para lo cual, colocó médula dentro de una cámara de difusión (dos membranas semipermeables separadas por un anillo de plástico) implantándola en un animal hospedero y observando posteriormente su contenido mediante métodos histológicos (Danis, 1960). Estos resultados fueron confirmados por experimentos similares realizados por otros investigadores más tarde (Petrankova et al, 1963; Friedenstein et al, 1966), en donde además de observar la formación de osteoblastos, se encontró la formación de condrocitos dentro de las cámaras de difusión, demostrando que la MO tenía al menos el potencial para formar hueso y cartílago.

Más tarde se demostró que el potencial osteogénico de la MO era una característica de un subgrupo de células que conformaban un muy bajo porcentaje del total de la población celular de la MO (Friedenstein, 1973). Después, utilizando ratones y cobayos, observaron que estas células son adherentes al plástico del plato de cultivo, no son fagocíticas, tienen morfología fibroblastoide y que dan origen a células del estroma medular (adipocitos, osteoblastos y fibroblastos estromales). Dichas células fueron denominadas como mecanocitos estromales o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F por sus siglas en inglés) ya que sus colonias se formaban a partir de una sola célula (Friedenstein et al, 1974; 1976).

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

célula progenitora comprometida y el de células maduras que incluían células reticulares, fibroblastos, adipocitos y osteoblastos (Owen, 1985). A principios de los 90's, Caplan llamó a esta célula adulta multipotente "célula troncal mesenquimal", teniendo la capacidad de formar tejidos como el adiposo, tendón, ligamento, músculo y dermis, a esta capacidad de diferenciación hacia múltiples fenotipos mesenquimales se le nombro mesengénesis (Figura 5; Caplan 1991; 1994).

La prueba formal de la multipotencialidad de la MSCs vino a partir de experimentos sobre poblaciones clonales con células obtenidas de modelos animales (Bennet et al, 1991; Dennis y Caplan 1996; Dennis et al, 1999). Finalmente, la primera descripción detallada del potencial tri-linaje (adipocitos, condroblastos y osteoblastos) de MSCs de MO de humano fue descrita por Pittenger, en donde tres de seis colonias de MSCs fueron capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos, mientras que las seis tuvieron la capacidad de diferenciarse hacia hueso (Pittenger et al, 1999).

En los experimentos de Friedenstein, la manera de obtener y expandir a las MSCs consistía en cultivar a las células provenientes de MO, después de un periodo de tiempo retiraba las células en suspensión y cultivaba a las células adheridas al plato de cultivo. Durante los primeros días las población de células adherentes era heterogénea, pero después de varias resiembras se formaban colonias de células con morfología fibroblastoide (Haynesworth et al, 1992; Flores-Figueroa et al, 2005). En la década de los 90's, Caplan y colaboradores obtuvieron MSCs de MO de humanos adultos modificando el método utilizado por Friedenstein, para lo cual obtenían MO de aspirados de cresta iliaca y de la epífisis femoral de donadores sanos. Se obtenían las células nucleadas en la fracción de baja densidad de un gradiente de Percoll, después de tres días se desechaban las células no adherentes al plato del cultivo, mientras que las células adheridas seguían siendo cultivadas (Haynesworth et al, 1992).

Actualmente diversos grupos de investigación han utilizado gradientes de Ficoll en lugar de Percoll para la obtención de MSCs (Flores-Figueroa et al, 2005; Montesinos et al, 2009). También se han usado distintos medios de cultivos como α MEM o DMEM bajo en glucosa, así como diferentes concentraciones de suero fetal de bovino.

En los siguientes años, diferentes grupos trataron de buscar un marcador de linaje para lograr una obtención más pura de MSCs y que excluyera a las células hematopoyéticas. De los marcadores más tempranos que se encontraron expresados en las MSCs fueron los antígenos que se unen a SH2, SH3 y SH4 (Haynesworth et al, 1992). Estudios posteriores mostraron que SH2 se une a CD105, un tipo de receptor de TGF- β 3 encontrado también sobre macrófagos y células endoteliales. Además SH3 y SH4 se une específicamente a CD73, una molécula expresada en subpoblaciones de células T, B y células endoteliales (Rickard et al, 1996). Actualmente, CD105 y CD73 son parte del grupo de anticuerpos que contribuyen a la caracterización de las MSCs (Dominici et al, 2006).

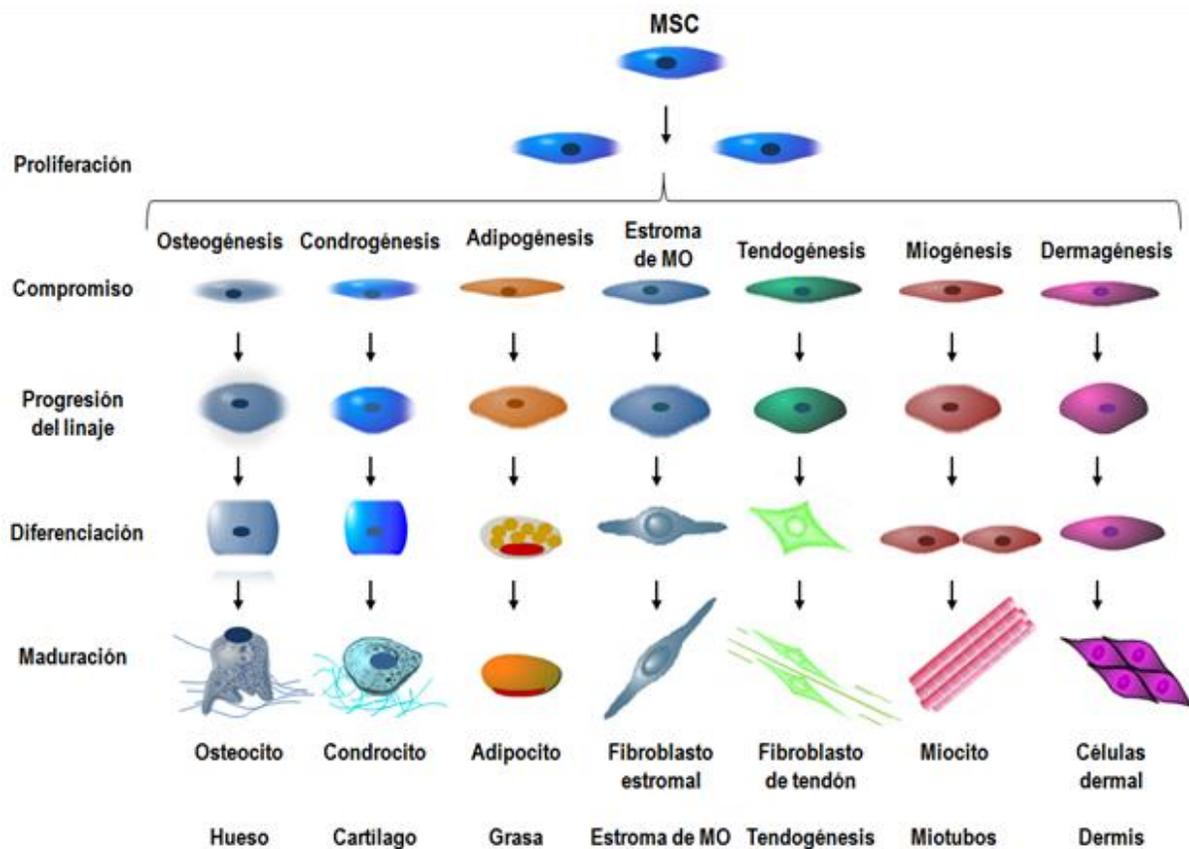


Figura 5. Mesengénesis. Proceso de la formación de tejido mesenquimal a partir de MSCs sugerido por Arnold Caplan. Modificadado de Caplan, 1994.

Otra estrategia empleada fue crear nuevos anticuerpos que reconozcan a las MSCs, tal como es el caso de STRO-1, que reconoce a las células estromales de MO como adipocitos, células de músculo liso, fibroblastos estromales y algunas CFU-F, sin embargo, este anticuerpo también reconoce a células eritroides y no se expresa en todas las MSCs (Simmons y Torok-Storb, 1991; Pittenger et al, 1999).

Debido a que hasta ahora no se ha identificado una molécula que sea específica para las MSCs y que permita obtenerlas de manera selectiva, además que diferentes investigadores han utilizado distintos métodos para su obtención y condiciones para su crecimiento, en el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés), propuso a la comunidad científica adoptar medidas estándares para la identificación de MSCs. Así, la ISCT propone tres criterios: primero, las células deben ser adherentes al plástico cuando son mantenidas en cultivo; segundo, deben ser positivas para los antígenos CD105, CD73 y CD90, adicionalmente deben ser negativas para la expresión de antígenos hematopoyéticos tales como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 y HLA-DR y tercero, deben ser capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos (Dominici et al, 2006).

Inicialmente se pensó que las MSCs eran capaces de generar únicamente células de origen mesodérmico (osteoblastos, condroblastos, adipocitos, fibroblastos, cardiomiocitos y tenocitos) sin embargo, publicaciones demostraron más tarde que son capaces de diferenciarse a células del endodermo (hepatocitos y epitelio) y ectodermo (neuronas; Bobis et al, 2006; Baksh et al, 2004; Pittenger y Martin, 2004). Algunos científicos hipotetizan que la generación de células de origen diferente al mesodérmico es debido a un proceso de reprogramación en la expresión de genes denominado plasticidad celular (Sato et al, 2005; Bobis et al, 2006).

Uno de los primeros estudios relacionados con el uso terapéutico de las MSCs, fue su trasplante en pacientes con osteogénesis imperfecta diferenciándose hacia osteoblastos y regenerando el tejido óseo, en pacientes con infarto al miocardio donde son capaces de diferenciarse hacia cardiomiocitos (Horwitz et al, 1999; Vassalli y Mocoetti 2011) y su capacidad de injerto en músculo estriado de pacientes con distrofia muscular (Gussoni et al, 2002).

Similar a lo que sucede en el sistema hematopoyético, las MSCs secretan citocinas que pueden actuar de manera autócrina y/o parácrina. Estas citocinas pueden suprimir reacciones inmunes locales, inhibir fibrosis y apoptosis e incrementar el proceso de angiogenesis en tejido en reparación. Este fenómeno de las MSCs como mediadores tróficos se ha observado en modelos de infarto al corazón, infarto al cerebro y regeneración de meniscos, sin que las MSCs se diferencien a células del tejido dañado (Caplan y Dennis, 2006; Li et al 2005; Pak et al, 2003; Murphy et al, 2003). Y como ya se mencionó, en el TCH, en donde las MSCs mejoran el injerto de las células hematopoyéticas, aceleran la reconstitución de la hematopoyesis y disminuyen la enfermedad de injerto contra hospedero (EICH) al inhibir la activación de los linfocitos T (Maitra et al, 2004; Fang et al, 2009).

5. PAPEL DE LAS MSCs EN EL NICHO DE LAS HSCs

Dentro del microambiente hematopoyético, las HSCs se localizan en un sitio específico llamado nicho de célula troncal, quien regula su quiescencia, autorrenovación y diferenciación (Ehninger y Trumpp 2011), datos reportados sugieren que las HSCs quiescentes se localizan principalmente en el endosteo trabecular (nicho osteoblástico ó endosteal), mientras que las HSCs que se encuentran en división residen en el sinusoides perivascular (nicho endotelial o vascular) de la MO (Kiel et al, 2005; Kiel y Morrison, 2006), además de la presencia de HSCs en un tercer nicho sobre células reticulares (nicho reticular; Nagasawa et al, 2011).

Investigaciones recientes señalan que las MSCs son componentes importantes del estroma hematopoyético dentro de la MO, ya que además de originar a células estromales, las MSCs producen moléculas de la MEC y citocinas importantes para la hematopoyesis y expresan ligandos para moléculas de superficie presentes en las células hematopoyéticas (Tabla 1; Le Blanc, 2009).

Se ha observado en modelos murinos, que distintas sub-poblaciones de MSCs se encuentran localizadas dentro de los diferentes nichos de las HSCs, mostrando así un papel importante en la regulación de estas células hematopoyéticas (Figura 6; Nagasawa et al, 2011).

Tabla 1. Moléculas producidas por MSCs importantes en la regulación de la hematopoyesis

CITOCINAS	MOLÉCULAS DE LA MEC	RECEPTORES
IL-2	Colagena I,III,IV,VI	rIL-1
IL-4	Laminina	rIL-3
IL-10	Trombospondina	rIL-4
IL-12p170	Tenacina	rIL-6
IL-13	Fibronectina	rIL-7
LIF	Vimentina	r-PDGF
IL-3	Osteopontina	r-NGF
IL-11		r-TNFIgII
GM-CSF		r-IFNg
M-CSF	MOLECULAS DE ADHESION	r-EGF
IL-6	ICAM-1	r-FGF
SCF	ICAM-2	r-IGF
Flt-3L	VCAM-1	r-TGFb-I,II
Tpo	ALCAM	
VEGF-A,-C	L-selectina	
MCP-1	LFA-3	QUIMIOCINAS
PIGF	Endoglina	CCL2, 3, 4, 5, 7, 20, 26
FGF-1	CD44	CX3CL1
Angpt-1,-2		CXCL5
SDF-1		CXCL11
BMP-2	INTEGRINAS	CXCL1
IFN-g	$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6$	CXCL8
TNF	A α	CXCL12
MIP-1 ^a	Av	CXCL2
OPG	$\beta 1, \beta 3, \beta 4, \beta 5$	CXCL10
IGFBP-2		

Entre las moléculas que producen las MSCs se encuentran citocinas, moléculas de la MEC, moléculas de adhesión e integrinas importantes para su interacción con células hematopoyesis (Flores-Figueroa et al, 2006; Overstraeten-Schlogel et al, 2006; Petrini et al, 2009; Da Silva et al, 2008; Sorrentino et al 2008; Wagner et al, 2008 b, Docheva et al, 2008).

Dentro de los componentes del nicho vascular se encuentran las células CAR, que en modelos murinos, se originan de una subpoblación de MSCs CD146+ (molécula

de adhesión) que también producen células del nicho endosteal (Nagasawa et al, 2011).

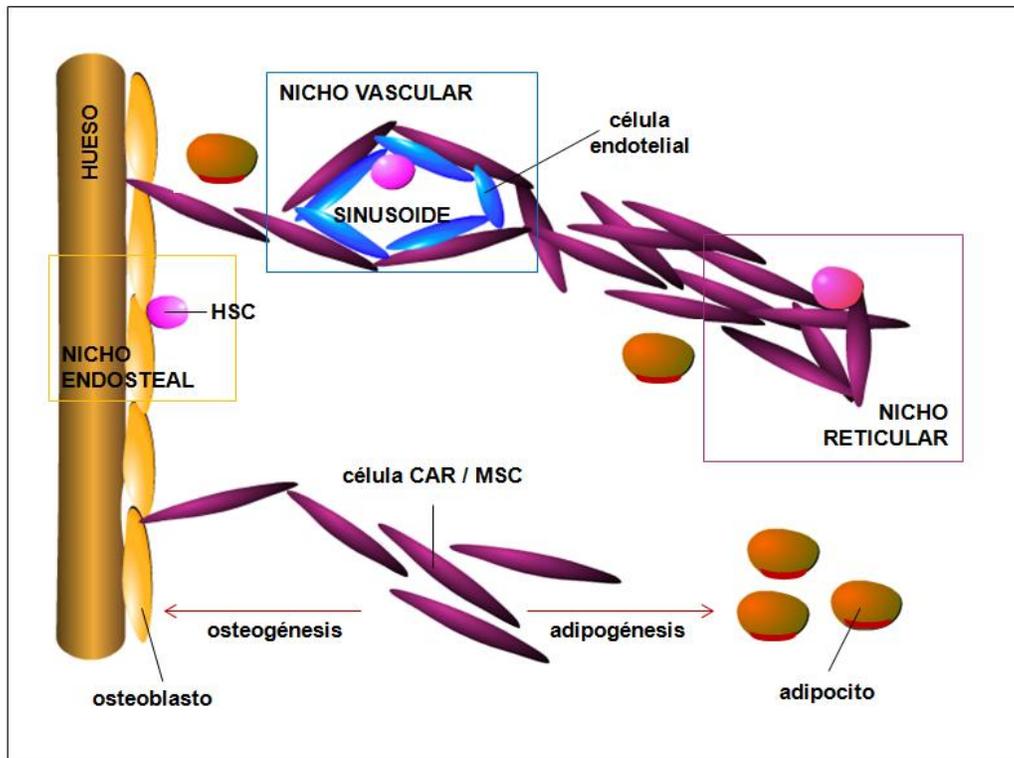


Figura 6. Modelo de la localización y participación de las MSCs dentro de los nichos de HSCs en la MO de ratón. Nicho endosteal, formado principalmente por osteoblastos. Nicho vascular, formado por células endoteliales de los sinusoides venosos. Nicho de células CAR originadas a partir de MSCs. Las MSCs se encuentran presentes en los tres nichos y presentan la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos y adipocitos. Modificado de Nagasawa et al, 2011.

En el mismo nicho endosteal, MSCs producen moléculas como CXCL12, osteopontina y N-cadherina involucradas en el mantenimiento de las HSCs, así como moléculas que mantienen su quiescencia como Ang-1 y TPO (Nakamura et al, 2010; Wilson et al, 2009). La secreción de CXCL12 a partir de MSCs humanas es un evento dependiente del contacto MSC-HSC, necesario para que las MSCs realicen la función de mantenimiento de las HSCs (Schajnovitz et al, 2011). Las MSCs también producen moléculas como SCF y Flt-3L (Ligando del receptor tirosina cinasa parecido a c-fms

tipo 3) que favorecen el mantenimiento y expansión de las HSCs, así como citocinas involucradas en el proceso de compromiso y maduración de las células hematopoyéticas (IL-6, IL-3 y el factor estimulador de colonias de monocitos y macrófagos: M-CSF por sus siglas en inglés; Flores-Figueroa et al 2006).

Las MSCs además pueden interactuar con células hematopoyéticas primitivas mediante el contacto célula-célula a través de otras moléculas de adhesión como VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular), ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular-1), ICAM-2, ALCAM (molécula de adhesión celular de linfocito activado), L-selectina, LFA-3 (antígeno asociado a la función leucocitaria), CD44 e integrinas- β 1 (CD29; Wang et al, 1998; Gottschling et al, 2007; Wagner et al, 2008 a).

Las integrinas- β 1, especialmente VLA₄ y VLA₅, juegan un papel vital en la interacción temprana de las HSCs con su nicho en la MO (Texidó et al, 1992; Voura et al, 1997; Papayannopoulou et al, 2001), además están involucradas en la proliferación, sobrevivencia, crecimiento clonogénico y mantenimiento de HPCs durante su cultivo ex-vivo (Hurley et al, 1995; Yokota et al, 1998; Schofield et al, 1998) y son necesarias para el homing e injerto de las HSCs y HPCs en modelos murinos (Brakebusch et al, 2002; Bungartz et al, 2006). Se ha visto que las MSCs de humano son capaces de reclutar HSCs dentro del ciclo celular y acelerar sus cinéticas de división sin la pérdida de la función de célula troncal, la inducción de la autorrenovación de las HSCs mediante integrinas- β 1 se debe a un mecanismo dependiente del contacto MSC-HSC (Gottschling et al, 2007).

Las MSCs también producen Nestina, una proteína de filamento intermedio que fue originalmente identificada como un marcador de células progenitoras neurales, aunque su expresión ha sido detectada en células embrionarias, células progenitoras multipotentes (Wiese et al, 2004), células progenitoras de células satélite de músculo esquelético y células endoteliales (Day et al, 2007). Se ha observado una población de MSCs Nestina+ que tienen una distribución perivascular y están espacialmente asociadas con el mantenimiento de HSCs (Ehninger et al, 2011; Mendez-Ferrer et al, 2010). Mediante análisis inmunohistoquímicos, se ha detectado en modelos murinos una población de células Nestina-GFP+ que constituye aproximadamente el 0.044% de las células nucleadas de la MO, que tienen una distribución perivascular y que adyacentes a ellas se encuentran HSCs, además se observó que células CD45-

Nestina-GFP+ tienen una mayor expresión de RNAm para CXCL12 y SCF que células CD45- Nestina-GFP- (Nagasawa et al, 2011). La depleción de células que expresan Nestina disminuye el número de HSCs en ratones, esto indica la posibilidad que células Nestina+ están involucradas en la retención de las HSCs en la MO (Nagasawa et al, 2011). Dentro de las células Nestina-GFP+ se encuentran células que forman CFC-F y que se pueden diferenciar hacia adipocitos y osteoblastos, lo que podría indicar que un importante número de ellas son MSCs (Mendez-Ferrer et al, 2010; Nagasawa et al, 2011).

Dentro de las proteínas de la MEC que producen las MSCs se encuentran la colágena tipo I, III, IV y VI, fibronectina, laminina, osteopontina y proteoglicanos, moléculas importantes en el mantenimiento de la quiescencia de las HSCs (Gottschling et al, 2007).

6. FUENTES ALTERNATIVAS PARA LA OBTENCIÓN DE MSCs

La principal fuente de MSCs es la MO, ya que fue el primer sitio en donde se localizaron y a partir del cual se han caracterizado, en este órgano las MSCs constituyen un bajo porcentaje que fluctúa entre el 0.001% y hasta el 0.01% de las células mononucleares (CMNs) obtenidas por gradiente de densidad (Pittenger et al, 1999).

Las MSCs también se han localizado y obtenido a partir de otros tejidos y órganos provenientes de modelos animales y de humano. Entre las diferentes fuentes de MSCs se encuentran tejidos u órganos en etapa adulta como el tejido adiposo (Gronthos et al, 2001), sangre periférica de individuos normales (Zvaifler et al, 2000), sangre periférica movilizada (SPM) de pacientes con cáncer de mama (Fernández et al, 1997), pulmón (in `t Anker et al, 2003), músculo esquelético (Williams et al, 1999), hueso trabecular (Sottile et al, 2002) y pulpa dental (Miura et al, 2003).

También se ha reportado la obtención de MSCs a partir de fuentes fetales como sangre, MO, hígado y bazo (Campagnoli et al, 2001; in `t Anker et al, 2003). Así como de tejidos extra-embrionarios como sangre de cordón umbilical (Erices et al, 2000; Montesinos et al, 2009), placenta (Mariotti et al 2008; Montesinos et al, 2009),

vellos coriónicos de la placenta (Igura et al 2004), fluido amniótico (Tsai et al, 2004), vena de cordón umbilical (Panepucci et al, 2004) y gelatina de Wharton (Wang et al, 2004 a).

La obtención de MSCs a partir de MO presenta ciertas desventajas tales como que su obtención es un método invasivo y doloroso para el donador y que su número y calidad (potencial de proliferación y capacidad de diferenciación), disminuyen conforme incrementa la edad del mismo y puede variar incluso cuando son obtenidas en más de una ocasión a partir del mismo donador (Phinney et al, 1999; D'ippolitto et al, 1999; Romanov et al, 2003). Por otro lado, la obtención de MSCs a partir de fuentes alternativas a la MO, particularmente las fuentes extra-embionarias tiene ventajas ya que su obtención no ocasiona algún riesgo para los donadores (madre o recién nacido), no se desgasta algún órgano funcional de los mismos, ya que después del parto son desechos biológicos, presentan un menor riesgo de transmisión viral y tienen un fácil proceso de obtención. Las MSCs obtenidas de fuentes alternativas a la MO cumplen las medidas estándares que definen a las MSCs, tales como su capacidad de adhesión al plato de cultivo, una morfología fibroblastoide, la expresión de marcadores característicos de MSCs y la capacidad de diferenciación hacia el linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico. No obstante, en la mayoría de los casos falta analizar muchas de sus características funcionales, por lo que no se sabe si las MSCs de fuentes alternativas pueden reemplazar a las provenientes de MO dentro del campo de la terapia celular.

ANTECEDENTES

1. PAPEL DE LAS MSCs EN LA EXPANSIÓN IN VITRO DE HPCs

Para la expansión in vitro de HSCs y HPCs con el fin de incrementar su número para usarlas en trasplantes de células hematopoyéticas, se han usado diferentes citocinas como SCF, FL, TPO, IL-6, IL-3, sin embargo, la óptima combinación y concentración de citocinas para preservar el estadio primitivo, aún no ha sido establecido. Tal como sucede dentro de la MO, el cultivo ex vivo de HSCs y HPCs requiere de un microambiente complejo, rico en citocinas, moléculas de la MEC y el contacto célula-célula para obtener mejores resultados en su expansión.

Debido a que las MSCs tienen un papel primordial no solo en la formación de células estromales de la MO, sino también en la producción y expresión de moléculas importantes en el nicho de las HSCs (Il-hoan et al, 2010; Nagasawa et al, 2011), se han utilizado para expandir in vitro a las HSCs y HPCs. De esta manera, por muchos grupos ha sido demostrado que tanto el uso de MSCs como el de diferentes cocteles de citocinas, incrementan la expansión ex vivo de HPCs (Robinson et al, 2005; 2006; McNiece et al, 2004; Kadereit et al 2002; Wagner et al, 2007 a y b; 2008 a; Walenda et al, 2010; Zhang et al, 2006; Pineault et al, 2010; De Haan et al, 2003; Zhang et al, 2008) incluso, que el incremento es mayor en presencia de ambos componentes en comparación con la expansión en presencia de MSCs o de citocinas de manera individual (Walenda et al, 2011).

Uno de los primeros experimentos en los que se usaron MSCs como capa estromal con el fin de favorecer la expansión de HPCs, fue en cultivos para determinar la proliferación y expansión de células hematopoyéticas a partir de CMNs de SCU, que resultó en un incremento de 10 a 20 veces del total de células nucleadas, de 7 a 18 veces la expansión de células progenitoras comprometidas (células formadoras de colonias de granulocitos y monocitos; CFC-GM) y de 2 a 5 veces la expansión de células progenitoras primitivas (progenitores con alto potencial proliferativo; HPP por sus siglas en inglés), así como de 16 a 37 veces la expansión de células CD34+, todo esto en presencia de citocinas (SCF, G-CSF y GM-CSF a 100ng/ml cada una) al día 14 de cultivo (McNiece et al, 2004).

Otros grupos comenzaron a expandir HPCs a partir de poblaciones más homogéneas y primitivas, obteniendo un mayor incremento en el número de células hematopoyéticas, como es el caso de Magin y colaboradores en 2009, quienes usaron una población enriquecida mediante selección positiva en células CD34+ a partir de SCU. Se observó un incremento en la proliferación de células nucleadas totales de 30 a 60 veces, la expansión de CFC de 20 a 40 veces y las células formadoras de áreas de adoquines (CAFC por sus siglas en inglés) fue de 10 a 50 veces, esto en presencia de citocinas (50ng/ml de SCF, 50ng/ml de FL, 20ng/ml de TPO y 10ng/ml de IL-3) al día 7 de cultivo (Magin et al, 2009).

Otros investigadores, incluso, han utilizado un sistema para inhibir el contacto MSCs-HPCs mediante el uso de una membrana transwell con poros de 0.45um, con el fin de determinar la importancia del contacto célula-célula, como es el caso de Lia Na y colaboradores en 2007, quienes usaron una población enriquecida mediante selección positiva en células CD34+ a partir de SPM. Las condiciones que usaron en los cultivos fueron en presencia de MSCs en contacto o sin contacto con las HPCs ó con medio condicionado de MSCs. En cultivos en presencia de medio condicionado y cultivos en donde se inhibió el contacto MSCs-HPCs, no se encontraron diferencias significativas en la proliferación y expansión de HPCs en comparación con cultivos sin MSCs. Mientras que en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, resultó en un incremento de 242 ± 45 veces el número de células nucleadas totales, 126 ± 16 veces el número de CFC, 6.3 ± 1.6 veces el número de las CAFC y 92 ± 31 veces el número de células CD34+, al día 14 de cultivo. Lo que sugiere que los factores involucrados en el contacto célula-célula producidos por las MSCs, tienen un papel primordial en la expansión de HPCs, aún en presencia de citocinas exógenas (50ng/ml de SCF, 50ng/ml de FL y 10ng/ml de TPO; Lia Na et al, 2007).

El Dr. Mayani y colaboradores en 2009, desarrollaron un protocolo para la expansión de HPCs in vitro, en donde utilizan una población más primitiva enriquecida mediante selección negativa en células CD34+CD38-Lin- de SCU. Las condiciones fueron en presencia de MSCs en contacto y sin contacto con las HPCs y en presencia de citocinas importantes en el mantenimiento de células primitivas; SCF, TPO, FL e IL-6; 10ng/ml cada una. Sus resultados mostraron que cultivos de HPCs en contacto con las MSCs, incrementó la proliferación de células nucleadas totales 100 veces, en

cultivos únicamente con citocinas fue de 440 veces, e interesantemente, en presencia de ambas condiciones (contacto con MSCs y citocinas) el incremento fue significativamente mayor (2500 veces) en comparación con cultivos en condiciones por separado, indicando un efecto sinérgico. El número de CFC y de células CD34+ en presencia de MSCs no incrementó, mientras que con citocinas se observó un incremento de CFC mieloides de 16 veces. En presencia de ambas condiciones, el incremento fue de 360 veces el número de CFC mieloides, 30 veces el número de CFC eritroides y 40 veces en el número de células CD34+. La proliferación de células fue significativamente mayor en cultivos de HPCs en contacto con las MSCs que en cultivos en donde se inhibió el mismo, encontrando sólo un incremento de 20 a 100 veces en el número de CFC y de 9 veces en el número de células CD34+ (Flores-Guzmán et al, 2009). Mostrando que tanto los factores solubles y principalmente los involucrados en el contacto célula-célula producidos por las MSCs, tienen un papel primordial en la expansión de HPCs, aún en presencia de citocinas.

2. PAPEL DE LAS MSCs EN EL TCH

En enfermedades hematológicas como anemias, leucemias y mielomas, uno de los principales tratamientos con fines curativos es el TCH, en donde el éxito del mismo depende del número de células trasplantadas y de su capacidad para injertar. Sin embargo, aunque en algunos casos el uso de HSCs y HPCs expandidas in vitro en presencia de citocinas ha favorecido el TCH, no ha sido suficiente para incrementar el número de células necesarias y mejorar su injerto (Kelly et al, 2009).

Se ha reportado que las MSCs favorecen el injerto y el mantenimiento de las HSCs, así como una recuperación hematopoyética más rápida tanto en modelos murinos como en pacientes trasplantados con células hematopoyéticas (Noort et al, 2002; Ball et al, 2007; 2008; Le Blanc et al 2007; Meuleman et al, 2009). Un ejemplo de esto, es un estudio que se realizó comparando 14 pacientes a los cuales se les trasplantó MSCs autólogas de forma intra-venosa (en promedio 1.6×10^6 MSCs/kg de peso, en un rango de 1×10^6 a 3.3×10^6 /kg de peso), 4 horas previas al trasplante de células CD34+ de SPM (en promedio 21.5×10^6 /kg de peso, en un rango de 11.6×10^6 a 38.6×10^6) en

comparación con 47 pacientes sometidos a las mismas condiciones de trasplante sin MSCs. De los 47 pacientes sometidos a TCH en ausencia de MSCs, 7 presentaron un primero o segundo rechazo en el injerto, mientras que en todos los pacientes con previo trasplante de MSCs, el injerto fue aceptado. Además, la recuperación en el número de neutrofilos y plaquetas fue mucho más rápida en pacientes tratados con MSCs en comparación con pacientes sin tratar con MSCs (siendo en un rango de 10 a 17 días vs 9 a 29 días para neutrofilos y un rango de 9 a 18 días vs 9 a 100 días para plaquetas). Los pacientes que recibieron MSCs tuvieron una recuperación en el número de leucocitos totales significativamente más rápida (11.5 días vs 14.5 días). Cuatro de los 14 pacientes trasplantados con MSC murieron, 2 por recaídas y 2 por infección, mientras que de los 47 pacientes controles murieron 11, 7 por recaída, 2 por infecciones y 2 por desarrollo de enfermedad de injerto contra hospedero (EICH). Las MSCs trasplantadas no produjeron alguna reacción toxica en los pacientes (Ball et al, 2007).

Cabe mencionar que en los pacientes con enfermedades hematológicas, el estroma de la MO también sufre un daño importante y prolongado por las altas dosis de quimioterapia y regímenes mieloablativos. Galotto y colaboradores en 1999, observaron una pérdida en la frecuencia de CFC-F que va del 60% al 90% en pacientes trasplantados con células hematopoyéticas de MO y que después de 12 años del trasplante no se ha recuperado la frecuencia de las mismas, la pérdida de CFC-F correlaciona además con la disminución significativa de la densidad mineral ósea y de los niveles de LTC-IC (Galotto et al, 1999). Por lo que además de incrementar el número de HSCs y HPCs, ha sido necesario reconstituir el sistema estromal de la MO después de un tratamiento ablativo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las MSCs de MO representan una herramienta promisorio para su uso en el campo de la terapia celular, particularmente en el TCH, ya que es un importante componente del nicho de las HSCs dentro de la MO y se ha demostrado que favorecen la expansión de HPCs in vitro, el homing e injerto de las HPCs in vivo, así como una recuperación hematopoyética más rápida en pacientes sometidos a TCH. Sin embargo, la obtención de MSCs a partir de la MO presenta desventajas, dado que su obtención es dolorosa e invasiva para el donador y el número y potencial de proliferación y diferenciación de las MSCs disminuye conforme incrementa la edad del mismo. En nuestro grupo de investigación hemos obtenido MSCs de SCU y PL como fuentes alternativas y demostramos que presentan algunas características biológicas similares con las MSCs de MO (Fajardo 2008, Tesis licenciatura; Montesinos et al, 2009). No obstante, desconocemos si las MSCs de SCU y PL tienen la misma capacidad de mantener la formación in vitro de HPCs que las MSCs de MO, de ser así, las MSCs de SCU y PL se pudieran utilizar en el TCH y favorecer una recuperación hematopoyética más rápida en pacientes con enfermedades hematológicas. Por lo que en este trabajo, decidimos investigar si las MSCs de SCU y PL presentan la misma capacidad de mantener la formación in vitro de HPCs que las MSCs provenientes de MO.

HIPÓTESIS

Las MSCs de SCU y PL tendrán la misma capacidad de mantener la formación in vitro de HPCs que las MSCs de MO.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar y comparar la capacidad de las células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea, sangre de cordón umbilical y placenta, para mantener la formación in vitro de células progenitoras hematopoyéticas de SCU.

Objetivos particulares

- Determinar la capacidad de las MSCs provenientes de MO, SCU y PL para mantener la proliferación de células hematopoyéticas a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.
- Determinar la capacidad de las MSCs provenientes de MO, SCU y PL para mantener la formación de CFC, a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.
- Determinar la capacidad de las MSCs provenientes de MO, SCU y PL para mantener la formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-, a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.
- Determinar la capacidad de las MSCs provenientes de MO, SCU y PL para mantener la formación de LTC-IC, a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.

METODOLOGÍA

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE MO, SCU Y PL

Las muestras de MO de sujetos sanos fueron obtenidas de donadores para trasplantes alogénicos, a través de un aspirado de MO en la cresta ilíaca postero – superior con previa anestesia local, en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional SXXI, IMSS y en el Hospital Regional No.2 Villa Coapa, IMSS.

Las muestras de SCU y PL fueron obtenidas de partos a término ó cesáreas del Hospital Regional de Zona 2A Troncoso, IMSS. Una vez liberada la placenta con el cordón umbilical, la sangre se colectó en una bolsa de colección con anticoagulante, pinchando la vena umbilical con una aguja. Para obtener las muestras de PL, se cortó un trozo de amnios y corion cercano al cordón umbilical y se colocó en un tubo con 20 ml de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium, Gibco, Carlsbad, USA) adicionado con penicilina-estreptomocina y gentamicina (10ul/ml; 10,000unidades/ml; Gibco, Carlsbad, USA). Todas las muestras se obtuvieron bajo los estándares éticos de los hospitales correspondientes.

2. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LAS MSCs

Tanto los aspirados de MO como la SCU y PL colectadas se procesaron en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. Para obtener las MSCs de MO, el aspirado se diluyó 1:1 con buffer de fosfatos (PBS pH 7.4, Gibco, Carlsbad, USA) y sometido a un gradiente de densidad (<1.077 g/ml) Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suiza). Agregando 5ml de Ficoll en un tubo de 15 ml (Corning, Inc. Costar, New York, USA) y de 3 a 5 ml del aspirado diluido, se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 min. Se tomó el anillo de células mononucleares (CMNs) y se lavaron con PBS centrifugando a 1200 rpm por 8 min. El botón celular se resuspendió en 1 ml de medio para MSCs (DMEMlg: Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Carlsbad, USA). Suplementado con 10% de SFB (Serum Fetal Bovine, Gibco, Carlsbad, USA); 10 µl/ml de penicilina-estreptomocina, 10 µl/ml de gentamicina y 10 µl/ml de L-glutamina (200mM: Gibco, Carlsbad, USA). El

número de células nucleadas y la viabilidad celular se determinó con un hemocitómetro usando solución de Turk (ácido acético diluido 1:3, el cual rompe las membranas celulares y expone los núcleos de las células) y azul de tripano (Gibco BRL, New York, USA) respectivamente. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^6 de CMNs/cm² en una caja petri de 100 mm (Corning) en presencia de 10 ml de medio para MSCs, y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Las MSCs se obtuvieron mediante selección por adhesión, la cual consistió en cultivar a las CMNs durante 24 hrs en medio de cultivo para MSCs, posteriormente, se desecharon las células no adherentes, se hicieron dos lavados con PBS a la caja petri y se adicionó 10 ml de medio para MSCs. La caja se incubó a 37°C con 5% de CO₂ y siete días después se observó bajo el microscopio para determinar la presencia de CFC-F.

Para la obtención de MSCs de SCU, se aislaron las CMNs por un gradiente de densidad usando Ficoll-Paque Plus, una vez obtenido el anillo de CMNs se lavaron con PBS centrifugando a 1200 rpm por 8 minutos. El botón celular se resuspendió en 1 ml de medio para MSCs con 8 µl/ml de una combinación de 4 antibióticos (Ciprofloxacina 100 mg/ml, 200 mg/100 ml; Gentamicina 20 mg/ml, 50 mg/ml; Vancomicina 200 mg y Eritromicina 200 mg), se determinó la viabilidad celular con azul de tripano y el número de células nucleadas con diluyente de Turk. Las células se cultivaron en cajas petri de 100 mm a una concentración de 1×10^6 a 2×10^6 /cm² y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Cuatro días después, se desechó el medio de cultivo con las células no adherentes, se realizó dos lavados con PBS a la caja y se adicionó medio de cultivo fresco, esta se incubó una vez más y siete días después se observó bajo el microscopio para determinar la presencia de CFC-F.

Para la obtención de MSCs de PL, se cortó una parte de amnios y corion cercana al cordón umbilical, se lavó el tejido con PBS y se cortó en trozos pequeños, se adicionó el tejido a un matraz erlenmeyer de 50 ml con la presencia de un agitador magnético, se agregó 15 ml de tripsina (Trypsina-EDTA 0.05%, Gibco) y se colocó el matraz en baño maría a 37°C durante 15 min. Posteriormente se filtró la suspensión con una maya de nylon y se adicionó 1 ml de SFB. Se centrifugó a 1200 rpm por 8 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio para MSCs. Se realizó el conteo celular con diluyente de Turk y se analizó la viabilidad con azul de tripano. Las células se sembraron en una caja petri de 100 mm

a una densidad de $1 \times 10^6 \text{ cm}^2$ y se incubó a 37°C con 5% de CO_2 . Cuatro días después, se desechó el medio de cultivo con las células no adherentes, se realizaron dos lavados con PBS a la caja y se adicionó medio de cultivo fresco, esta se incubó a 37°C con 5% de CO_2 . Cuatro días después se observó la caja de cultivo bajo el microscopio para determinar la presencia de CFC-F.

Una vez que las CFC-F provenientes de MO, SCU y PL llegaron al 80% de confluencia, las células se despegaron de la caja de cultivo, adicionando 5 ml de tripsina y se incubó durante 5 min, posteriormente se adicionó 500 μl de SFB para inactivar a la tripsina. Las células se pasaron a un tubo de 15 ml, se hizo un lavado con PBS a la caja, se adicionó al mismo tubo, se centrifugó a 1200 rpm por 6 min y el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio para MSCs. Las células obtenidas de este primer cultivo correspondieron a la resiembra cero (R0), las MSCs obtenidas de la R2 se utilizaron para analizar su inmunofenotipo, morfología y capacidad de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos; mientras que las MSCs obtenidas de la R3 se utilizaron para analizar su capacidad de mantener la formación de HPCs.

3. MORFOLOGÍA DE LAS MSCs

Para determinar la morfología de las MSCs, se sembraron a una densidad de $1.03 \times 10^3/\text{cm}^2$ en una caja petri de 100 mm con medio de cultivo para MSCs, cuando las células llegaron a una confluencia del 70% se desechó el medio de cultivo, se adicionó PBS por 10 min, posteriormente se desechó y se tiñó con Azul de Toluidina al 1% durante 40 min. La caja se lavó con agua destilada y se dejó secar. Posteriormente se observó bajo el microscopio y se contaron los diferentes tipos celulares de acuerdo a su morfología, se contaron 20 campos al azar por caja.

4. INMUNOFENOTIPO DE LAS MSCs

Para conocer el inmunofenotipo de las MSCs obtenidas, se analizó la expresión de algunos antígenos de superficie mediante citometría de flujo en un citometro FACS Calibur (Becton-Dickinson). Se incubaron las células en SFB durante

20 min a 4°C para bloquear los receptores Fc, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, se resuspendieron a una concentración de 1×10^5 MSCs en 50 μ l de PBS al 2% de SFB y EDTA 1mM y se incubaron durante 30 minutos 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-CD105-PE, anti-HLA-DR-PE (todos de Caltag Laboratories, Burlingame, CA); anti-CD49b-PE, anti-CD73-PE, anti-CD166-PE, anti-HLA-ABC-FITC, anti-CD10-FITC, anti-HLA-ABC-PE (todos de Beckton Dickinson/PharMingen, San Jose, CA, USA), anti-CD90-FITC (Immunotech, Marseille, France) y anti-CD133 (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Después de la incubación con los anticuerpos, se fijaron las células con 250 μ l de FACS Lysing Solution 1x al 10% y se mezcló en un vortex, se incubaron por 10 min en oscuridad a 4°C. Se agregó 1 ml de PBS, se mezcló en un vortex y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante de un solo movimiento, se agregó 200 μ l de PBS y se mezcló en un vortex por última vez, las preparaciones se taparon y se incubaron en oscuridad a 4°C hasta su adquisición en el citómetro. Se incluyeron los controles de autofluorescencia y los correspondientes al isotipo de acuerdo al anticuerpo primario IgG1a-FITC, IgG1a-PE (Santa Cruz), IgG1a-APC (Caltag Laboratories). Las células marcadas se analizaron contando un mínimo de 10,000 eventos en el citómetro. El análisis de la citometría se llevó a cabo con el programa FlowJo 7.6.1.

5. CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS MSCs

5.1 INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA

Las MSCs se cultivaron a una concentración de 2.38×10^3 / cm^2 en cámaras Lab-Tek II (Chamber Slide System, Nalge Nunc Inter, USA) con medio para MSCs o en presencia de medio de diferenciación osteogénica (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco) adicionados con 10 μ l/ml de penicilina-estreptomina y 10 μ l/ml de gentamicina (10,000 unidades/ml) durante 2 semanas y se realizaron cambios de medio cada 3 o 4 días. La detección de la diferenciación se realizó mediante la tinción de Von Kossa. Al término del cultivo, se desechó el sobrenadante

y se adicionó PBS durante 10 min. Se desechó el PBS y se colocó nitrato de plata dejando reposar y expuesta a la luz durante 3 horas. La capa celular se lavó con agua destilada y se adicionó hiposulfito de sodio al 5% durante 1 min. Se lavó con agua destilada y se contrastó con azul de toluidina al 1% por 1 min. Se deshidrató con diferentes concentraciones de etanol (al 80%, 90% y absoluto) y xilol grado histológico y se montaron las laminillas con resina. Para determinar la positividad, se analizó la cámara de cultivo bajo el microscopio, los depósitos de calcio se tiñeron de color café a negro.

5.2 INDUCCIÓN ADIPOGÉNICA

Las MSCs se cultivaron a una concentración de 2.38×10^3 / cm^2 en cámaras Lab-Tek II con medio de cultivo para MSCs o en presencia de medio de diferenciación adipogénica (StemPro Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco) durante 2 semanas y se realizó un cambio de medio por semana. La detección de la diferenciación adipogénica se realizó con la tinción de Rojo Oleoso. Al término del cultivo, se desechó el sobrenadante y se adicionó PBS durante 10 min. Se desechó el PBS y la capa celular se fijó con formalina buffer al 10% durante 1 hora. Se adicionó isopropanol al 60% durante 5 min y posteriormente se adicionó Rojo Oleoso por 20 min. Se lavó con agua destilada, las laminillas se montaron con propilenglicol. Para determinar la positividad, se analizó la cámara de cultivo bajo el microscopio, los lípidos se tiñeron de color rojo.

5.3 INDUCCIÓN CONDROGÉNICA

2.5×10^5 MSCs en 500 μl de medio de diferenciación condrogénica (Bullet Kit Chondrogenic Differentiation, Lonza) se colocaron en un tubo de 15 ml de polipropileno, las células se centrifugaron durante 5 min a 900 rpm para formar una micromasa al fondo del tubo, este procedimiento se repitió tres veces, en la tercera ocasión se adicionó al tubo 10 ng/ml de TGF- β 3 (Peprotech). Las micromasas se cultivaron por 4 semanas y se realizaron cambios de medio cada 4 días. El medio condrogénico consiste en medio basal de diferenciación condrogénica suplementado

con dexametasona, piruvato de sodio, prolina, suplemento ITS⁺, ascorbato, penicilina/streptavidina y L-glutamina y durante el tiempo de cultivo se adicionó 10 ng/ml de TGF-β3. Al término del cultivo se desechó el medio, se fijó la micromasa con formaldehído, se deshidrató en diluciones de etanol (al 80%, 90% y absoluto) y se realizó el aclaramiento con xilol grado histológico durante 30 min con dos repeticiones cada una. La micromasa se embebió en parafina y se hicieron cortes histológicos en un microtomo. La detección de la diferenciación condrogénica se realizó con las tinciones de Azul Alciano para observar la positividad a mucopolisacaridos y con Tricrómico de Masson para determinar la presencia de colágena.

6. OBTENCIÓN DE LA POBLACIÓN ENRIQUECIDA EN CÉLULAS CD34+CD38-LIN- DE SCU

A partir de las muestras de SCU, se aislaron las CMNs por un gradiente de densidad usando Ficoll-Paque Plus. Una vez obtenido el anillo de CMNs, se lavaron dos veces con 10 ml de PBS centrifugando a 1200 rpm por 5 minutos. El botón celular se resuspendió en medio RPMI suplementado con 10% de SFB y con 10 µl/ml de penicilina-estreptomicina y 10 µl de gentamicina. Se determinó la viabilidad celular con azul de tripano y el número de células nucleadas con diluyente de Turk. Las células se cultivaron en cajas petri de 100 mm a una densidad de 2×10^6 a 2.5×10^6 CMN/cm² y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Un día después se enriqueció la población CD34+CD38-Lin-.

El enriquecimiento de la población CD34+CD38-Lin- a partir de las CMNs fue mediante selección negativa utilizando el sistema StemSep (Stem Cells Technologies, Inc., Vancouver, Canadá), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, de 80×10^6 a 120×10^6 de CMNs en 1 ml de medio con sustituto de suero (Stem Line; Sigma) se incubaron con un coctel de anticuerpos dirigidos contra moléculas de superficie (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD36, CD38, CD45RA, CD56, CD66b y glicoforina A). Seguida de una segunda incubación con un coloide magnético (15 min a temperatura ambiente para cada incubación). Después de la segunda incubación, la suspensión celular fue colocada en una columna magnetizada, a la que previamente se humedeció pasando 10 ml de PBS con 5% de

SFB. Una vez colocadas las células en la columna, se lavó con 10 ml de PBS con 5% de SFB, las células que salieron de la columna se recuperaron en un tubo de plástico de 15 ml, se centrifugaron a 1200 rpm durante 8 min, se resuspendieron en medio de cultivo Stem Line y se evaluó la viabilidad celular con azul de tripano y el número de células nucleadas con diluyente de Turk. Posteriormente, se analizó el porcentaje de células CD34+CD38-Lin- mediante citometría de flujo, se realizaron ensayos de CFC y LTC-IC.

7. CO-CULTIVO DE LAS MSCs CON LA POBLACIÓN ENRIQUECIDA EN CÉLULAS CD34+CD38-LIN-

1,500 MSCs /cm² de MO, SCU o PL obtenidas de la R3 se sembraron en placas de 6 pozos (Corning, Inc. Costar, New York, USA) en presencia de medio de cultivo para MSCs, una vez que las células llegaron a una confluencia del 70%, se adicionó 0.3 µg/ml de mitomicina C (Mitolem, Lemery), agente quimioterapéutico que se incorpora al ADN de las células durante su replicación, formando uniones covalentes en las cadenas complementarias, evitando síntesis posteriores de ADN (Humeau et al, 1996). Después de 18 a 24 horas, se desechó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados suaves con PBS sobre las capas celulares. Una vez estando listas las capas de MSCs provenientes de las tres fuentes, se sembraron las células previamente enriquecidas en la población CD34+CD38-Lin- de SCU, a una densidad de 1x10⁵ células/pozo, en presencia de 3 ml de medio de cultivo Stem Line con 10 µl/ml de penicilina-estreptomicina y 10ul/ml de gentamicina. Los cultivos se realizaron en las siguientes condiciones: 1) control; en ausencia de citocinas, 2) en presencia del coctel seminal (SCF, TPO, FL e IL-6), 3) en presencia del coctel mixto (SCF, TPO, FL, IL-6, IL-3, G-CSF y GM-CSF, todas a una concentración de 10 ng/ml). Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto célula-célula ó inhibiendo el mismo mediante la presencia de una membrana de nitrocelulosa de 4 µm (Falcon, BD). Todas las condiciones de cultivo tuvieron su respectivo control en ausencia de MSCs. Se realizaron cambios de medio (se desechó 1.5 ml de medio y se reemplazó 1.5 ml de medio fresco) cada semana hasta el día 28. A los días 14 y 28 de cultivo se analizó la proliferación de las células hematopoyéticas, se analizó el porcentaje de células

CD34+CD38-Lin- mediante citometría de flujo y se realizaron ensayos de CFC y LTC-IC (Figura 1).

METODOLOGÍA

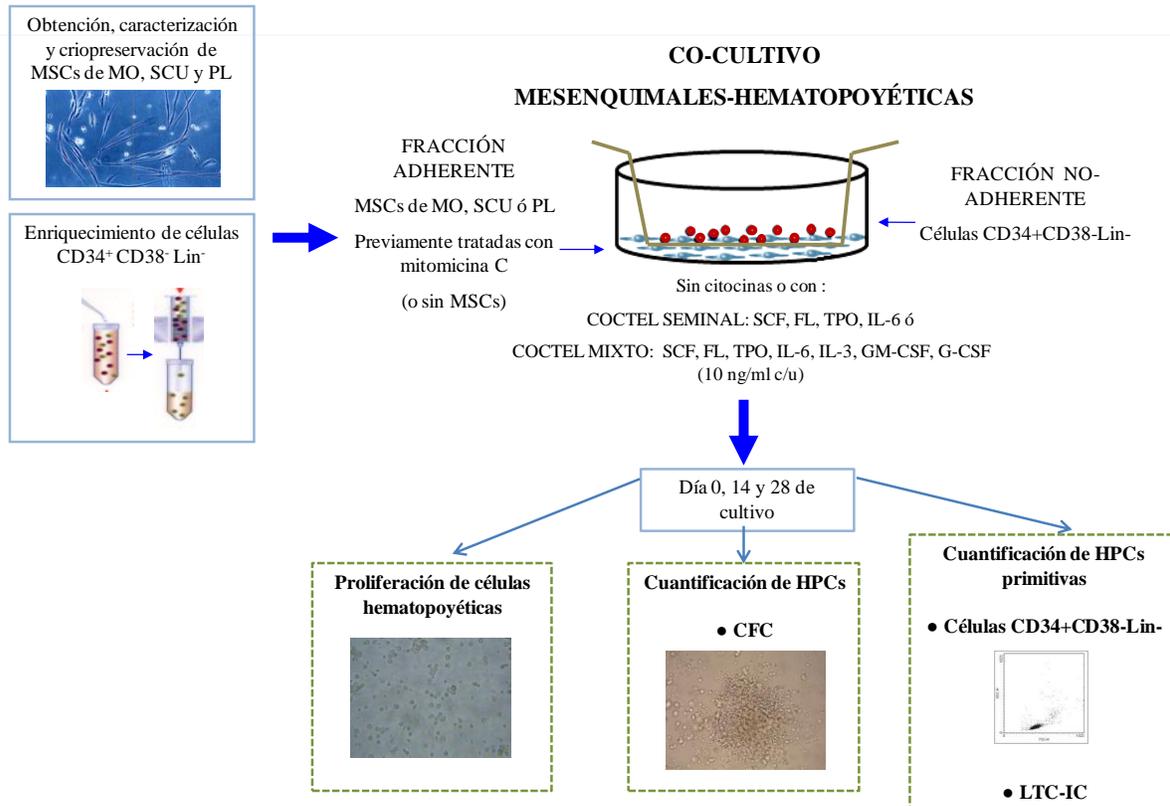


Figura 1. Diagrama de flujo del co-cultivo MSC-HPC y cuantificación de células hematopoyéticas.

8. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE LA POBLACIÓN ENRIQUECIDA EN CÉLULAS CD34+CD38-Lin-

El análisis de la proliferación de las HPCs, se realizó mediante el conteo de células nucleadas totales con solución de turk en un hemocitometro y con la ayuda de un microscopio invertido.

9. CUANTIFICACIÓN DE LAS HPCs MENOS PRIMITIVAS

9.1 ENSAYO DE CÉLULAS FORMADORAS DE COLONIAS (CFC)

Para conocer la cantidad de HPCs que se originaron a partir de las células hematopoyéticas CD34+CD38-Lin- cultivadas en presencia o en ausencia de MSCs, se realizaron cultivos semi-sólidos en metilcelulosa (medio de cultivo; StemCell Technologies, Inc.) de las células hematopoyéticas obtenidas de dichos co-cultivos. El medio de cultivo semi-sólido consistió de metilcelulosa con 30% de SFB, 1% de albúmina sérica bovina, 2-mercaptoetanol 10^{-4} mM, L-glutamina 2 mM, 50 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de IL-3, 10 ng/ml de GM-CSF y 3 UI/ml de Epo. En primera instancia, 1×10^3 células de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, se sembraron en 500 μ l de metilcelulosa antes descrita. A los días 14 y 28 de cultivo en ausencia o presencia de MSCs, se sembraron 2,000 y 5,000 células hematopoyéticas obtenidas de dichos cultivos respectivamente. Después de 14 días de cultivo, se contaron las colonias hematopoyéticas formadas observando el cultivo bajo un microscopio invertido. Las colonias hematopoyéticas se clasificaron como: colonias mieloides, que incluyen CFC-M (colonias con más de 50 monocitos), CFC-G (colonias con más de 50 granulocitos) y CFC-GM (colonias con más de 50 granulocitos y monocitos; y colonias eritroides, que incluyen CFC-E (colonias con 20 a 50 células eritroides) y BFC-E, colonias con más de 50 células eritroides (Figura 2).

10. CUANTIFICACIÓN DE LAS HPCs MÁS PRIMITIVAS

10.1 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS CD34+CD38-LIN-

Para cuantificar el número de células CD34+CD38-Lin- originadas a partir de las HPCs cultivadas en presencia o en ausencia de MSCs, se analizó su inmunofenotipo mediante citometría de flujo. Brevemente, 1×10^6 células hematopoyéticas en 100 μ l de PBS, se incubaron con bloqueador de receptores Fc (1 μ l/ 1×10^6 células; Blocking Reagent Human Miltenyi Biotec) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente las células se lavaron con 1 ml de PBS y se centrifugaron durante 10 min a 300 gravedades.

CUANTIFICACIÓN DE HPCs

ENSAYO DE CÉLULAS FORMADORAS DE COLONIAS (CFC)

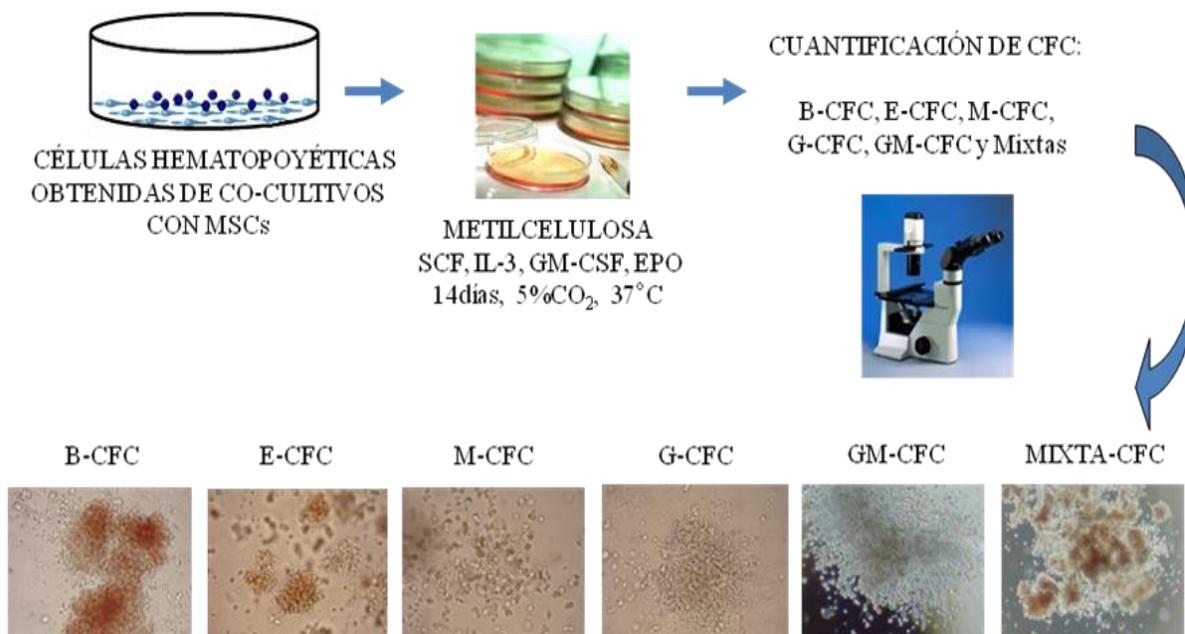


Figura 2. Ensayo de células formadoras de colonias para la cuantificación de HPCs.

Se etiquetaron tubos para citometría y a cada uno se adicionó un coctel de anticuerpos: anti-CD34-APC, anti-CD38-PE, anti-CD16-FITC, anti-CD41a-FITC (todos de Beckton Dickinson/PharMingen, San Jose, CA, USA), anti-CD19-FITC y anti-CD71-FITC (ambos de Invitrogen Corporation, USA) todos a una concentración de 1 $\mu\text{l}/1 \times 10^6$ de células. De 1 a 2 $\times 10^5$ células/50 μl de PBS se adicionaron a cada tubo de citometría, se mezcló en un vortex de 2 a 3 veces y se incubó durante 20 minutos en oscuridad a 4°C. Posteriormente las células se fijaron con 250 μl de FACS Lysing Solution 1x (BD) al 10% y se mezcló en un vortex, se incubaron por 10 min en oscuridad a 4°C. Se agregó 1 ml de PBS, se mezcló en un vortex y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante de un solo movimiento, se agregó 200 μl de PBS y se mezcló en un vortex por última vez, las preparaciones se taparon y se incubaron en oscuridad a 4°C hasta su adquisición en el citómetro (Facs

Calibur, BD). Se incluyeron los controles de autofluorescencia, controles positivos usando anti-CD45-FITC, anti-CD45-PE y anti-CD45APC (Beckton Dickinson/PharMingen, San Jose, CA, USA) y los correspondientes al isotipo de acuerdo al anticuerpo primario IgG1a-FITC, IgG1a-PE (Santa Cruz), IgG1a-APC (Catalg Laboratories). Las células marcadas se analizaron contando un mínimo de 10,000 eventos en el citómetro. El análisis de la citometría se llevó a cabo con el programa FlowJo 7.6.1.

10.2 ENSAYO DE CÉLULAS INICIADORAS DE CULTIVO A LARGO PLAZO (LTC-IC)

Para conocer la cantidad de HPCs primitivas que se originaron a partir de las células hematopoyéticas CD34+CD38-Lin- cultivadas en presencia o en ausencia de MSCs, se realizaron ensayos de LTC-IC. Células de la línea estromal M210B4 (línea celular de fibroblastos de MO de ratón, modificada genéticamente para producir IL-3 y G-CSF) se sembraron a una densidad de 1,500 /cm² en placas de 6 pozos, en presencia de medio RPMI suplementado con 10% de SFB y con 10 µl/ml de penicilina-estreptomicina y 10 µl/ml de gentamicina, una vez que las células llegaron a una confluencia del 70%, se adicionó 0.3 µg/ml de mitomicina C, de 18 a 24 horas después, se desechó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados suaves con PBS sobre la capa celular. Estando listas las capas de células M210B4, se sembraron 5x10² células obtenidas del enriquecimiento en células CD34+CD38-Lin- y 5x10⁴ y 1x10⁵ células de los días 14 y 28 de cultivo en ausencia o presencia de MSC, respectivamente. El medio de cultivo consistió de α-MEM (Minimum Essential Medium Alpha, Gibco, Invitrogen, USA) suplementado con 12.5% de SFB, 12.5% de suero de caballo (Gibco, Invitrogen, USA), 57.2 µM de β-mercaptoethanol, 400 mg/L de L-glutamina, 40 mg/L de inositol y 10 mg/L de ácido fólico (todos de Sigma, USA), 10 µl/ml de penicilina-estreptomicina y 10 µl/ml de gentamicina. Se realizaron cambios de medio (se retiró la mitad del volumen y se adicionó la misma cantidad de medio fresco) cada semana y los cultivos se llevaron hasta el día 35. Una vez terminado el tiempo de cultivo, se obtuvieron las células hematopoyéticas y se realizaron ensayos de CFC. Para obtener el número de LTC-IC, se tomó en cuenta que 8 CFC corresponden a una LTC-IC (Figura 3; Miller y Eaves, 2002).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa computacional STAT GRAPHICS PLUS 5.0, usando las pruebas de Tukey y de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencia significativa entre ellos. La significancia estadística fue asumida cuando los valores de P fueron inferiores a 0.05.

CUANTIFICACIÓN DE HPCs PRIMITIVAS

ENSAYO DE CÉLULAS INICIADORAS DE CULTIVO A LARGO PLAZO (LTC-IC)

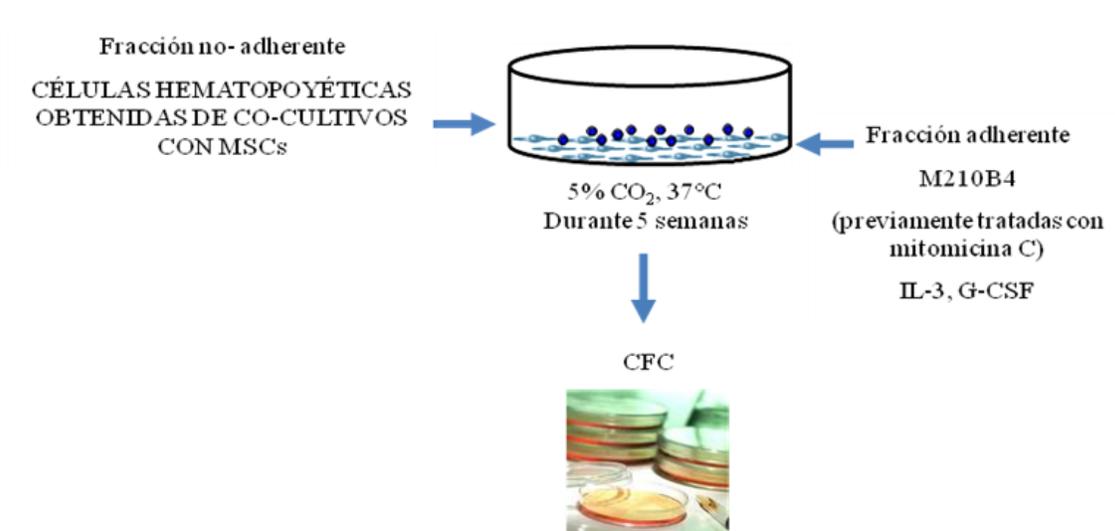


Figura 3. Ensayo de células iniciadoras de cultivo a largo plazo para la cuantificación de HPCs primitivos.

RESULTADOS

1. Obtención y caracterización de MSCs de MO, SCU y PL

1.1 Porcentaje de obtención y frecuencia de las MSCs de MO, SCU y PL

Tabla 1. Obtención y frecuencia de las MSCs de MO, SCU y PL

Tipo de muestra	No. de muestras procesadas	No.de muestras positivas	% de obtención	Frecuencia de MSC / CMNs
MO	9	9	100	1 / 33 x10^{3 a}
SCU	147	16	11.05	1 / 163 x10^{6 a}
PL	13	13	100	1 / 4.3 X10^{6 a}

Porcentaje de obtención y frecuencia de MSCs en muestras de MO, SCU y PL.

(a) Promedio de los valores obtenidos de CMNs de las muestras positivas para MSCs.

Se procesaron 9 muestras de aspirados de MO, 147 de SCU y 13 de PL de partos a término y cesáreas, de las cuales, se obtuvieron MSCs en 9, 16 y 13 casos respectivamente, resultando a sí en un 100% de obtención en muestras de MO y PL, mientras que en SCU fue de 11.05%. La frecuencia de las MSCs fue de 1 en 33 x10³ CMNs de MO, 1 en 163 x10⁶ CMNs de SCU y 1 en 4.3 x10⁶ CMNs de PL (Tabla 1). Estos resultados nos indican que las MSCs se encuentran y se obtienen de manera más frecuente en MO, seguido de PL y por último en SCU, tal como habíamos reportado anteriormente (Montesinos et al, 2009).

1.2 Morfología de MSCs de MO, SCU y PL

Cultivos de MSCs de MO, SCU y PL fueron teñidos con Azul de Toluidina al llegar a una confluencia del 70% para analizar la morfología celular (Figura 1A). En los cultivos de MSCs provenientes de las tres fuentes, se identificaron cuatro tipos celulares morfológicamente distintos: *grande*, células con el citoplasma muy extendido; *fibroblastoide*, células alargadas; *neural*, células con extensiones citoplasmáticas parecidas a dendritas y *pequeña*, células con el citoplasma muy reducido (Figura 1B).

En cultivos de MSCs de SCU y PL, las células *grandes* conformaron el 2.8% y 5.4% respectivamente, las cuales se encontraron en un porcentaje significativamente menor que en cultivos de MSCs de MO (9.9%). Las células con morfología *fibroblastoide* conformaron un porcentaje significativamente mayor en cultivos de MSCs de PL (84.9%) en comparación con cultivos de SCU (55.5%) y MO (67.9%; Figura 1B).

Las células con morfología *neural* conformaron el 5.4%, 7.5% y 3.3% de las células de MO, SCU y PL respectivamente, sin encontrar diferencias significativas entre ellas. Y las células *pequeñas* conformaron un porcentaje significativamente mayor en cultivos de MSCs de SCU en comparación con cultivos de MO y PL, siendo de 34.2%, 16.8% y 6.4% respectivamente, (Figura 1B).

Estos resultados nos indican que dentro de los cultivos de MSCs de SCU y PL que se utilizaron en este trabajo, igual que con MSCs de MO, se encuentran subpoblaciones celulares con diferente morfología, tal como reportamos anteriormente (Montesinos et al, 2009).

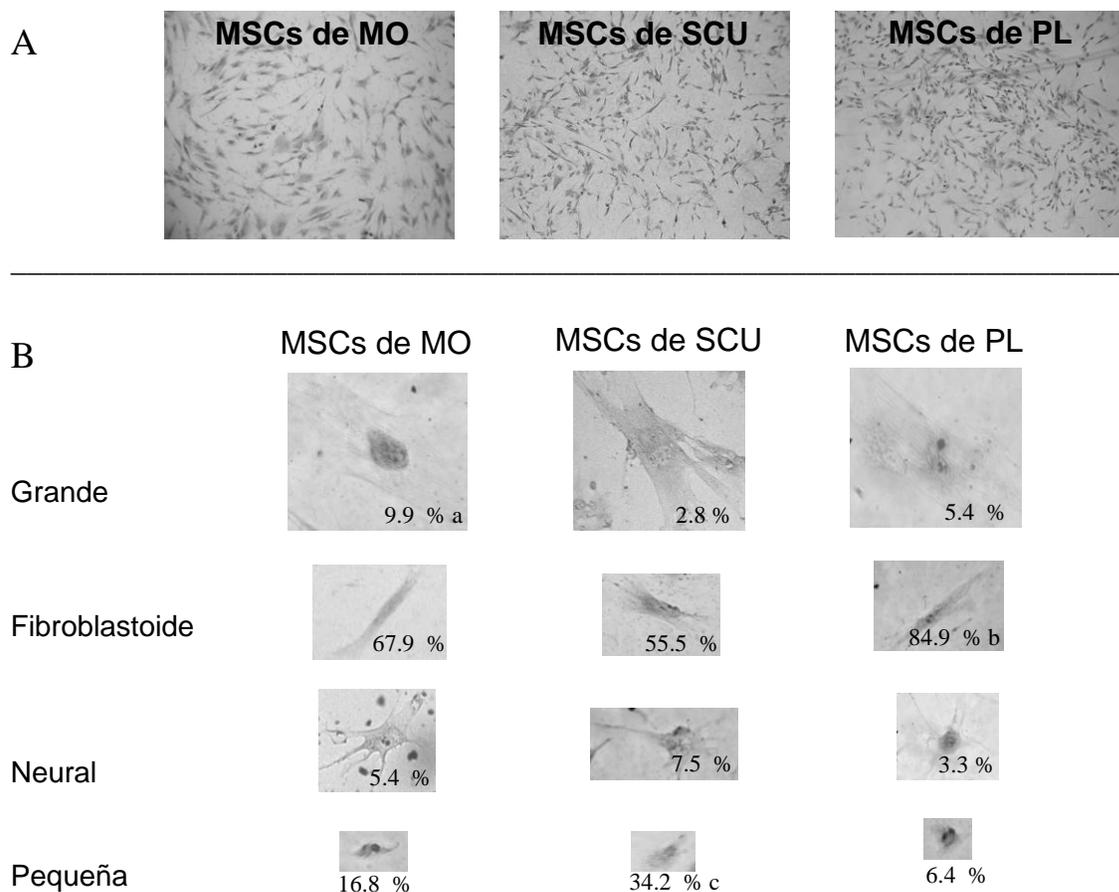


Figura 1. Morfología de las MSCs de MO, SCU y PL. Se observaron células con diferentes tipos morfológicos en los cultivos a partir de las tres fuentes. Cada tipo celular fue nombrado dependiendo de las características morfológicas observadas, los resultados se presentan en porcentajes de cada tipo celular y corresponde a la media de los valores a partir de experimentos separados (MO n=9; SCU n=7; PL n=8). (A) Cultivo de MSCs de MO, SCU y PL teñidos con Azul de Toluidina, 10X. (B) Tipos celulares morfológicamente distintos; grande, fibroblastoide, neural y células pequeñas, 20X. a, significativamente mayor a su similar de SCU y PL. b, significativamente mayor a su similar de MO y SCU. c, significativamente mayor a sus similar de MO y PL, $p < 0.05$.

1.3 Inmunofenotipo de MSCs de MO, SCU y PL

Para conocer el inmunofenotipo de las MSCs obtenidas a partir de MO, SCU y PL, se analizó la expresión de diferentes marcadores de superficie a través de citometría de flujo, Tabla 2. Las células de las tres fuentes fueron negativas para la expresión de marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34 y CD45 así como para CD31 y HLA-DR. CD133 fue expresado en un bajo porcentaje de MSCs de SCU y PL, mientras que en MSCs de MO no se encontró su expresión, sin embargo la diferencia no fue significativa. Células de las tres fuentes presentaron una expresión media para CD54 y una expresión alta para CD44, CD166 y los marcadores característicos de MSCs como CD105, CD73, CD90 y CD13.

La expresión de algunos marcadores se encontró significativamente diferente entre las MSCs de las tres fuentes, tales como HLA-ABC, expresado en un $39.3\pm 25.3\%$ de las células provenientes de MO y un $68.4\pm 29.9\%$ y $89.2\pm 7\%$ de SCU y PL respectivamente, siendo significativamente mayor su expresión en PL que en MO. De manera similar ocurrió con la expresión de CD49b en un $24.5\pm 3.5\%$, un $72.4\pm 25.2\%$ y un $97.5\pm 1.4\%$ de las MSCs de MO, SCU y PL respectivamente, siendo significativamente mayor su expresión en las dos últimas que en las MSCs de MO. Además se encontró la expresión de CD10 en un $4.5\pm 6.5\%$ en MO y un $8.3\pm 12\%$ y $52\pm 27\%$ en MSCs de SCU y PL respectivamente, siendo significativamente mayor en PL que en MO.

Estos resultados indican que las MSCs de SCU y PL que se utilizaron en este trabajo, presentan un patrón similar a las MSCs de MO en la expresión de antígenos de superficie, tal como reportamos anteriormente (Montesinos et al, 2009), sin embargo, la expresión diferencial en ciertos marcadores podría indicarnos algunas diferencias funcionales entre las MSCs provenientes de las tres fuentes.

Tabla 2. Inmunofenotipo de las MSCs de MO, SCU y PL

Ag	MSCs de MO	MSCs de SCU	MSCs de PL
CD105	96.9±18.1	94.4±9.8	96±2.8
CD73	98±2.3	97.6±2.3	72.7±27.3
CD90	98±3.6	73.2±35	88.4±9
CD13	99.6±0.1	98.4±2.5	98.4±1.5
CD44	98.7±0.3	97.9±1.5	97.8±1.6
CD166	75.1±9.2	81.4±18.8	73.6±26.7
HLA-ABC	39.3±25.3	68.4±29.9	89.2±7 ^a
CD29	99±0.1	86.6±26.2	98.3±1
CD49b	24.5±3.5	72.4±25.2 ^a	97.5±1.4 ^a
CD10	4.5±6.5	8.3±12	52±27 ^b
CD133	0.4±0.2	2.7±3.6	4.96±3.3
CD14	1.6±2.3	0.9±1.2	1±1
CD31	0.4±0.7	1±1.3	1.4±1.2
CD34	1±1.2	0.4±0.6	1.9±2.2
CD 45	1.4±2.1	2.2±2.7	1.1±0.8
HLA-DR	0.3±0.3	0.9±0.7	1.3±1.5
CD54	17.4±21.3	58.3±40.6	39.4±37.9

Expresión de marcadores de superficie de las MSCs de MO, SCU y PL determinado por citometría de flujo. Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para los diferentes marcadores y corresponde a la media de los valores a partir de experimentos separados (MO n=9; SCU n=7; PL n=8). a, significativamente mayor que MO; b, significativamente mayor que MO y SCU; P<0.05.

1.4 Capacidad de diferenciación de MSCs de MO, SCU y PL

La capacidad de diferenciación de las MSCs de MO (n=9), SCU (n=7) y PL (n=8), fue analizada después de haberlas cultivado bajo condiciones particulares que favorecen la diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.

Todas las muestras de MSCs de MO, SCU y PL tuvieron la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Figura 2). En los cultivos de MSCs de las tres fuentes inducidos a diferenciación osteogénica, se observaron depósitos de calcio (mineralización), los cuales fueron comprobados por la positividad a la tinción con Von Kossa (Figura 2 A: MSCs de MO, B: MSCs de SCU y C: MSCs de PL). En los cultivos de MSCs de las tres fuentes inducidos a diferenciación adipogénica, se encontró la formación de adipocitos con vacuolas lipídicas y aunque estas vacuolas fueron más pequeñas en las células de SCU y PL, en las MSCs de las tres fuentes fueron positivas a la tinción con Rojo Oleoso (Figura 2 D: MSCs de MO, E: MSCs de SCU y F: MSCs de PL).

La capacidad de diferenciación condrogénica en las MSCs de las tres fuentes, se comprobó por la formación de micromasas y su positividad a la tinción con Tricrómico de Masson, con la cual se identificó la presencia de colágena. La morfología de las células en la micromasa podría sugerir la formación de cartílago hialino (en donde las células se encuentran rodeadas por una matriz extracelular, mostrando una coloración grisácea) y cartílago fibroso (el cual se caracteriza por la formación de fibras largas de colágena inmediatas a las células, mostrando una coloración azul), características de este último se observó en mayor cantidad en micromasas de MSCs de SCU (Figura 2 G: MSCs de MO, H: MSCs de SCU e I: MSCs de PL), no obstante, para comprobar las diferencias en la formación de cartílago hialino y fibroso, es necesario analizar la cantidad de colágena tipo II y I respectivamente .

Estos resultados indican que las MSCs de SCU y PL que se utilizaron en este trabajo, igual que las MSCs de MO, tienen la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos, tal como reportamos anteriormente (Montesinos et al, 2009).

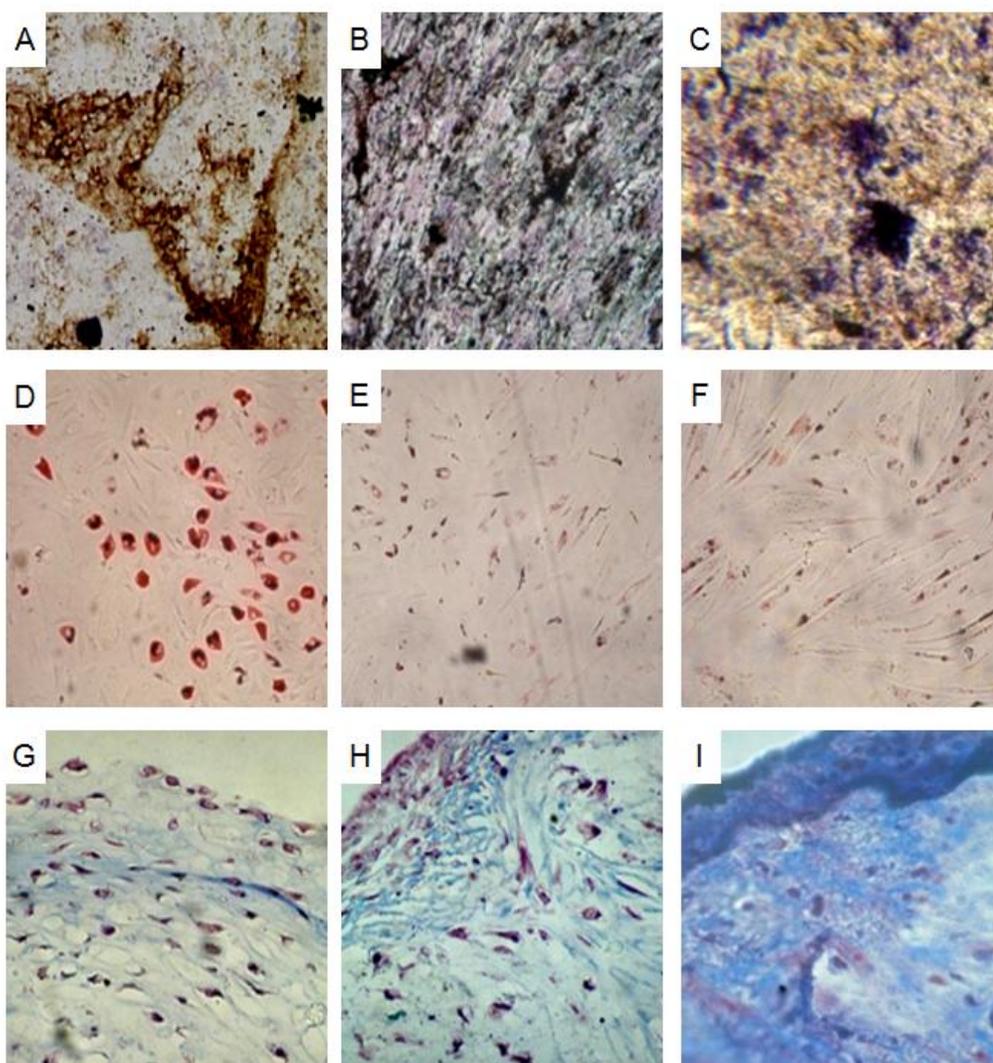


Figura 2. Diferenciación de las MSCs de MO, SCU y PL. A, B y C; diferenciación osteogénica de MSCs de MO, SCU y PL respectivamente. La diferenciación osteogénica se indica por la presencia de depósitos de calcio positivos a la tinción con von Kossa; la positividad se observa de color café y negro (20X). D, E y F; diferenciación adipogénica de MSCs de MO, SCU y PL. La diferenciación adipogénica se indica por la positividad a la tinción con Rojo Oleoso (20X). G, H e I; diferenciación condrogénica de MSCs de MO, SCU y PL respectivamente. La diferenciación condrogénica se indica por la presencia de colágena positiva a la tinción con Tricrómico de Masón; la positividad se observa de color azul (20x).

2. Co-cultivos de MSCs con la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- en presencia de contacto celular

2.1 Muestras de SCU procesadas y obtención de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-

Se procesaron seis muestras de SCU, en las cuales se observaron datos heterogéneos. El volumen de la sangre obtenido en las muestras fue de 64.16ml en promedio (44ml el volumen más bajo y 88.5ml el más alto). El número de CMNs obtenidas fue de 152.55×10^6 en promedio (83.5×10^6 el valor más bajo y 284.6×10^6 el más alto), mientras que el número de células obtenidas después del enriquecimiento mediante selección negativa en células CD34+CD38-Lin-, fue de 0.7×10^6 en promedio (0.22×10^6 el valor más bajo y 1.68×10^6 el más alto), con un porcentaje de recuperación de 0.5% en promedio (0.15% el valor más bajo y 0.98% el valor más alto; Tabla 3).

Tabla 3. Muestras de SCU y enriquecimiento de HPCs

Muestras	ml de SCU	CMN ($\times 10^6$)	células post-enriquecimiento CD34+CD38-Lin- ($\times 10^6$)	% de recuperación
1	66.5	174.6	0.312	0.17
2	88.5	284.6	1.68	0.59
3	69	136.4	0.3	0.21
4	67	142	0.22	0.15
5	50	94.25	0.875	0.92
6	44	83.5	0.82	0.98
Promedio	64.16	152.55	0.70	0.50

Obtención de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.

2.2 Proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la proliferación de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- (Figura 3), se evaluó el número de células hematopoyéticas presentes en los cultivos a los días 14 y 28 (Figura 4). Las células hematopoyéticas fueron sembradas sobre las capas de MSCs provenientes de las tres fuentes, tratadas previamente con mitomicina C para detener su ciclo celular e inhibir su proliferación. Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de células sembradas al inicio del cultivo, en donde el valor de 1 es referente a 10,000 células.

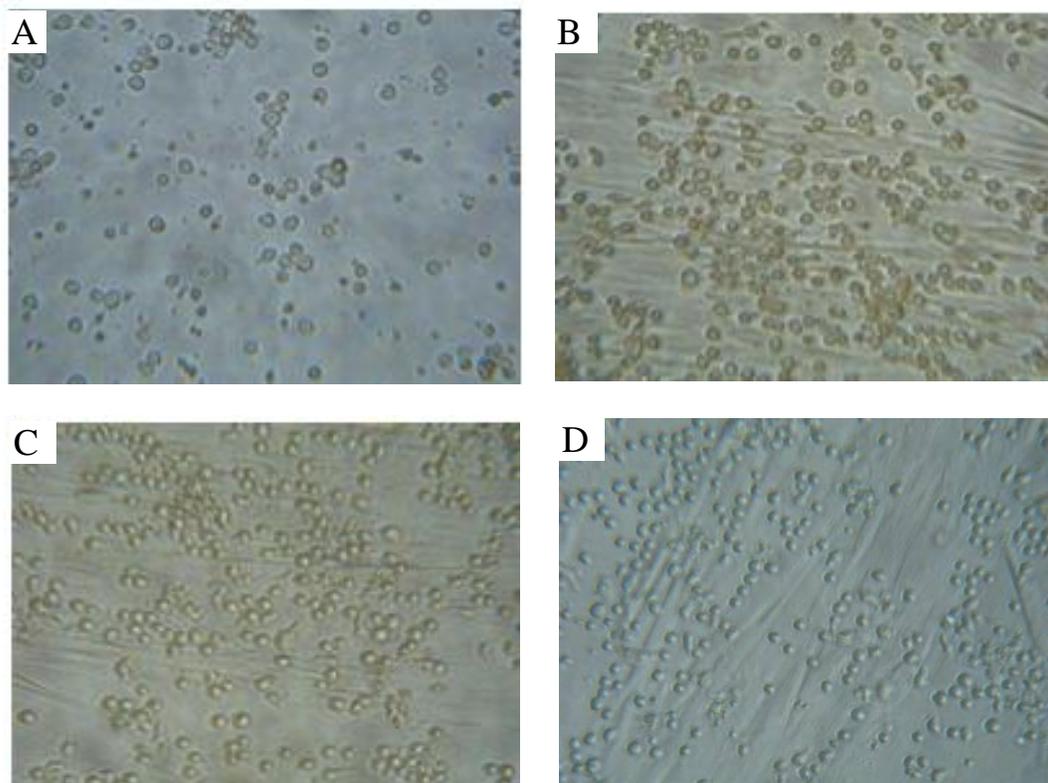


Figura 3. Co-cultivos de MSCs-HPCs. (A) Cultivos de HPCs en ausencia de MSCs; (B) Co-cultivo de MSCs de MO con HPCs; (C) Co-cultivo de MSCs de SCU con HPCs; (D) Co-cultivo de MSCs de PL con HPCs. Cultivos al día 7 en presencia del coctel seminal (20X).

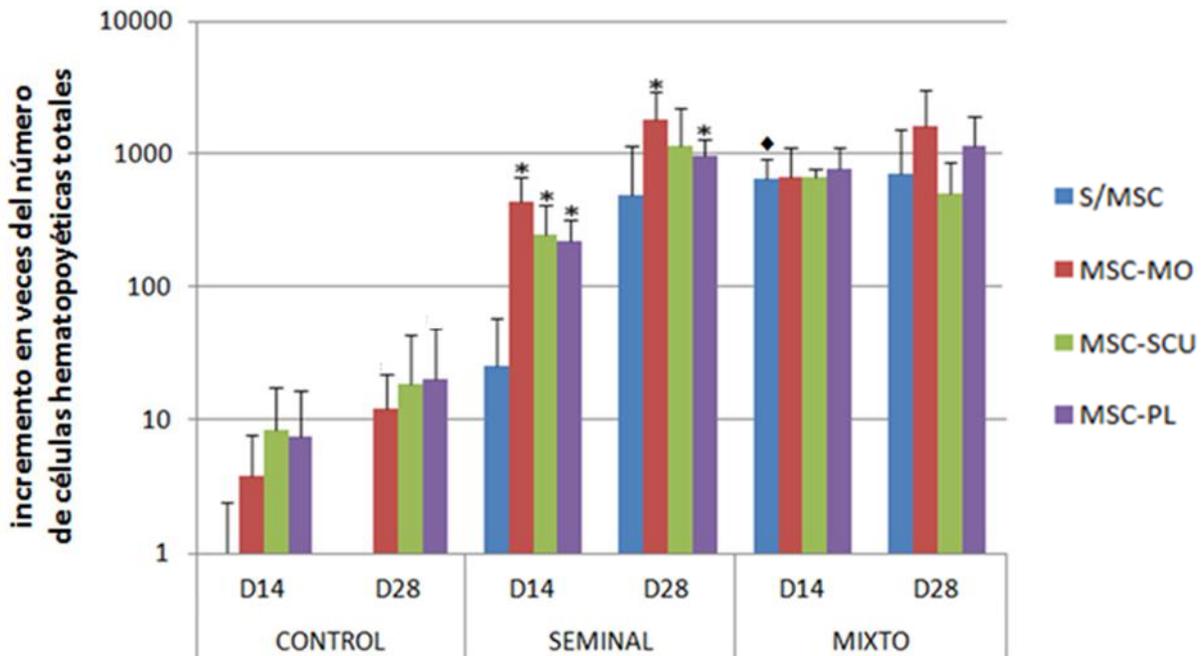


Figura 4. Cinéticas de proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, cultivadas en presencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de células totales. n=6 *significativamente mayor a su similar sin MSC, ◆significativamente mayor a su similar con coctel seminal, p<0.05

En cultivos en ausencia de citocinas, al día 14, las MSCs de las tres fuentes tuvieron la tendencia de incrementar el número de células hematopoyéticas en comparación con cultivos sin MSCs. Al día 28, el número de células hematopoyéticas continuó incrementando en presencia de MSCs de las tres fuentes en comparación con cultivos en ausencia de MSCs, en donde no se detectaron células (Figura 4).

En cultivos con el coctel seminal, al día 14, el incremento en el número de células hematopoyéticas fue significativo en presencia de MSCs de las tres fuentes (444±230, 248±171 y 221±98 con MSCs de MO, SCU y PL respectivamente) en comparación con cultivos sin MSCs (25±33). Al día 28, en cultivos con MSCs provenientes de MO y PL el incremento fue significativamente mayor (1835±1130 y 979±334

respectivamente) en comparación con cultivos sin MSCs 487 ± 682), mientras que el incremento en la proliferación de HPCs en presencia de MSCs de SCU (1147 ± 1098), no fue significativo respecto al obtenido en cultivos sin MSCs (Figura 4).

En cultivos con el coctel mixto, el incremento en la proliferación de las HPCs fue similar en presencia de MSCs en comparación con cultivos sin MSCs (días 14 y 28; Figura 4).

Con el coctel mixto, al día 14, en ausencia de MSCs observamos un incremento significativo en la proliferación de las HPCs en comparación con cultivos en presencia del coctel seminal (663 ± 265 y 25 ± 33 respectivamente). No encontramos diferencias significativas en la capacidad de incrementar la proliferación de las HPCs entre el coctel mixto y cultivos con MSCs en presencia del coctel seminal. Al comparar la proliferación entre los cocteles seminal y mixto en presencia de MSCs, al día 28, no se encontraron diferencias significativas (Figura 4).

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de incrementar la proliferación de las HPCs entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL, al igual que las MSCs de MO, tienen la misma capacidad de incrementar la proliferación de HPCs tanto en ausencia de citocinas, como en presencia del coctel seminal.

2.3 Formación de HPCs menos primitivas

2.3.1 Formación de CFC mieloides

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la formación de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, se evaluó el número de CFC mieloides presentes en los cultivos a los días 14 y 28 (Figuras 5 y 6). Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de CFC mieloides obtenidas a partir de la población enriquecida en cada uno de los experimentos al día cero de cultivo (155 ± 68 CFC mieloides).

En cultivos en ausencia de citocinas, al día 14, las MSCs provenientes de las tres fuentes tuvieron la tendencia a incrementar el número de CFC mieloides en comparación con cultivos sin MSCs. Al día 28, el número de las CFC mieloides continuó incrementando en presencia de MSCs de las tres fuentes en comparación con cultivos en ausencia de MSCs, en donde no se detectaron células (Figura 6).

En cultivos con el coctel seminal, al día 14, el incremento en el número de CFC mieloides fue significativo en presencia de MSCs (982.84 ± 703.11 , 736 ± 1225 y 442.2 ± 299.5 con MSCs de MO, SCU y PL respectivamente), en comparación con cultivos sin MSCs (32.3 ± 27.61). Al día 28, el incremento en el número de CFC mieloides fue similar en presencia de MSCs en comparación con cultivos sin MSCs. Este mismo comportamiento lo observamos con el coctel mixto a los días 14 y 28, (Figura 6).

Con el coctel mixto, al día 14, en ausencia de MSCs observamos un incremento significativo en la expansión de CFC mieloides en comparación con cultivos en presencia del coctel seminal (728 ± 1011 y 32 ± 27 respectivamente). No encontramos diferencias significativas en la capacidad de expansión entre el coctel mixto y cultivos con MSCs en presencia del coctel seminal. Al comparar la expansión entre los cocteles seminal y mixto en presencia de MSCs, al día 28, no se encontraron diferencias significativas (Figura 6).

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de expansión de CFC mieloides entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL, igual que las MSCs de MO, tienen la misma capacidad de incrementar la expansión de CFC mieloides tanto en ausencia de citocinas, como en presencia del coctel seminal.

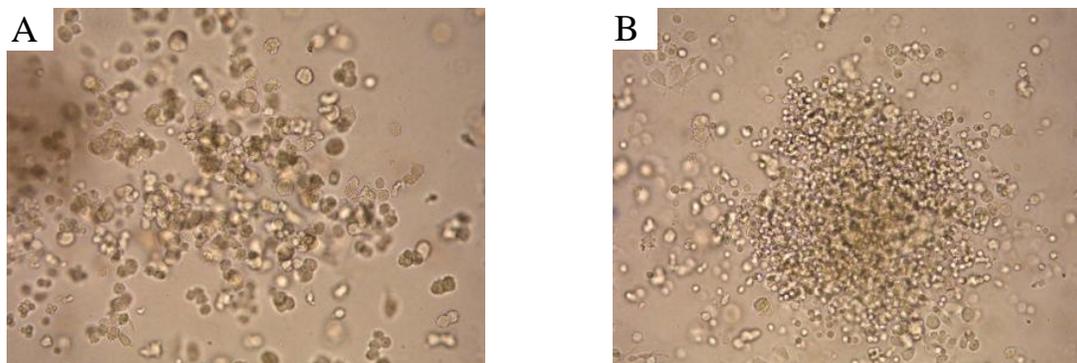


Figura 5. Progenitores mieloides. (A) CFC de Monocitos; (B) CFC de Granulocitos 20x.

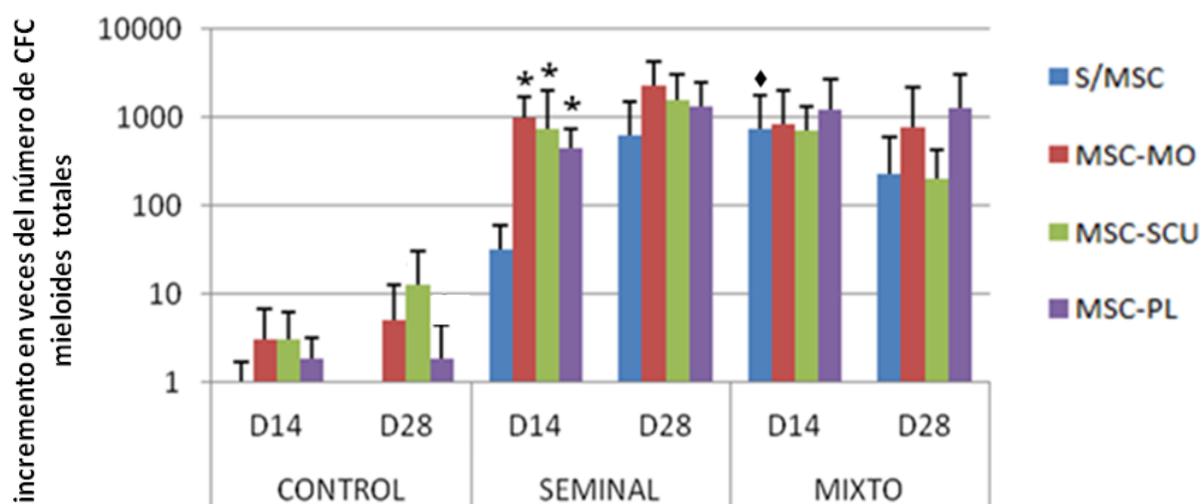


Figura 6. Cinéticas de expansión de CFC mieloides totales de células CD34+CD38-Lin-, cultivadas en presencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de CFC mieloides. n=6 *significativamente mayor a su similar sin MSC, ♦significativamente mayor su similar con el coctel seminal, p<0.05

2.3.2 Formación de CFC eritroides

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la formación de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, se evaluó el número de CFC eritroides presentes en los cultivos a los días 14 y 28 (Figuras 7 y 8). Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de CFC eritroides obtenidas a partir de la población enriquecida en cada uno de los experimentos al día cero de cultivo (323 ± 222 CFC eritroides).

En cultivos en ausencia de citocinas, al día 14, las MSCs de MO y SCU tienden a incrementar el número de CFC eritroides en comparación a cultivos sin MSCs y con MSCs de PL. Al día 28, el número de CFC eritroides continuó incrementando en presencia de MSCs de las tres fuentes en comparación con cultivos en ausencia de MSCs, en donde no se detectaron células (Figura 8).

En cultivos con el coctel seminal, al día 14, el incremento en el número de CFC eritroides fue significativo solo en presencia de MSCs de SCU ($1,275\pm 415$) en comparación con cultivos sin MSCs (20.1 ± 35.9). Al día 28, el incremento en el número de CFC eritroides fue similar en presencia de MSCs en comparación con cultivos sin MSCs; este mismo comportamiento lo observamos con el coctel mixto, encontrando además, una tendencia a disminuir el número de CFC eritroides en presencia de MSCs de SCU al día 28 (Figura 8).

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de incrementar la expansión de CFC eritroides entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL, al igual que las MSCs de MO, presentan la misma capacidad de expansión de CFC eritroides tanto en ausencia de citocinas como en presencia del coctel seminal.

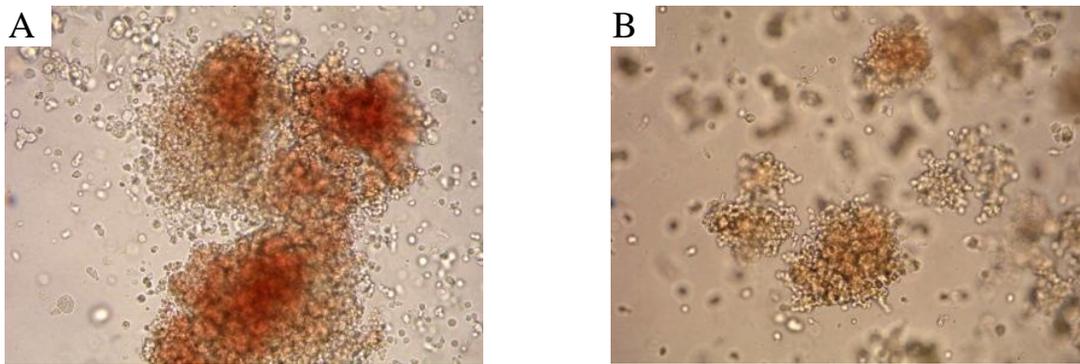


Figura 7. Progenitores eritroides. (A) CFB Eritroide; (B) CFC eritroides. 20x.

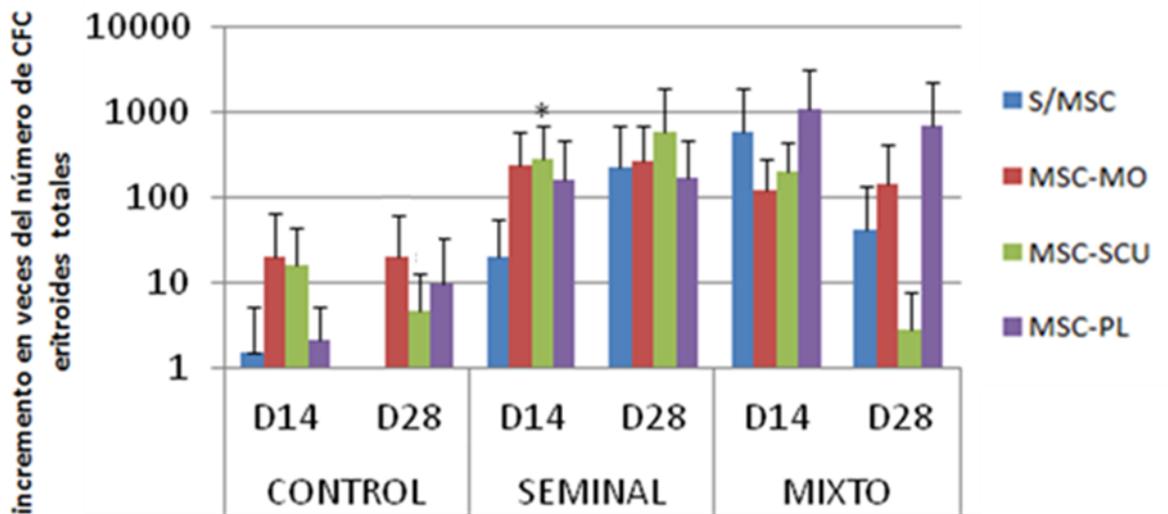


Figura 8. Cinéticas de expansión de CFC eritroides totales de células CD34+CD38-Lin-, cultivadas en presencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de CFC eritroides totales. n=6
*significativamente mayor a su similar sin MSC, p<0.05

2.4 Formación de HPCs más primitivas

2.4.1 Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la formación de HPCs primitivas a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, se evaluó el número de células CD34+CD38-Lin- presentes en los cultivos a los días 14 y 28, mediante citometría de flujo (Figura 9). Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de células CD34+CD38-Lin- obtenidas al día cero de cultivo (4115 ± 1851 células CD34+CD38-Lin-).

En cultivos en ausencia de citocinas, al día 14, únicamente las MSCs de PL presentaron la tendencia a incrementar el número de células CD34+CD38-Lin-, mientras las MSCs de MO y SCU retardaron su pérdida (es decir, se mantuvieron por mayor periodo de tiempo en cultivo y fueron disminuyendo de manera más lenta), en comparación con cultivos sin MSCs, en donde no se encontraron células con este inmunofenotipo. Al día 28, en cultivos con MSCs, únicamente se pudo evaluar la presencia de estas células en un experimento con MSCs de las tres fuentes, debido a que el número de células obtenido en la mayoría de los co-cultivos no fue suficiente para realizar el ensayo por citometría de flujo, sin embargo, en dicho experimento, se encontró que el número de células CD34+CD38-Lin- se mantenía en cultivos en presencia de MSCs de las tres fuentes, en comparación con el número de células con este inmunofenotipo al inicio del cultivo (Figura 9).

En cultivos con el coctel seminal, al día 14, el incremento en el número de células CD34+CD38-Lin- fue significativo en presencia de MSCs de las tres fuentes (146.8 ± 192.23 , 91.19 ± 87.54 y 31.58 ± 19.6 con MSCs de MO, SCU y PL respectivamente), en comparación con cultivos sin MSCs (3.5 ± 2.87). Al día 28, en cultivos con MSCs de MO y PL se observó un incremento significativo de células con este inmunofenotipo (216.17 ± 94.55 y 105.98 ± 55.88 respectivamente), en comparación con cultivos sin MSCs (52.53 ± 88.87), mientras que el incremento en la formación de células CD34+CD38-Lin- en presencia de MSCs de SCU (168.8 ± 215), no fue significativamente diferente al obtenido en cultivos sin MSCs (Figura 9).

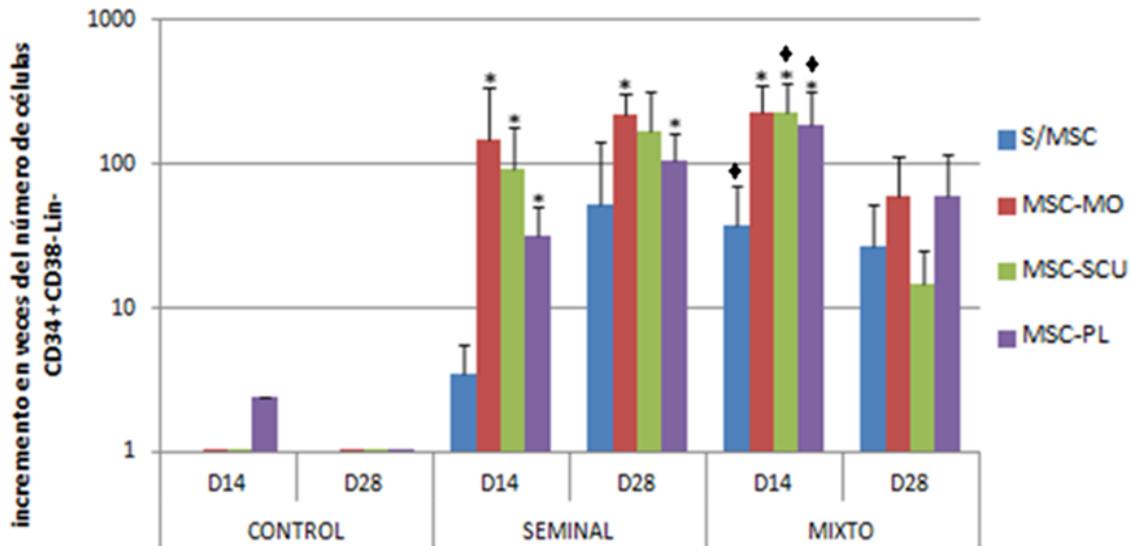


Figura 9. Cinéticas de expansión de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-, cultivadas en presencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de células CD34+CD38-Lin-. n=6 *significativamente mayor a su similar sin MSC, ♦significativamente mayor a su similar con el coctel seminal, p<0.05

En cultivos con el coctel mixto, al día 14, el incremento en el número de células CD34+CD38-Lin- fue significativo en presencia de MSCs (225.65 ± 128.9 , 226.94 ± 138.13 y 186 ± 129 con MSCs de MO, SCU y PL respectivamente), en comparación con cultivos sin MSCs (37.31 ± 32.81). Al día 28, el incremento de células con este inmunofenotipo fue similar en presencia de MSCs de las tres fuentes, en comparación con cultivos sin MSCs (Figura 9).

Con el coctel mixto, al día 14, en ausencia de MSCs observamos un incremento significativo en la expansión de células CD34+CD38-Lin- comparación con cultivos en presencia del coctel seminal (37 ± 32 y 3.5 ± 2.8 respectivamente). En cultivos en presencia de SCU y PL, se obtuvo una mayor expansión con el coctel mixto (226 ± 138 y 186 ± 129) que con el coctel seminal (91 ± 87 y 31 ± 19). Al comparar la

expansión entre los cocteles seminal y mixto en presencia de MSCs, al día 28, no se encontraron diferencias significativas (Figura 9).

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de incrementar la formación de células CD34+CD38-Lin-, entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL, al igual que las MSCs de MO, presentan la misma capacidad de incrementar la expansión de células CD34+CD38-Lin- en presencia de citocinas del coctel seminal y del coctel mixto.

2.4.2 Formación de LTC-IC

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la formación de HPCs primitivas a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, se evaluó el número de LTC-IC- presentes en los cultivos a los días 14 y 28 (Figura 10). Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de LTC-IC obtenidas a partir de la población enriquecida en cada uno de los experimentos al día cero de cultivo (255 ± 262 LTC-IC).

En cultivos en ausencia de citocinas, al día 14, únicamente en algunos experimentos las MSCs de las tres fuentes tuvieron la capacidad de retardar la pérdida de las LTC-IC en comparación con cultivos sin MSCs, en donde ya no se observaron células. Al día 28, el número de células hematopoyéticas obtenidas de los co-cultivos no fueron suficientes para realizar el experimento de LTC-IC (Figura 10).

En cultivos con el coctel seminal, a los días 14 y 28, se observó una tendencia a incrementar el número de LTC-IC en presencia de MSCs, en comparación con cultivos sin MSCs (día 14: 0.95 ± 1.33 , 1.88 ± 2.21 , 0.35 ± 2.56 y 0.12 ± 0.13 con MSCs de MO, SCU, PL y sin MSCs respectivamente; día 28: 4.88 ± 9.73 , 2.94 ± 4.72 , 4.86 ± 5.28 y 0.37 ± 0.13 con MSCs de MO, SCU, PL y sin MSCs respectivamente). En cultivos con el coctel mixto, únicamente en algunos experimentos las MSCs de las tres fuentes tuvieron la capacidad de retardar la pérdida de las LTC-IC en comparación con cultivos sin MSCs (día 14 y 28; Figura 10).

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de incrementar la formación de LTC-IC entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL, al igual que las MSCs de MO, favorecen la expansión de LTC-IC en presencia de citocinas del coctel seminal.

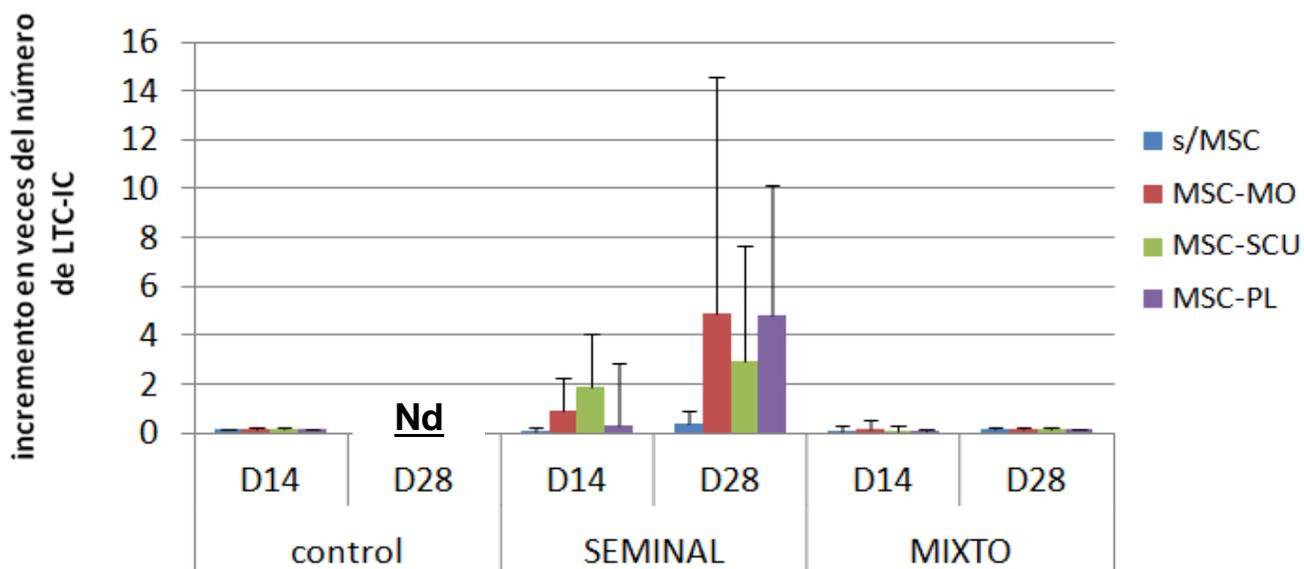


Figura 10. Cinéticas de expansión de LTC-IC de células CD34+CD38-Lin-, cultivadas en presencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de LTC-IC. n=4

3. Co-cultivos de MSCs con la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- en ausencia de contacto celular

3.1 Muestras de SCU procesadas y obtención de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-

Se procesaron seis muestras de SCU, en las cuales se observaron datos heterogéneos. El volumen de la sangre obtenida en las muestras fue de 53.08 ml en promedio (27 ml el volumen más bajo y 80.5 ml el más alto). El número de CMNs obtenidas fue de 119.9×10^6 en promedio (47.7×10^6 el valor más bajo y 172.5×10^6 el más alto). Mientras que el número de células obtenidas después del enriquecimiento mediante selección negativa en células CD34+CD38-Lin-, fue de 0.7×10^6 en promedio (0.27×10^6 el valor más bajo y 1.83×10^6 el más alto); con un porcentaje de recuperación de 0.59% en promedio (0.21% el valor más bajo y 1.08% el valor más alto; Tabla 4).

Tabla 4. Muestras de SCU y enriquecimiento de HPCs

Experimento	ml de SCU	CMN ($\times 10^6$)	células post-enriquecimiento CD34+CD38-Lin- ($\times 10^6$)	% de recuperación
1	41.5	142.5	0.841	0.59
2	74.5	169	1.83	1.08
3	80.5	172.5	0.535	0.31
4	27	60.5	0.354	0.58
5	51	127.2	0.27	0.21
6	44	47.7	0.38	0.79
Promedio	53.08	119.9	0.70	0.59

Obtención de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU.

3.2 Proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la proliferación de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-

en cultivos en ausencia de contacto MSC-HPC, se evaluó el número de células hematopoyéticas presentes en los cultivos a los días 14 y 28 (Figura 11). Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de células sembradas al inicio del cultivo, en donde el valor de 1 es referente a 10,000 células.

En cultivos en ausencia de citocinas, al día 14, las MSCs de las tres fuentes presentaron la tendencia a retardar la pérdida de las células hematopoyéticas en comparación con cultivos sin MSCs, en donde el número de células disminuyó. Al día 28, el número de células hematopoyéticas incrementó en presencia de MSCs de las tres fuentes en comparación con cultivos en ausencia de MSCs, en donde no se detectaron células (Figura 11).

En cultivos con el coctel seminal, al día 14, el incremento en el número de células hematopoyéticas fue significativo en presencia de MSCs de las tres fuentes (184 ± 152 , 120.3 ± 117.3 y 120.2 ± 72.39 con MSCs de MO, SCU y PL respectivamente) en comparación con cultivos sin MSCs (26 ± 10.08). De igual manera, al día 28, el incremento en el número de células hematopoyéticas fue significativamente mayor en cultivos con MSCs (611 ± 246 , 386.6 ± 294.7 y 1207 ± 1156 con MSCs de MO, SCU y PL respectivamente) en comparación con cultivos sin MSCs (67.35 ± 45.6 ; Figura 11).

En cultivos con el coctel mixto, al día 14, el incremento en la proliferación de las HPCs fue significativo en presencia de MSCs de MO y SCU (634 ± 319 y 379 ± 250 respectivamente), en comparación con cultivos sin MSCs (210 ± 130), mientras que el incremento en el número de células hematopoyéticas en cultivos con MSCs de PL (384 ± 279), no fue significativo respecto al obtenido en cultivos sin MSCs. Al día 28, el incremento en el número de células hematopoyéticas, fue similar en presencia de MSCs de las tres fuentes en comparación con cultivos sin MSCs (Figura 11).

Con el coctel mixto, en ausencia de MSCs observamos un incremento significativo en la proliferación de las HPCs en comparación con cultivos en presencia del coctel seminal (día 14: 210 ± 130 y 26 ± 18 , día 28: 1226 ± 1032 y 67 ± 46 respectivamente). No encontramos diferencias significativas en la capacidad de incrementar la proliferación de las HPCs entre el coctel mixto y cultivos con MSCs en presencia del coctel seminal. Al comparar la proliferación entre los cocteles seminal y mixto en presencia de MSCs, no se encontraron diferencias significativas (Figura 11).

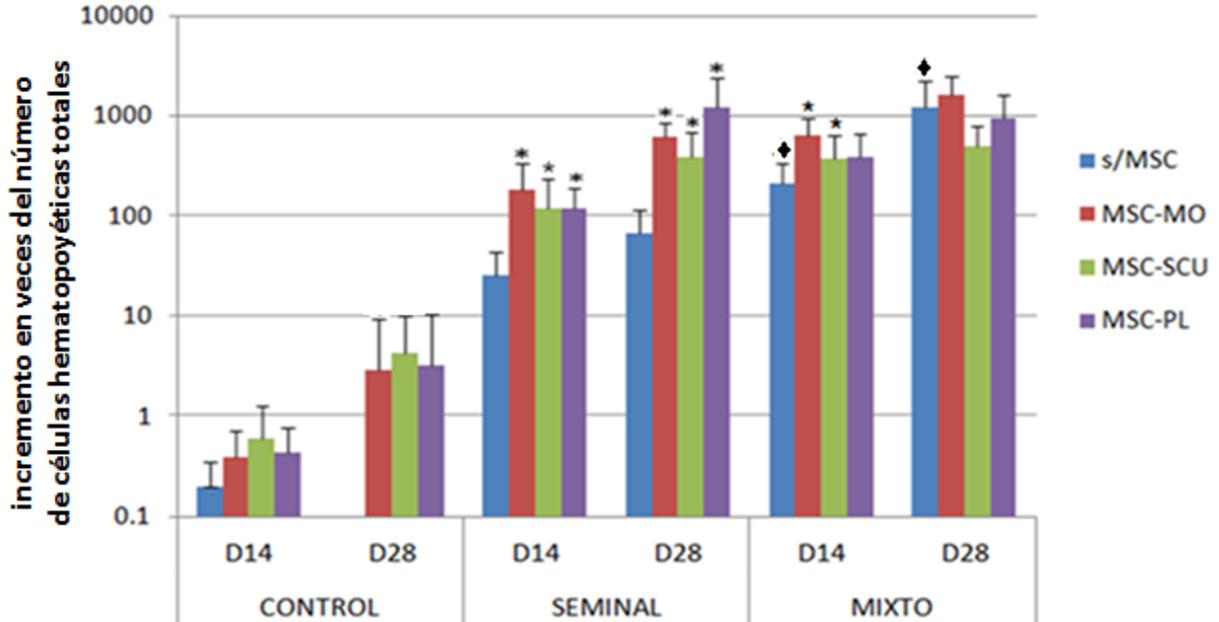


Figura 11. Cinéticas de proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, cultivadas en ausencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de células totales. n=6 *significativamente mayor a su similar sin MSC, ♦significativamente mayor a su similar con el coctel seminal, p<0.05

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de incrementar la proliferación de las HPCs entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL, al igual que las MSCs de MO, tienen la misma capacidad de incrementar la proliferación de HPCs, en usencia de contacto MSCs-HPCs, tanto en cultivos sin citocinas, como en presencia del coctel seminal.

3.3 Formación de HPCs menos primitivas

3.3.1 Formación de CFC mieloides

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la formación de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, en cultivos en ausencia de contacto MSC-HPC, se evaluó el número de CFC mieloides presentes en los cultivos a los días 14 y 28 (Figura 12). Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de CFC mieloides obtenidas a partir de la población enriquecida en cada uno de los experimentos al día cero de cultivo (610 ± 584 CFC mieloides).

En cultivos en ausencia de citocinas, las MSCs de las tres fuentes retardaron la pérdida de CFC mieloides, en comparación con cultivos sin MSCs, en donde ya no se observaron células (días 14 y 28; Figura 12).

En cultivos con el coctel seminal al día 14, el incremento en el número de CFC mieloides fue significativo en presencia de MSCs (102.8 ± 75.39 , 68 ± 60.7 y 43.39 ± 298.9 con MSCs de MO, SCU y PL respectivamente), en comparación con cultivos sin MSCs (1.27 ± 0.18). Asimismo al día 28, el incremento fue significativo en presencia de MSCs (198 ± 76.6 , 122 ± 94.5 y 237.7 ± 298.9 con MSCs de MO, SCU y PL respectivamente), en comparación con cultivos sin MSCs (10.33 ± 2.83 ; Figura 12).

En presencia del coctel mixto, el incremento en el número CFC mieloides fue similar en cultivos con MSCs en comparación con cultivos sin MSCs (días 14 y 28; Figura 12).

Con el coctel mixto, en ausencia de MSCs observamos un incremento significativo en la expansión de CFC mieloides en comparación con cultivos en presencia del coctel seminal (día 14: 49 ± 46 y 1 ± 0 , día 28: 238 ± 190 y 10.3 ± 2.8 respectivamente). No encontramos diferencias significativas en la capacidad de expansión entre el coctel mixto y cultivos con MSCs en presencia del coctel seminal. Al comparar la expansión entre los cocteles seminal y mixto en presencia de MSCs no se encontraron diferencias significativas (Figura 12).

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de incrementar la expansión de las CFC mieloides entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL, al igual que las MSCs de MO, tienen la capacidad de incrementar la expansión de CFC mieloides, aún inhibiendo el contacto MSCs-HPCs, en presencia del coctel seminal.

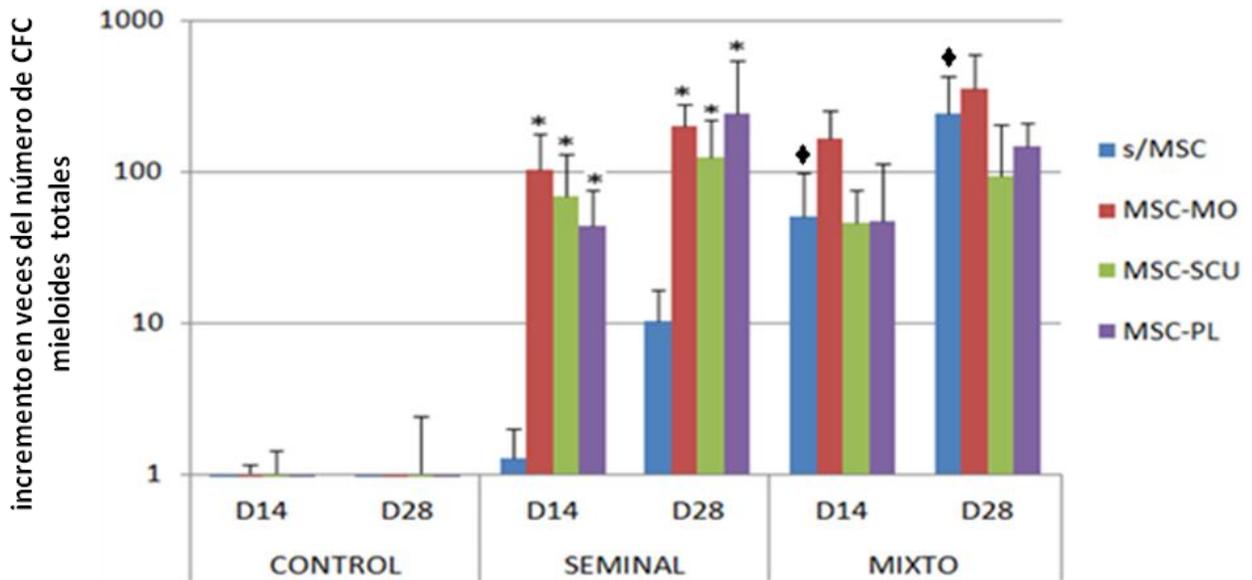


Figura 12. Cinéticas de expansión de CFC mieloides totales de células CD34+CD38-Lin-, cultivadas en ausencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de CFC mieloides. n=6 *significativamente mayor a su similar sin MSC, ♦significativamente mayor a su similar con el coctel seminal, p<0.05

3.3.2 Formación de CFC eritroides

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la formación de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, en cultivos en ausencia de contacto MSC-HPC, se evaluó el número de CFC eritroides presentes en los cultivos a los días 14 y 28 (Figura 13). Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de CFC

eritroides obtenidas a partir de la población enriquecida en cada uno de los experimentos al día cero de cultivo (262 ± 138 CFC eritroides).

En cultivos en ausencia de citocinas, las MSCs de las tres fuentes retardaron la pérdida de CFC eritroides, en comparación con cultivos sin MSCs, en donde ya no se observaron células (días 14 y 28; Figura 13).

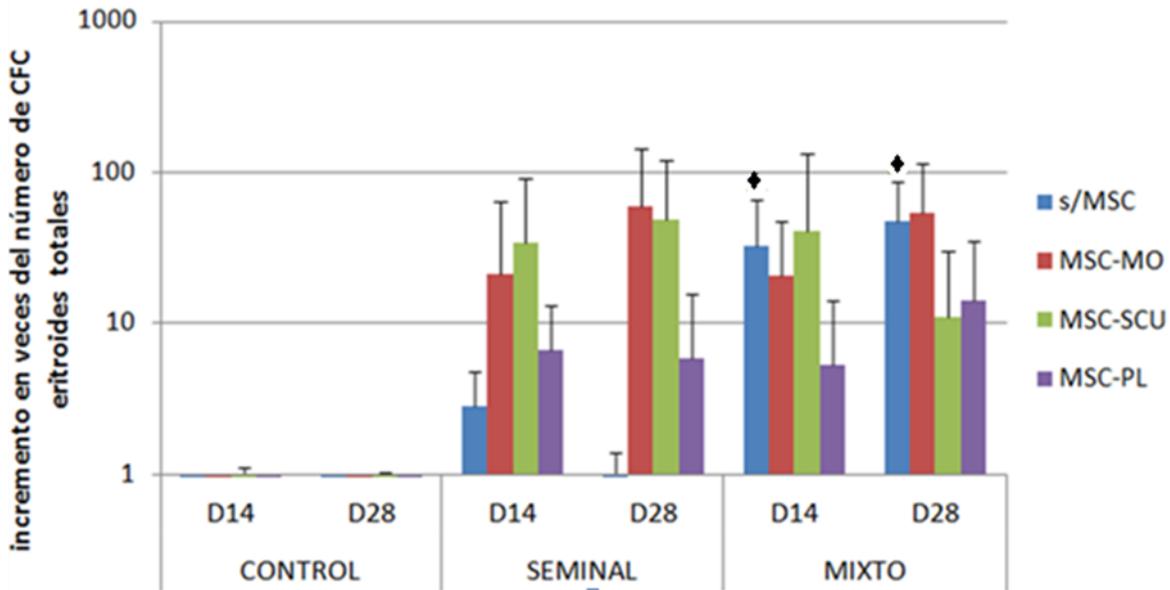


Figura 13. Cinéticas de expansión de CFC eritroides totales de células CD34+CD38-Lin-, cultivadas en ausencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de CFC eritroides totales. n=6 *significativamente mayor a su similar sin MSC, ♦significativamente mayor a su similar con el coctel seminal, p<0.05

En cultivos con el coctel seminal, al día 14, el incremento en el número de CFC eritroides presentó una tendencia a ser mayor en presencia de MSCs de MO y SCU (21 ± 42.02 , 33.7 ± 56.9 respectivamente), en comparación con cultivos en presencia de MSCs de PL y sin MSCs (6.56 ± 6.56 y 2.77 ± 2.39 respectivamente). De igual manera, al día 28 en cultivos con MSCs de MO y SCU, el incremento fue de 59.14 ± 84.06 y

47.6±72.4 veces respectivamente, en comparación con cultivos con MSCs de PL (5.83±9.55) y cultivos sin MSCs (0.4±0.7; Figura 13).

En cultivos con el coctel mixto, al día 14, el incremento en el número de CFC eritroides presentó una tendencia a ser menor en presencia de MSCs de PL en comparación con cultivos con MSCs de MO, SCU y sin MSCs. Mientras que al día 28, el incremento en el número de CFC eritroides presentó una tendencia a ser menor en presencia de MSCs de SCU y PL, en comparación con cultivos con MSCs de MO y sin MSCs (Figura 13).

Con el coctel mixto y ausencia de MSCs, se observó un incremento significativo en la expansión de CFC eritroides cuando se compararon con cultivos en presencia del coctel seminal (día 14: 32.5±33.5 y 2.7±2.4, día 28: 47±39 y 0.4±0.7 respectivamente (Figura 13).

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de incrementar el número de CFC eritroides entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL en presencia del coctel seminal, igual que las MSCs de MO, tienden a incrementar la expansión de CFC eritroides, en ausencia de contacto MSCs-HPCs.

3.4 Formación de HPCs más primitivas

3.4.1 Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la formación de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, en cultivos en ausencia de contacto MSC-HPC, se evaluó el número de células CD34+CD38-Lin- presentes en los cultivos a los días 14 y 28 (Figura 14). Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de células CD34+CD38-Lin- obtenidas a partir de la población enriquecida en cada uno de los experimentos al día cero de cultivo (9597±7485 células CD34+CD38-Lin-).

En cultivos en ausencia de citocinas, no fue posible determinar la formación de células CD34+CD38-Lin-, ya que al igual que en cultivos sin MSCs, el número de células obtenido no fue suficiente para realizar el ensayo por citometría de flujo (días 14 y 28).

En cultivos con el coctel seminal, al día 14, se observó una tendencia a incrementar el número de células CD34+CD38-Lin- en presencia de MSCs de MO y SCU (13.07±25.23 y 4.78±6.72 respectivamente) en comparación a cultivos sin MSCs (1.09±0.72) y con MSCs de PL (1.1±0.67). Al día 28, en cultivos con MSCs de las tres fuentes, observamos un incremento significativo de células con este inmunofenotipo (31.8±46.33, 14.19±21.47 y 11.77±20.55 con MSCs de MO, SCU y PL respectivamente) en comparación con cultivos sin MSCs (0.97±1.32; Figura 14).

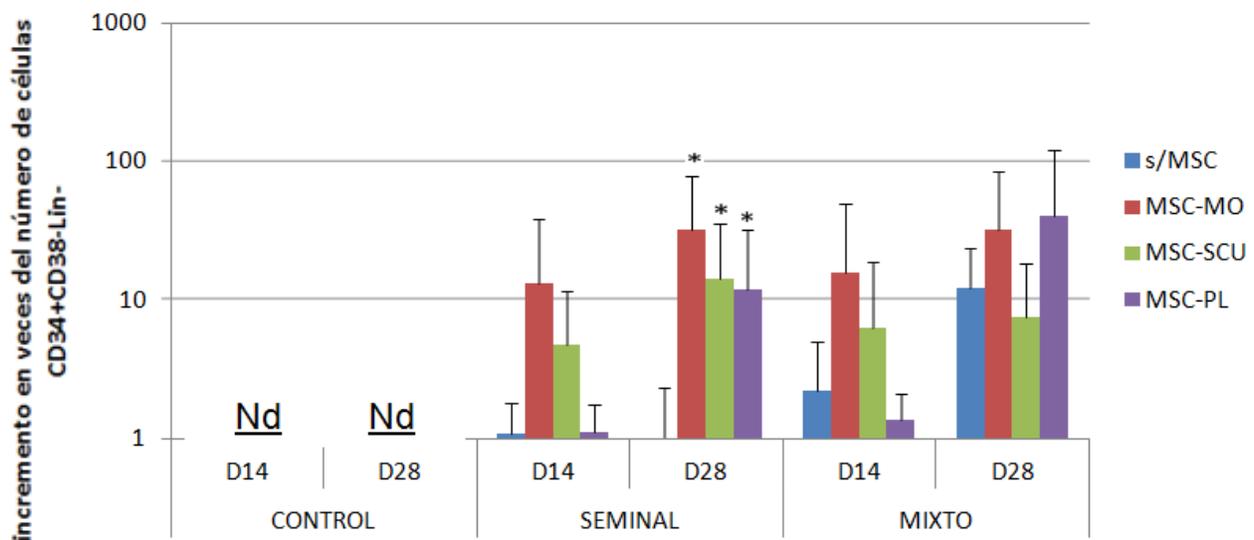


Figura 14. Cinéticas de expansión de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-, cultivadas en ausencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSc) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de células CD34+CD38-Lin-. n=6 *significativamente mayor a su similar sin MSC, p<0.05

En cultivos con el coctel mixto, al día 14, se observó una tendencia a incrementar el número de células CD34+CD38-Lin- en presencia de MSCs de MO y SCU en comparación a cultivos sin MSCs y con MSCs de PL. Al día 28, el incremento fue similar en presencia de MSCs en comparación con cultivos sin MSCs (Figura 14).

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de incrementar la formación de células CD34+CD38-Lin-, entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL, al igual que las MSCs de MO, tienen la capacidad de incrementar la expansión de células CD34+CD38-Lin-, en ausencia de contacto MSCs-HPCs, en presencia del coctel seminal.

3.4.2 Formación de LTC-IC

Para determinar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la formación de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-, en cultivos en ausencia de contacto MSC-HPC, se evaluó el número de LTC-IC presentes en los cultivos a los días 14 y 28 (Figura 15). Los siguientes valores numéricos son mostrados en incremento en veces del número de LTC-IC obtenidas a partir de la población enriquecida en cada uno de los experimentos al día cero de cultivo (122 ± 79 LTC-IC).

En cultivos en ausencia de citocinas, no fue posible determinar la formación de LTC-IC, ya que al igual que en cultivos sin MSCs, el número de células fue insuficiente para realizar el ensayo (días 14 y 28 de cultivo). En cultivos con el coctel seminal, a los días 14 y 28, se observó tendencia a incrementar el número de LTC-IC en presencia de MSCs de las tres fuentes en comparación con cultivos sin MSCs (Figura 15).

En cultivos con el coctel mixto, al día 14, las MSCs de MO tuvieron una mayor tendencia a incrementar el número de LTC-IC (7.3 ± 14.6) en comparación a cultivos con MSCs de SCU y PL así como con cultivos sin MSCs (2.96 ± 5.93 , 1.6 ± 2.6 y 5.54 ± 10.98 respectivamente). De manera similar, al día 28, las MSCs de MO tuvieron

una mayor tendencia a incrementar el número de LTC-IC (2.38 ± 4.75) en comparación a cultivos con MSCs de SCU y PL así como con cultivos sin MSCs (0.06 ± 0.13 , 0.2 ± 0.3 y 0 respectivamente; Figura 15)

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de incrementar el número de LTC-IC entre las MSCs provenientes de las tres fuentes, bajo ninguna de las condiciones de cultivo.

Estos resultados nos indican que las MSCs provenientes de SCU y PL, al igual que las MSCs de MO, tienen la capacidad para favorecer la expansión de LTC-IC, en ausencia de contacto MSCs-HPCs, en presencia del coctel seminal.

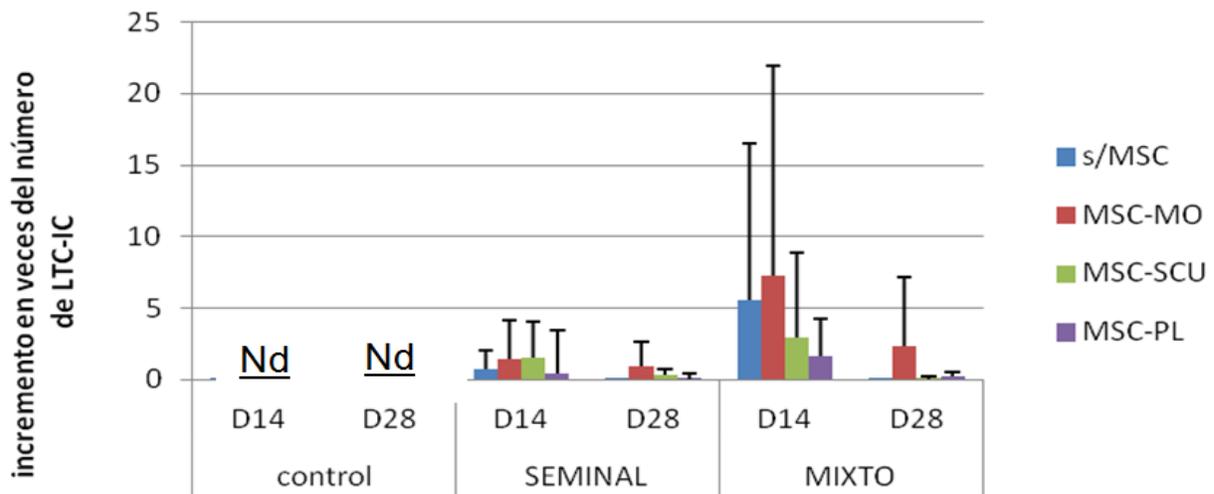


Figura 15. Cinéticas de expansión de LTC-IC de células CD34+CD38-Lin, cultivadas en ausencia de contacto MSCs-HPCs. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), sin citocinas (control) o con los cocteles seminal y mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de LTC-IC-. n=4

4. Comparación de co-cultivos en presencia y ausencia de contacto de MSCs con la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-

Para comparar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL de mantener la formación de células hematopoyéticas totales y HPCs, cuando están en contacto o sin contacto con éstas, se compararon los datos previamente obtenidos por separado de los co-cultivos con o sin contacto MSC-HPC a los días 14 y 28.

4.1 Proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin-

En ausencia de citocinas, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, se presentó una tendencia a incrementar el número de células hematopoyéticas en comparación con cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula (días 14 y 28; Figura 16 a).

En presencia del coctel seminal, al día 14, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, se presentó un incremento significativo en la proliferación de las HPCs con MSCs de MO y PL en comparación a cultivos en donde se inhibió el mismo (444 ± 230 vs 184 ± 152 y 221 ± 97 vs 120 ± 72 , respectivamente), mientras que en presencia de MSCs de SCU, el incremento no fue significativamente diferente (247 ± 171 vs 120 ± 117). Es importante mencionar que al día 28, en cultivos en donde únicamente había citocinas, el incremento fue significativamente mayor en aquellos en donde no se colocó la membrana de nitrocelulosa en comparación con cultivos en donde se colocó la misma (487 ± 682 vs 67 ± 46), debido a ello los incrementos observados en los cultivos sin contacto MSC-HPC podrían verse afectados por la presencia de la membrana (Figura 16 b). Este mismo comportamiento lo observamos con el coctel mixto al día 14, mientras que al día 28, no encontramos diferencias significativas en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 16 c).

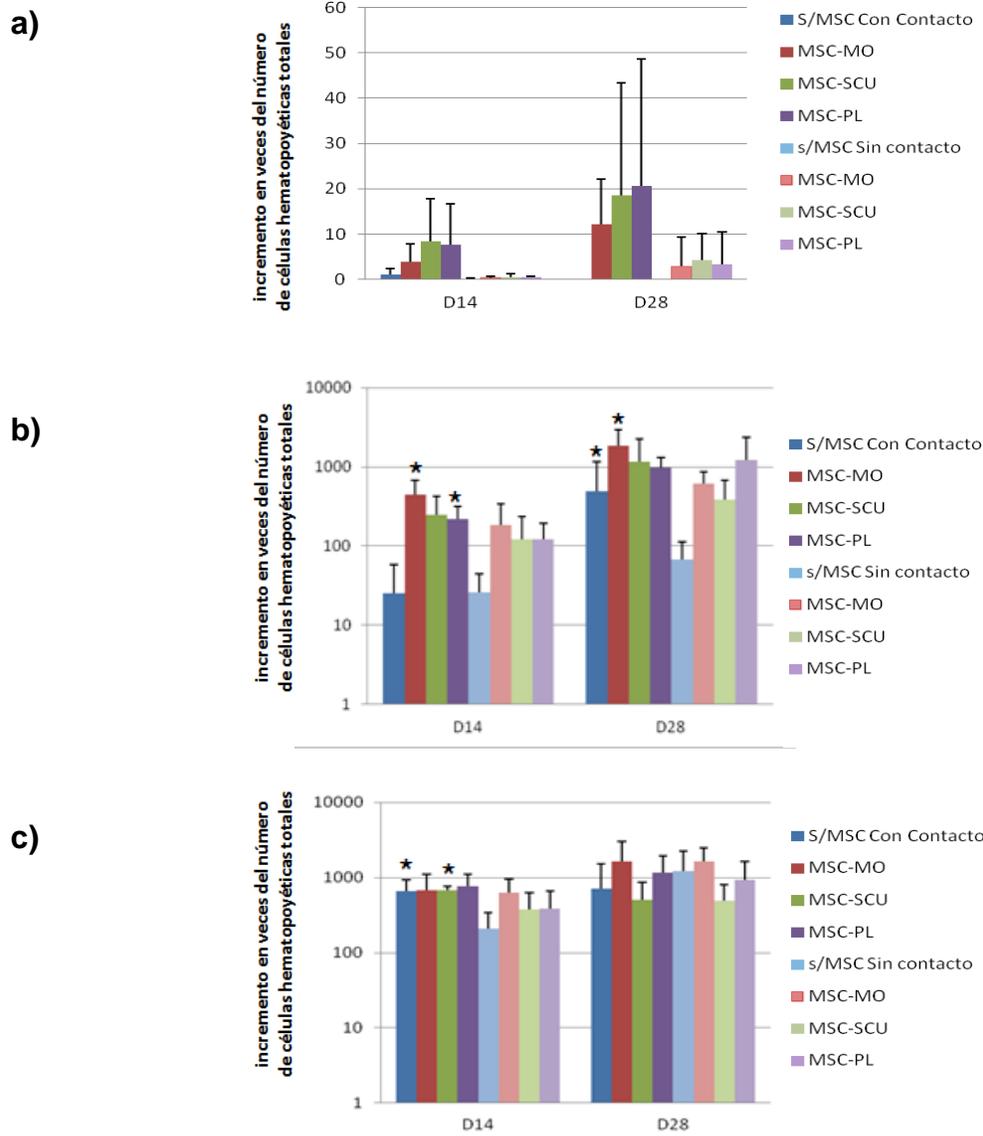


Figura 16. Cinéticas de proliferación de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- cultivadas en presencia o ausencia de contacto MSC-HPC. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), a) sin citocinas (control) o con los cocteles b) seminal y c) mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de células totales. n=6. *significativamente mayor a su similar sin contacto celular, $p < 0.05$

Estos resultados nos indican que en los cultivos con contacto MSC-HPC, se favorece un mayor incremento en la proliferación de HPCs en comparación a aquellos sin contacto, tanto en ausencia de citocinas, como en presencia del coctel seminal.

4.2 Formación de HPCs menos primitivas

4.2.1 Formación de CFC mieloides

En ausencia de citocinas, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, se observó una tendencia a incrementar el número de CFC mieloides en comparación con cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula (Figura 17 a).

En presencia del coctel seminal, a los días 14 y 28 de cultivo, nuevamente observamos diferencias significativas entre los cultivos con y sin membrana, siendo menores los valores obtenidos en aquellos en donde la membrana estuvo presente, debido a ello los incrementos observados en los cultivos sin contacto MSC-HPC podrían verse afectados por la presencia de la misma (Figura 17 b). Este mismo comportamiento lo observamos con el coctel mixto al día 14, mientras que al día 28, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, se observó una tendencia a incrementar el número de CFC mieloides en comparación con cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula (Figura 17 c).

Estos resultados nos indican que en los cultivos con contacto MSC-HPC, se favorece un mayor incremento en la expansión de CFC mieloides en comparación a aquellos sin contacto, tanto en ausencia de citocinas, como en presencia del coctel mixto.

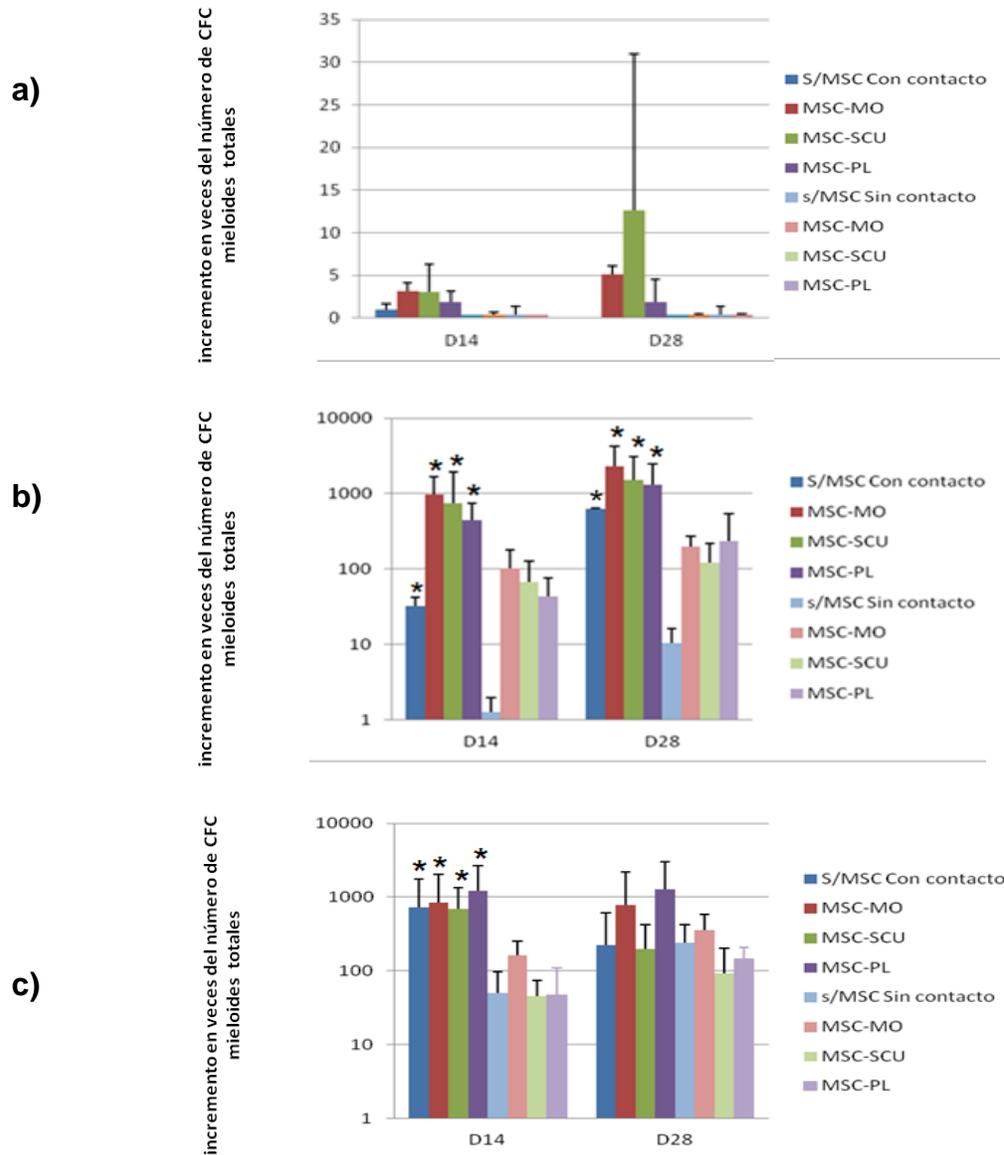


Figura 17. Cinéticas de expansión de CFC mieloides totales de células CD34+CD38-Lin- cultivadas en presencia o ausencia de contacto MSC-HPC. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), a) sin citocinas (control) o con los cocteles b) seminal y c) mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de CFC mieloides. n=6. *significativamente mayor a su similar sin contacto celular, p<0.05

4.2.2 Formación de CFC eritroides

En ausencia de citocinas, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, se observó una tendencia a incrementar el número de CFC eritroides en comparación con cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula (Figura 18 a).

En presencia del coctel seminal, al día 14, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, se observó una tendencia a incrementar el número de CFC eritroides en comparación con cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula. Al día 28, en ausencia de MSCs, nuevamente observamos diferencias significativas entre los cultivos con y sin membrana, siendo menores los valores obtenidos en aquellos en donde la membrana estuvo presente (221 ± 481 vs 0.4 ± 0.7), debido a ello los incrementos observados en los cultivos sin contacto MSC-HPC podrían verse afectados por la presencia de la misma (Figura 18 b).

En presencia del coctel mixto, al día 14, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, con MSCs de PL se presentó un incremento significativo en el número de CFC eritroides en comparación a cultivos en donde se inhibió el mismo, mientras que en presencia de MSCs de MO y SCU, el incremento fue similar con y sin contacto célula-célula. Al día 28, el incremento en el número de CFC eritroides fue similar al obtenido en cultivos en donde se inhibió el contacto MSC-HPC (Figura 18 c).

Estos resultados nos indican que en los cultivos con contacto MSC-HPC, se favorece un mayor incremento en la expansión de CFC eritroides en comparación a aquellos sin contacto, en ausencia de citocinas. Asimismo, el contacto de MSCs de PL con HPCs incrementa de manera significativa la formación de CFC eritroides en presencia del coctel mixto, en comparación a cuando se inhibe el contacto célula-célula.

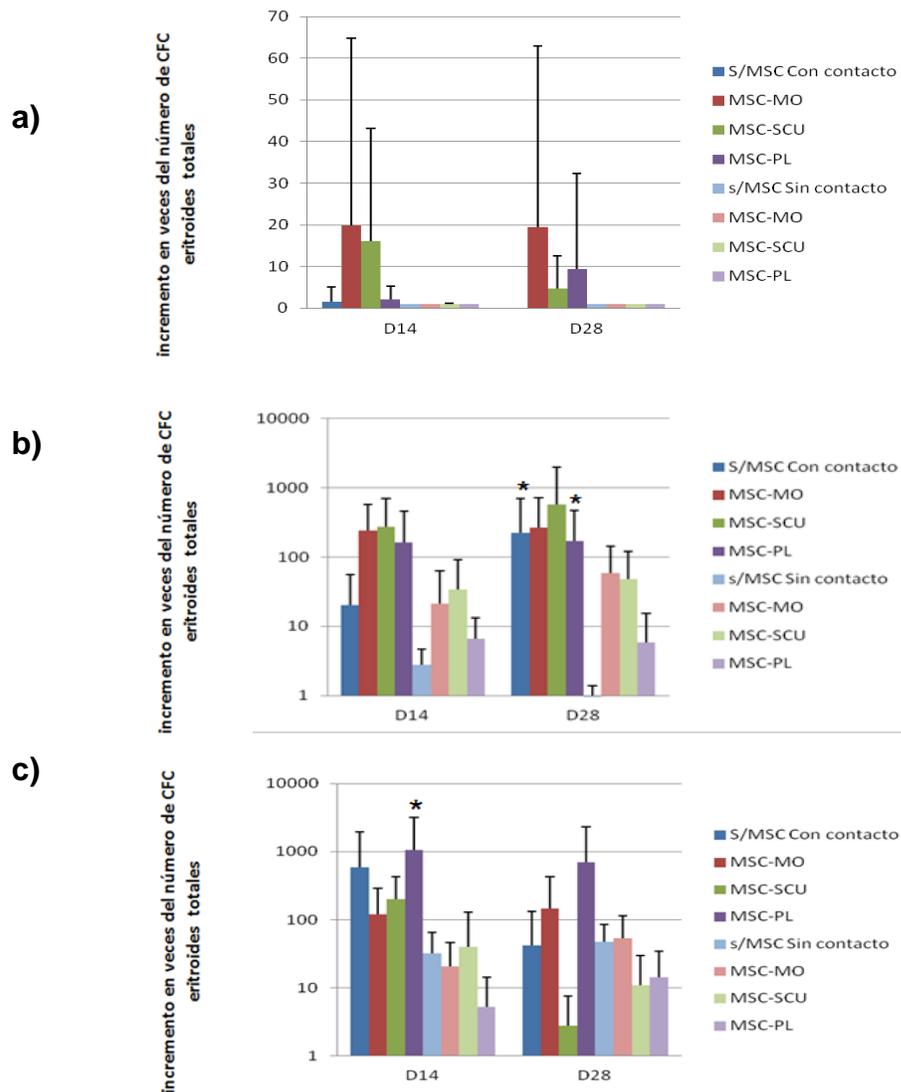


Figura 18. Cinéticas de expansión de CFC eritroides totales de células CD34+CD38-Lin- cultivadas en presencia o ausencia de contacto MSC-HPC. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), a) sin citocinas (control) o con los cocteles b) seminal y c) mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de CFC eritroides totales. n=6. *significativamente mayor a su similar sin contacto celular, $p < 0.05$

4.3 Formación de HPCs más primitivas

4.3.1 Formación de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-

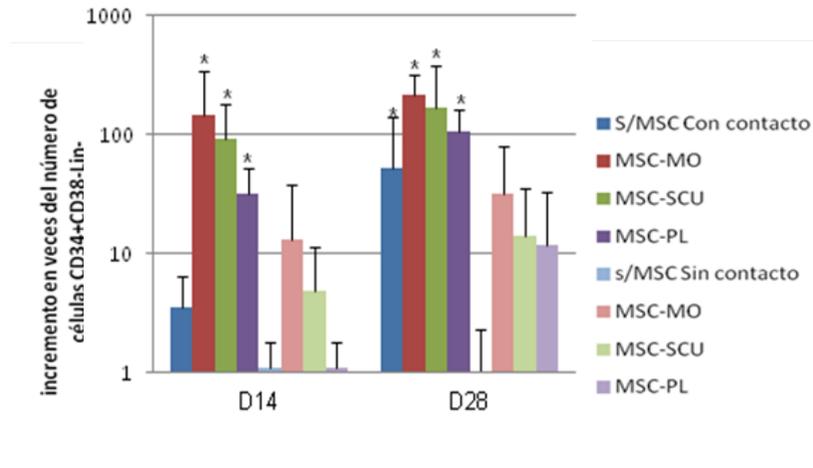
En ausencia de citocinas, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, las MSCs retardaron la pérdida de las células CD34+CD38-Lin-, mientras que en cultivos en donde se inhibió el contacto celular, el número de células obtenido no fue suficiente para realizar el ensayo por citometría de flujo.

En presencia del coctel seminal, al día 14, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, se presentó un incremento significativo en el número de células CD34+CD38-Lin-, en comparación con cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula (146 ± 192 vs 13 ± 25 con MSCs de MO, 91 ± 87 vs 4.7 ± 6.7 con MSCs de SCU y 31 ± 19 vs 1.1 ± 0.6 con MSCs de PL). Al día 28, nuevamente observamos diferencias significativas entre los cultivos con y sin membrana, siendo menores los valores obtenidos en aquellos en donde la membrana estuvo presente (52 ± 88 vs 0.9 ± 1.36), debido a ello, los incrementos observados en los cultivos sin contacto MSC-HPC podrían verse afectados por la presencia de la misma (Figura 19 a).

En presencia del coctel mixto, al día 14, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, se presentó un incremento significativo en el número de células CD34+CD38-Lin-, en comparación con cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula (225 ± 128 vs 15 ± 33 con MSCs de MO, 226 ± 138 vs 6 ± 12 con MSCs de SCU y 186 ± 129 vs 1.3 ± 0.7 con MSCs de PL). Al día 28, no encontramos diferencias significativas entre las condiciones analizadas (Figura 19 b).

Estos resultados nos indican que en los cultivos con contacto MSC-HPC, hay un mayor incremento en la expansión de células CD34+CD38-Lin- en comparación a aquellos sin contacto, en presencia de ambos cocteles de citocinas.

a)



b)

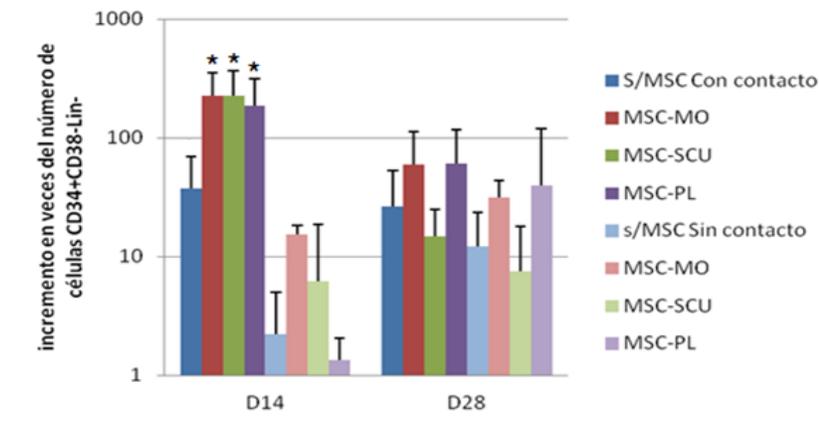


Figura 19. Cinéticas de expansión de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin- cultivadas en presencia o ausencia de contacto MSC-HPC. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), con los cocteles a) seminal y b) mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de células CD34+CD38-Lin-. La detección de los marcadores se realizó mediante citometría de flujo. n=6. *significativamente mayor a su similar sin contacto celular, p<0.05

4.3.2 Formación de LTC-IC

En ausencia de citocinas, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, únicamente en algunos experimentos las MSCs tuvieron la capacidad de retardar la pérdida de las LTC-IC, mientras que en cultivos en donde se inhibió el contacto celular, el número de células obtenido no fue suficiente para realizar los experimentos.

En presencia del coctel seminal, al día 14, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, el incremento en el número de LTC-IC fue similar en comparación con cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula. Al día 28, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, se presentó una tendencia a incrementar el número de LTC-IC, en comparación a cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula (4.8 ± 9.7 vs 0.8 ± 1.7 con MSCs de MO, 2.9 ± 4.7 vs 0.3 ± 0.3 con MSCs de SCU y 4.8 ± 5.2 vs 0.05 ± 0.4 con MSCs de PL; Figura 20 a).

En presencia del coctel mixto, al día 14, en cultivos en donde se permitió el contacto MSC-HPC, las MSCs retardaron la pérdida de LTC-IC, mientras que en cultivos en donde se inhibió el contacto celular, se observó un incremento en el número de éstas, sin embargo, en cultivos en donde únicamente había citocinas, también se presentó un incremento en el número de LTC-IC en aquellos en donde se colocó la membrana en comparación con cultivos en donde no se colocó la misma (0.2 ± 0.3 vs 7.3 ± 14.6 con MSCs de MO, 0.1 ± 0.2 vs 2.9 ± 5.9 con MSCs de SCU, 0.1 ± 0.1 vs 1.6 ± 2.6 con MSCs de PL y 0.1 ± 0.2 vs 5.5 ± 10.9 en cultivos sin MSCs). Al día 28, las MSCs de MO incrementaron el número de LTC-IC cuando se inhibió el contacto MSC-HPC, mientras que las MSCs de SCU y PL, en ambas condiciones de cultivo (contacto y sin contacto célula-célula), únicamente retardaron la pérdida de LTC-IC (Figura 20 b).

Estos resultados nos indican que en los cultivos con contacto MSC-HPC, se favorece la expansión de LTC-IC en comparación a aquellos sin contacto, en presencia del coctel seminal. Por otro lado, en presencia del coctel mixto, se observó una tendencia a incrementar el número de LTC-IC ya sea en ausencia de MSCs o sin contacto MSC-HPC.

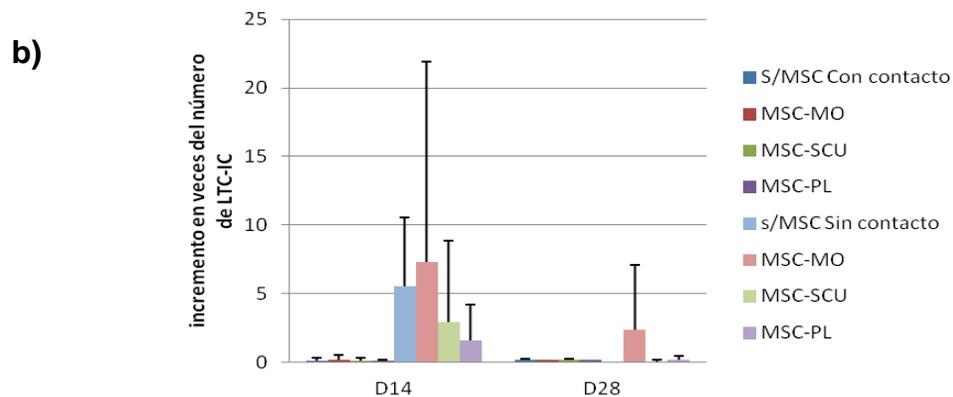
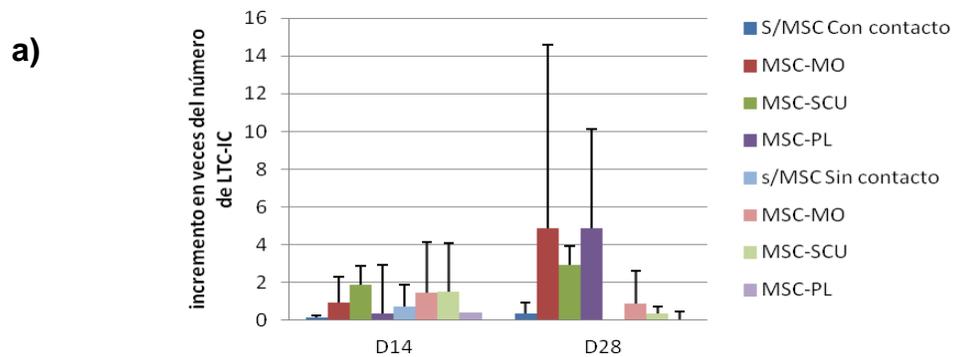


Figura 20. Cinéticas de expansión de LTC-IC de células CD34+CD38-Lin- cultivadas en presencia o ausencia de contacto MSC-HPC. Cultivos en ausencia (S/MSC) o en presencia de MSCs de MO (MSC-MO), SCU (MSC-SCU) y PL (MSC-PL), con los cocteles a) seminal y b) mixto, a los días 14 y 28 de cultivo. Datos mostrados en incremento en veces del número de LTC-IC. n=4

DISCUSION

Por sus características, incluyendo la capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos celulares y de expresar y secretar factores tróficos, es decir, moléculas que favorecen la recuperación de tejidos dañados (Caplan y Dennis, 2006; Li et al 2005; Pak et al, 2003; Murphy et al, 2003), las MSCs representan una herramienta promisorio para su uso en la investigación y en la clínica dentro del campo de la terapia celular. De manera particular, debido a que las MSCs originan a la mayoría de las células estromales de la MO, incluyendo las que forman el nicho de las HSCs (Nagasawa et al, 2011), favorecen la expansión de HPCs in vitro (Zhang et al, 2006; Robinson et al, 2006), así como el homing e injerto de las HSCs y HPCs dentro de la MO y una recuperación hematopoyética más rápida (Noort et al, 2002; Ball et al, 2007; 2008; Le Blanc et al 2007; Meuleman et al, 2009), las MSCs son una herramienta prometedora para mejorar el TCH en pacientes con enfermedades hematológicas.

Actualmente la MO es la principal fuente de MSCs, sin embargo, presenta algunos inconvenientes, entre ellos, la toma de muestras representa un método doloroso y agresivo para el donador y el número y la capacidad de proliferación y diferenciación de las MSCs disminuyen conforme aumenta la edad del mismo (D'ippolitto et al, 1999; Romanov et al, 2003). Debido a lo anterior, ha sido necesaria la obtención de MSCs a partir de fuentes alternativas. En nuestro grupo de investigación hemos obtenido MSCs de SCU y PL (Montesinos et al, 2009), lo que representa una interesante opción por las ventajas que tienen sobre la MO, ya que estos dos tejidos se consideran desechos biológicos y se puede obtener el número de muestras que se deseen, además su obtención no ocasiona algún riesgo para los donadores (madre o recién nacido) y las células son ontogénicamente más jóvenes.

Aunque las MSCs de SCU y PL presentan características biológicas similares a las provenientes de MO, tales como su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación hacia el linaje ostogénico, adipogénico y condrogénico (Montesinos et al, 2009), no sabemos si tienen la misma capacidad de mantener la formación in vitro de HPCs que las MSCs de MO. En este proyecto se realizó un estudio comparativo de la capacidad de las MSCs provenientes de MO, SCU y PL, para mantener la formación in

vitro de HPCs a partir de la población enriquecida en células CD34+CD38-Lin- de SCU, bajo las mismas condiciones de cultivo.

Tal como reportamos anteriormente, las MSCs se encontraron y se obtuvieron de manera más frecuente en MO, seguido de PL y por último en SCU. En los cultivos de MSCs de SCU y PL que se utilizaron en este trabajo, igual que con MSCs de MO, detectamos subpoblaciones celulares con diferente morfología: *grandes*, *fibroblastoides* y *neurales* de las cuales, no sabemos si su morfología tiene relación con alguna característica biológica de las mismas. También encontramos células *pequeñas* en cultivos de MSCs de las tres fuentes, de las cuales ya se había reportado su presencia en MSCs de MO, en donde se caracterizaron por tener un alto potencial de proliferación y de injerto en modelos murinos (Colter et al, 2001; Lee et al, 2006).

Las MSCs de MO, SCU y PL, presentaron un inmunofenotipo característico de MSCs, de esta manera, expresaron CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD166 y no se detectó la expresión de marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34 y CD45 así como la expresión de CD31 y HLA-DR (Dominici et al, 2006).

Se observó un porcentaje de expresión heterogéneo de CD29 (β 1-integrina) en MSCs de SCU ($86.6 \pm 26.2\%$), que es una molécula involucrada en el homing, injerto (Bungartz et al, 2006; Brakebusch et al, 2002) y autorrenovación de las HSCs (Gottschling et al, 2007), mientras que en MSCs de MO y PL su expresión fue alta y homogénea ($99 \pm 0.1\%$ y $98.3 \pm 1\%$ respectivamente), debido a lo anterior, pudiéramos pensar que las MSCs de MO y PL favorecen un mejor homing e injerto de las HSCs en el TCH en comparación con las MSCs de SCU. La expresión de la molécula de adhesión CD166 (ALCAM), se presentó de manera heterogénea en las muestras de MSCs de las 3 fuentes ($75.1 \pm 9.2\%$; $81.4 \pm 18.8\%$ y $73.6 \pm 26.7\%$ en MSCs MO, SCU y PL respectivamente). De igual manera, la expresión de CD54 (ICAM), molécula de adhesión altamente expresada en células endoteliales y pericitos, presentó un porcentaje de bajo a medio de manera muy heterogénea entre las MSCs de las tres fuentes, siendo expresada en menor porcentaje en MSCs de MO ($17.4 \pm 21.3\%$; $58.3 \pm 40.6\%$ y $39.4 \pm 37.9\%$ en MSCs

MO, SCU y PL respectivamente). Aunque la expresión de estas moléculas es heterogénea en las MSCs de las tres fuentes (ALCAM e ICAM), las diferencias no fueron significativas, por lo que su expresión en MSCs de SCU y PL puede favorecer su capacidad de mantener la formación de HPCs in vitro, al igual que sucede con las MSCs de MO. Diferencias significativas en la expresión de CD49b, fueron observadas, dado que su expresión fue baja en MSCs de MO en comparación con MSCs de SCU y PL ($24.5\pm 3.5\%$, $72.4\pm 25.2\%$ y $97.5\pm 1.4\%$ respectivamente), es importante mencionar que este marcador podría estar involucrado en el contacto de las MSCs con las HSCs (Papayannopoulou et al, 2001).

Las MSCs de las tres fuentes también tuvieron la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Montesinos et al, 2009). Por lo que las MSCs de SCU y PL que se utilizaron en este trabajo, igual que las MSCs de MO, cumplieron con las características biológicas determinadas por la ISCT para las MSCs (Dominici et al, 2006).

1. Co-cultivos de MSCs de MO, SCU y PL con HPCs de SCU

Cabe mencionar, que si bien, muy pocos trabajos reportan resultados comparando la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs de MO y SCU ó de MO y PL, ninguno reporta un estudio comparativo con MSCs de las tres fuentes en las mismas condiciones de cultivos, ni los parámetros medidos en este trabajo.

1.1 Co-cultivos de MSCs de MO, SCU y PL con HPCs de SCU: en presencia de contacto célula-célula

Con el objetivo de analizar y comparar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL para mantener la formación in vitro de HPCs, se realizaron co-cultivos permitiendo el contacto MSC-HPC. Para tales experimentos, se procesaron muestras de SCU y las CMNs obtenidas se enriquecieron en una población de HPCs con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-.

Las MSCs de las tres fuentes en ausencia de citocinas presentaron la misma capacidad de incrementar la proliferación de las HPCs y la expansión de CFC de linaje mieloide y eritroides, así como de retardar la pérdida de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin- y LTC-IC (a excepción de MSCs de PL, quienes sí incrementaron el número de células CD34+CD38-Lin- al día 14) en comparación con cultivos sin MSCs, en donde las células hematopoyéticas disminuyeron desde los primeros días de cultivo.

Nuestros resultados coinciden con los de otros grupos en donde también encuentran que las MSCs de PL tiene la misma capacidad de incrementar la proliferación de HPCs y la expansión de CFC y de células CD34+ que las MSCs de MO. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados en donde las MSCs de MO y PL únicamente retardan la pérdida de las LTC-IC, Zhang y cols., encontraron un incremento en su expansión (1.66 ± 0.56 y 2.16 ± 0.55 incremento en veces con MSCs de MO y PL respectivamente; Zhang et al 2004).

Otros grupos también encontraron que las MSCs de SCU tienen la capacidad de mantener la formación de células primitivas (células CD34+CD38- y LTC-IC, Wagner et al, 2007 a), mientras que otros estudios reportan la capacidad de las MSCs de SCU para expandir CFC de linaje mieloide (Wang et al, 2004 b). Igual que nosotros, en ningún estudio encuentran diferencias significativas en la capacidad de soportar la hematopoyesis entre las MSCs provenientes de MO y SCU ó de MO y PL.

Estos resultados nos indican que bajo las mismas condiciones de cultivo, las MSCs provenientes de SCU y PL tienen la capacidad de producir factores que son importantes para la proliferación y la expansión de HPCs menos primitivas (CFC mieloides y eritroides), así como para favorecer el mantenimiento de las HPCs más primitivas (células CD34+CD38-Lin- y LTC-IC), al igual que las MSCs de MO.

En presencia de citocinas del coctel seminal (SCF, FL, TPO e IL-6), la capacidad de las MSCs de las tres fuentes para incrementar la proliferación de las HPCs (días 14 y 28) y la expansión de CFC mieloides y eritroides (día 14) y células CD34+CD38-Lin- (días 14 y 28), fue mayor en comparación con cultivos en donde se encontraban únicamente uno de los dos componentes (MSCs ó citocinas). Las LTC-IC

también presentaron un incremento en su número en cultivos con MSCs de las tres fuentes y aunque no fue significativo, la tendencia indica que las MSCs favorecen su expansión.

Hay estudios que reportan que las MSCs de PL tienen mayor capacidad de incrementar la proliferación y expansión de HPCs en presencia de citocinas, en comparación con MSCs de MO (Zhang et al 2004), lo cual no coincide con nuestras observaciones. Por otro lado, no hay estudios reportados sobre la comparación de la capacidad de soporte hematopoyético entre MSCs de MO y de SCU en presencia de citocinas exógenas, sin embargo, existen estudios que reportan que MSCs de SCU en presencia de citocinas incrementan la proliferación de células CD34+ y expansión de CFC (Wang et al, 2004 b).

Nuestros datos demuestran la presencia de un efecto sinérgico entre las MSCs de MO y citocinas del coctel seminal, al incrementar la proliferación y expansión de HPCs, lo cual ya había sido reportado por otros grupos (Walenda et al, 2011), sin embargo, además de confirmar este efecto, nosotros determinamos que las MSCs de SCU y PL tienen la capacidad de incrementar la proliferación y expansión de HPCs de manera sinérgica con citocinas de acción temprana (citocinas del coctel seminal), al igual que las MSCs de MO. Asimismo no podemos descartar la posibilidad de que las citocinas adicionadas al cultivo estimulen a las MSCs para producir mayor cantidad de factores que favorezcan la hematopoyesis, aunque aún no se tiene respuesta respecto a ello.

Es importante mencionar que la concentración de citocinas que nosotros usamos es mucho menor a la que usa la mayoría de los grupos en los cultivos con MSCs (hasta 5 o 10 veces menos: Zhang et al 2004 y Wang et al, 2004 b) y aún así obtenemos el mismo efecto de sinergia, lo que hace más eficiente el modelo usado en nuestro trabajo.

En cultivos con MSCs de las tres fuentes y en presencia del coctel mixto (SCF, FL, TPO, IL-6, GM-CSF, G-CSF e IL-3), el incremento en la proliferación de HPCs y expansión de CFC mieloides y CFC eritroides, fue similar al observado en cultivos sin MSCs, estos resultados ya habían sido reportados con MSCs de MO (Flores-Guzmán

et al, 2009), por lo que además de confirmarlos, en este trabajo se demostró que al igual que las MSCs de MO, el incremento en la proliferación y expansión de HPCs menos primitivas producido por MSCs de SCU y PL, se puede obtener con el coctel mixto, lo que haría pensar que la presencia de las MSCs es innecesaria. Con estos resultados y los obtenidos en los cultivos de MSCs con el coctel seminal, podríamos decir que dentro de los factores que pudieran producir las MSCs en estos últimos cultivos, sean citocinas como GM-CSF, G-CSF e IL-3, que tendrían el mismo efecto que el coctel mixto. A pesar de que se obtienen valores similares en la proliferación de HPCs y expansión de CFC en dichas condiciones, sería importante analizar si estas CFC tienen las mismas características biológicas y funcionales, dado que se forman en distintas condiciones de expansión.

El incremento en la formación de células CD34+CD38-Lin- en presencia del coctel mixto, fue mayor en cultivos con MSCs de las tres fuentes en comparación con cultivos sin MSCs (día 14). Esto nos indica que las MSCs también producen moléculas que incrementan la expansión de las HPCs más primitivas (células CD34+CD38-Lin-) y que también actúan de manera sinérgica con las citocinas del coctel mixto, ó bien, que las citocinas de este coctel estimulan a las MSCs para producir factores que incrementan su capacidad de expandir HPCs primitivas.

Es importante mencionar que no hay datos reportados de la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs de SCU y PL en presencia de citocinas de acción tardía (citocinas del coctel mixto).

1.2 Co-cultivos de MSCs de MO, SCU y PL con HPCs de SCU: en ausencia de contacto célula-célula

Con el objetivo de analizar y comparar la capacidad de las MSCs de MO, SCU y PL para mantener la formación in vitro de HPCs, cuando se inhibe el contacto MSC-HPC y saber la participación de los factores que secretan las MSCs en la proliferación y expansión de HPCs, se realizaron co-cultivos MSC-HPC inhibiendo su contacto mediante la presencia de una membrana de nitrocelulosa. Para tales experimentos se procesaron muestras de SCU y las CMNs obtenidas se enriquecieron en una población de HPCs con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-.

En ausencia de citocinas, las MSCs de las tres fuentes presentaron la misma capacidad de incrementar la proliferación de las HPCs, sin embargo, no tuvieron la capacidad de incrementar la formación de CFC de linaje mieloide y eritroide, pero sí de mantener su formación con MSCs de SCU y retardar su pérdida con MSCs de MO y PL a lo largo del cultivo. No se pudo determinar la presencia de células con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin- ni la formación de LTC-IC, ya que el número de células obtenido a los diferentes días de cultivo no fue suficiente para realizar estos experimentos. Esto indica que al igual que las MSCs de MO, las provenientes de SCU y PL, producen factores solubles que incrementan la proliferación de las HPCs y el mantenimiento de las CFC de linajes mieloide y eritroide, sin embargo, no se comprobó en estos experimentos si las MSCs secretan factores solubles que favorezcan la expansión de HPCs primitivas.

En presencia del coctel seminal, la capacidad de las MSCs de las tres fuentes para incrementar la proliferación de las HPCs y la expansión de CFC mieloides y eritroides (días 14 y 28) y células CD34+CD38-Lin- (día 28), fue mayor en comparación con cultivos en donde se encontraban únicamente uno de los dos componentes (MSCs ó citocinas), estos resultados son similares a los reportados por el grupo del Dr. Mayani y cols, con MSCs de MO (Flores-Guzman et al, 2009). En presencia de las MSCs de las tres fuentes se favoreció el incremento en el número de LTC-IC. Esto nos indica que al igual que las MSCs de MO, las provenientes de SCU y PL producen factores solubles que actúan de manera sinérgica con las citocinas del coctel seminal y que tales factores son importantes para la proliferación, la expansión de HPCs menos primitivas (CFC mieloides y eritroides) y la expansión de HPCs más primitivas (células CD34+CD38-Lin-), contrario a otros grupos, quienes han reportado que la expansión de HPCs se lleva a cabo únicamente en contacto con el estroma (Punzel et al, 2003).

En cultivos con MSCs de las tres fuentes y en presencia del coctel mixto, el incremento en la proliferación de HPCs y expansión de CFC mieloides, CFC eritroides y células CD34+CD38-Lin-, fue similar al observado en cultivos sin MSCs. En el caso de las LTC-IC, únicamente en un experimento al día 28, las MSCs de MO tuvieron la capacidad de incrementar su número.

Cabe mencionar que el incremento en la proliferación de las HPCs y la expansión de CFC y células CD34+CD38-Lin⁻ en cultivos en presencia de MSCs de las tres fuentes y el coctel seminal, es similar al incremento obtenido sólo con el coctel mixto. Estos resultados nos podrían indicar nuevamente, que dentro de los factores que producen las MSCs en cultivos con el coctel seminal, pudieran encontrarse citocinas como GM-CSF, G-CSF e IL-3, debido a ello, su efecto podría ser similar al obtenido con el coctel mixto, no obstante, sería importante analizar si estas HPCs formadas por una u otra condición de cultivo, tienen las mismas características biológicas y funcionales, tal como la capacidad para reconstituir la hematopoyesis en modelos murinos en el caso de las células CD34+CD38-Lin⁻.

Es importante mencionar que no hay datos reportados de la capacidad de soporte hematopoyético de MSCs de SCU y PL en ausencia de contacto MSC-HPC ya sea con o sin citocinas exógenas.

1.3 Co-cultivos de MSCs de MO, SCU y PL con HPCs de SCU: comparación de co-cultivos en presencia y ausencia de contacto célula-célula

Tanto en ausencia de citocinas como en presencia del coctel seminal (día14) y aunque sólo en algunos casos la diferencia fue significativa, se encontraron valores más altos en la proliferación de células hematopoyéticas, en cultivos de HPCs que estuvieron en contacto con las MSCs, en comparación con cultivos en ausencia del contacto MSC-HPC, mientras que con el coctel mixto, no se observaron diferencias en cultivos en ausencia o presencia del contacto celular. Estos resultados nos podrían indicar que el efecto de los factores solubles y de las moléculas de membrana producidas por las MSCs, para incrementar la proliferación de HPCs, se puede obtener con citocinas del coctel mixto, tal efecto ya había sido observado por otros grupos con MSCs de MO (Flores-Guzmán et al, 2009), sin embargo no se había reportado para MSCs de SCU y PL.

En ausencia de citocinas, se favoreció el incremento en el número de CFC mieloides y eritroides en cultivos en presencia de contacto MSC-HPC en comparación a cultivos en su ausencia y la misma tendencia se observó en cultivos en presencia del coctel mixto al día 28.

En cultivos en presencia del coctel seminal (días 14 y 28) y el coctel mixto al día 14, el incremento en la expansión de CFC mieloides y eritroides fue mayor en contacto que sin contacto, sin embargo, también observamos diferencias significativas entre los cultivos con y sin membrana, siendo menores los valores obtenidos en aquellos en donde la membrana estuvo presente, debido a ello los incrementos observados en los cultivos sin contacto MSC-HPC podrían verse afectados por la presencia de la misma, este efecto se podría deber al incremento en la densidad celular que se da al momento de disminuir el volumen por la presencia de la membrana en el pozo del cultivo, lo cual produce que las células hematopoyéticas estén más en contacto entre sí, esta situación podría influir en la disminución de su potencial para formar CFC, por lo que no podemos determinar si esta disminución en el número de progenitores se debe a la inhibición del contacto MSC-HPC, ó por el incremento en la densidad de las células hematopoyéticas.

La mejor condición de cultivo para la expansión de CFC mieloides y eritroides, es en contacto con MSCs con el coctel seminal, ó, en presencia de únicamente el coctel mixto. Estos resultados nos indican que el efecto tanto de los factores solubles como las moléculas de membrana producidas por las MSCs para incrementar la expansión de CFC podría ser alcanzado con citocinas del coctel mixto, sin embargo, para determinar si los progenitores obtenidos con ambas condiciones de cultivo son similares, es necesario analizar y comparar más características biológicas y funcionales de los mismos, tales como su potencialidad (es decir, si forman colonias o burst del linaje eritroide; ó colonias de granulocitos-monocitos o sólo uno de los dos linajes mieloides, en el caso de las CFC eritroides y CFC mieloides respectivamente), el largo de sus telómeros y el estado del ciclo celular.

El incremento en la expansión de células CD34+CD38-Lin- fue significativo en contacto que sin contacto con MSCs, en presencia de los cocteles seminal y mixto al día 14. En cultivos con el coctel seminal al día 28, el incremento en la expansión células CD34+CD38-Lin- fue significativo en contacto con MSCs en comparación con cultivos sin contacto, sin embargo, también observamos diferencias significativas entre los cultivos con y sin membrana, siendo menores los valores obtenidos en aquellos en donde la membrana estuvo presente, debido a ello los incrementos

observados en los cultivos sin contacto MSC-HPC podrían verse afectados por la presencia de la misma, tal como sucede con las HPCs menos primitivas, por lo que no podemos determinar si esta disminución en el número de células CD34+CD38-Lin-se debe a la inhibición del contacto MSC-HPC, ó por el incremento en la densidad de las células hematopoyéticas.

El mayor incremento en la expansión de células CD34+CD38-Lin-, fue en cultivos en contacto con MSCs en presencia del coctel mixto. Sin embargo, para comparar a las células CD34+CD38-Lin- obtenidas de cultivos en contacto con MSCs ya sea en presencia del coctel seminal o del coctel mixto, es necesario analizar características como el largo de sus telómeros, el estado del ciclo celular y su funcionalidad in vivo en experimentos de repoblación hematopoyética en MO de modelos murinos.

Aunque no se encontraron diferencias significativas en la expansión de LTC-IC, los resultados obtenidos en cultivos con contacto y sin contacto MSC-HPC, son muy interesantes, ya que en cultivos con contacto célula-célula, el incremento fue mayor en presencia del coctel seminal al día 28, mientras que en cultivos en donde se inhibió el contacto, el mayor incremento fue con el coctel mixto y no necesariamente en presencia y/o contacto de MSCs, pero si en presencia de la membrana de nitrocelulosa al día 14. Estos resultados nos indican que el contacto de las HPCs con las MSCs en combinación con las citocinas del coctel seminal expande y mantiene más tiempo a las LTC-IC, mientras que sin contacto con MSCs y en presencia del coctel mixto las LTC-IC se expanden pero no mantiene su formación hasta el día 28.

Cabe mencionar que en los experimentos de LTC-IC de las células hematopoyéticas obtenidas en los cultivos con contacto MSC-HPC, se utilizó el medio de cultivo comercial Methocult de la compañía Stem Cells, mientras que en los experimentos sin contacto célula-célula, se utilizó un medio de cultivo con los mismos componentes que el anterior, pero preparado en el laboratorio con reactivos individuales, con el cual se encontró una mayor formación de LTC-IC en comparación con el medio comercial. Sin embargo, ya que las diferencias no fueron significativas, es necesario incrementar el número de experimentos usando el mismo medio de

cultivo para concluir respecto a este tema, así como comparar características biológicas de las LTC-IC obtenidas en las diferentes condiciones de cultivo (el largo de sus telómeros y el estado del ciclo celular) y su funcionalidad in vivo (experimentos de repoblación hematopoyética en MO de modelos murinos).

Hasta hace tiempo, se pensaba que el principal mecanismo de las MSCs para favorecer la hematopoyesis, era a través de la secreción de citocinas solubles (Horwitz et al, 2009), sin embargo, actualmente ha sido reportado por muchos grupos, que el contacto de MSCs de MO con HPCs es sumamente importante para la expansión de HPCs primitivas (Gottschling et al, 2007; Flores-Guzman et al, 2009; Wein et al, 2010, Schajnovitz et al, 2011), además se ha reportado que las MSCs de MO expresan a nivel de membrana moléculas importantes para la quiescencia, sobrevivencia, mantenimiento y homing de las HSCs y HPCs, tales como CXCL12, N-cadherina, angiopoyetina e integrinas- β 1, además de producir moléculas de la MEC que interactúan con las células hematopoyéticas más primitivas y mantienen su quiescencia como colágeno, fibronectina, laminina, y proteoglicanos (Gottschling et al, 2007). Incluso, se ha reportado que in vitro, células hematopoyéticas que mantienen un inmunofenotipo más inmaduro se encuentran por debajo de las MSCs de MO, mientras que las que están sobre ellas, son menos primitivas (Jing et al, 2010).

En este trabajo además de confirmar los resultados obtenidos por otros grupos en donde el contacto MSCs de MO y HPCs incrementa la proliferación y expansión de estas últimas, determinamos que las MSCs de SCU y PL tienen la misma capacidad que las de MO para incrementar la proliferación de HPCs y la expansión de progenitores mieloides y eritroides, así como de células CD34+CD38-Lin- y LTC-IC, mediante el contacto célula-célula.

También se determinó que las MSCs de SCU y PL, igual que las de MO, son capaces de producir factores solubles que favorecen la proliferación de HPCs y la expansión de CFC (esto en ausencia de citocinas, ya que en presencia de las mismas, no se pudo determinar si la disminución en la expansión de HPCs en cultivos sin contacto, se debía al incremento en la densidad celular hematopoyética por la presencia de la membrana).

Debido al bajo número de células que obtuvimos en los cultivos sin contacto MSC-HPC y sin citocinas, no pudimos determinar si los factores solubles producidos por las MSCs de las tres fuentes tienen la capacidad de expandir HPCs primitivas. No obstante, sí pudimos demostrar una mayor expansión de células CD34+CD38-Lin-en cultivos en presencia de contacto MSC-HPC en presencia de los cocteles seminal y mixto, en comparación con cultivos en donde se inhibió el contacto célula-célula, respecto a lo cual no hay datos reportados en literatura.

A pesar de que hay estudios que reportan la producción de citocinas por parte de las MSCs de MO (Wagner et al, 2007a; Horwitz y Prather, 2009; Schajnovitz et al., 2011) y en muy pocos, la producción de citocinas por parte de las MSCs de SCU y PL (Hwang et al, 2009), a diferencia de MSCs de MO, aún no hay información acerca de qué moléculas de membrana se expresen en las MSCs de SCU y PL que favorezcan la expansión de HPCs. Tampoco hay estudios en donde se explique cómo es que la capacidad de las MSCs para expandir HPCs primitivas, incrementa significativamente en cultivos en presencia de citocinas exógenas, en donde podría estar ocurriendo un efecto de sinergia entre los factores que producen las MSCs y las citocinas exógenas, ó que estas últimas estimulen a las MSCs y para producir mayor cantidad de factores que favorezcan la expansión de HPCs.

Cabe mencionar, que a pesar de las diferencias encontradas en la expresión de algunas moléculas relacionadas con el soporte hematopoyético entre las MSCs de MO, SCU y PL, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de soportar la formación de HPCs entre las MSCs de las tres fuentes.

CONCLUSIONES

Las MSCs provenientes de SCU y PL tienen la misma capacidad de incrementar la proliferación y expansión de HPCs que las MSCs de MO.

La expansión de HPCs es mayor en contacto con MSCs de las tres fuentes que sin contacto con ellas.

Las MSCs provenientes de SCU y PL al igual que las de MO, pudieran ser utilizadas en trasplante de células hematopoyéticas.

PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos in vitro, las perspectivas de este trabajo son las siguientes:

Determinar las características biológicas y funcionales de las HPCs obtenidas de los cultivos con MSCs de las tres fuentes en presencia del coctel seminal y compararlas con las obtenidas con el coctel mixto.

Analizar la capacidad de las MSCs de SCU y PL para producir moléculas de matriz extracelular, moléculas de adhesión y citocinas relacionadas con la expansión de las HPCs.

Analizar la capacidad de las MSCs de SCU y PL para favorecer el injerto y la recuperación hematopoyética en trasplantes de células hematopoyéticas en modelos murinos.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

Ball L, Bernardo M, Roelofs H, Lankester H, Cometa A, Egeler R, Locatelli and Fibbe W. Cotransplantation of ex vivo–expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007; 110: 2764-2767

Ball L, Bernardo M, Locatelli F and Egeler R. Potential role of mesenchymal stromal cells in pediatric hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 42: S60-S66

Bennet J, Joyner C, Triffitt J, Owen M. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991; 99: 131-139

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

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

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

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

Bobis S, Jarocho D, Makja M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 215-230

Brakebusch C, Fillatreau S, Potocnik AJ, Bungartz G, Wilhelm P, Svensson M, Kearney P, Körner H, Gray D, Fässler R. β 1 integrin is not essential for hematopoiesis but is necessary for the T cell-dependent IgM antibody response. *Immunity* 2002; 16: 465-477

Bungartz G, Stiller S, Bauer M et al. Adult murine hematopoiesis can proceed without beta1 and beta7 integrins. *Blood* 2006; 108: 1857-1864

Campagnoli C, Roberts I, Kumar C, Bennet P, Bellantuono I, Fisk N. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 2001; 98: 2396-2402

Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650

Caplan A. The mesengenic process. *Clin Plastic Surg* 1994; 21: 429-435

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

Colter D, Sekiya I, Prockop D. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7841-7845

D'ippolito G, Sciller P, Roos B, Howard G. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1115-1122

Da Silva M, Caplan A, Beyer N. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 2287-2299

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

Day K, Shefer G, Richardson J, Enikolopov G, Yablonka-Reuveni Z. Nestin–GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 2007; 304: 246-259

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

De Haan G, Weersing E, Dontje B, van Os R, Bystrykh LV, Vellenga E, Miller G. In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev Cell.* 2003; 4: 241-251

Dennis J and Caplan A. Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *J Cell Physiol* 1996; 167: 523-538

Dennis J, Merriam A, Awadallah, Yoo J, Johnstone B, Caplan A. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 700-709

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

Docheva D, Haasters F and Schieker M. Mesenchymal stem cells and their cell surface receptors. *Current Rheumatology Reviews*, 2008, 4, 000-000

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

Ehninger A and Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* 2011; 208: 421-428

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

Fajardo O. Análisis comparativo de la morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación de las células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea y sangre de cordón umbilical. Tesis de licenciatura, 2008

Fang B, Li N, Song Y, Li J, Zhao RC, Ma Y. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant*. 2009; 13: 499-502

Fernández M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell J. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 265-271

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

Flores-Figueroa E, Montesinos J, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigacion Clinica* 2006; 58: 498-511

Flores-Guzman P. Proliferación y expansión in vitro de células progenitoras hematopoyéticas humanas presentes en la sangre de cordón umbilical. Tesis de Doctorado 2006; 21-22

Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Montesinos J, Martínez-Jaramillo G, Fernández-Sánchez V, Valencia-Plata I, Alarcón-Santos G and Mayani H. Individual and combined effects of mesenchymal stromal cells and recombinant stimulatory cytokines on the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2009; 11: 886-896

Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryo Exp Morph* 1966; 16: 381-390

Friedenstein A. Determined and inducible osteogenic precursor cells, 1973. In: *Hrd tissue Growth, repair and remineralization* (Elliott K, Fitzsimons D, eds.) Elsevier-Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam pp 169-185

Friedenstein A, Deriglasova U, Kulagina N, Panasuk A, Rudakowa S, Luria E, Rudakowa I. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92

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

Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, 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

Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Korsch H, Miesala K, D Ho A, Human Mesenchymal Stromal Cells Regulate Initial Self-Renewing Divisions of Hematopoietic Progenitor Cells by a β 1-Integrin-Dependent Mechanism, *Stem Cells* 2007; 25: 798-806

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

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

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

Haynesworth S, Baber M, Caplan A. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992; 13: 69-80

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

Horwitz E. and Prather R. Cytokines as the major mechanism of mesenchymal stem cell clinical activity: Expanding the spectrum of cell therapy. *IMAJ* 2009; 11:209-211

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

Humeau L, Bardin F, Maroc C, Phenotypic. Molecular and functional characterization of human peripheral blood CD34+/Thy1+ cells. *Blood* 1996; 86: 949-955

Hurley RW, McCarthy JB, Verfaillie CM. Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest* 1995; 96: 511-519

Hwang J, Shim S, Seok O, Lee H, Sang Woo K, Kim B, Song H, Lee J, Park K. Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 547-54

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

Il-hoan Oh, Kyung-Rim Kwon, Concise Review: Multiple Niches for Hematopoietic Stem Cell Regulations, *Stem Cells* 2010; 28: 1243-1249

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

Jing D, Fonseca A-V, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, Ehninger G, Corbeil D, and Ordemann R. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells – modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica* 2010; 95: 542-550

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

Kadereit S, Deeds L, Haynesworth S, Koc O, Kozik M, Szekely E, Daum-Woods K, Goetchius G, Fu P, Welniak L, Murphy W, Laughlin M. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells* 2002; 20: 573-582

Kelly S, Sola C, de Lima M, Shpall E. Ex vivo expansion of cord blood. *Bone Marrow Transplantation* 2009; 44: 673–681

Kiel M, Yilmaz O, Iwashita T, Yilmaz O, Terhorst C, Morrison S. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005; 121: 1109-1121

Kiel M and Morrison S. Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity* 2006; 25: 977-988

Lanza R, Gearhart J, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thomas E, Thomson J, Wilmunt I. *Essentials of stem cells Biology*. Academic Press 2a Edition 2009, pg 23-24

Li Y, Chen J, Zhang C, Wang L, Lu D, Katakouski M, Gao Q, Shen L, Zhang J, Lu M, Chopp M. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 2005; 49: 407-417

Lia Na, Feugierb P, Serrurriera B, Latger-Cannardb V, Lesesveb J, Stoltza J, and Eljaafaria A. Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34⁺ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity, *Experimental Hematology* 2007; 507-515

Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberge M, Sundberg B, Arvidson J, Ljungman P, Lönnies H, Nava S and Ringden O. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007; 21: 1733-1738

Le Blanc K. Hematopoiesis does not always get support from MSC. *Cytherapy* 2009; 11: 674-675

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

Levesque J, Helwani F and Winkler I. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* 2010; 24: 1979-1992

Magin A, Körfer N, Partenheimer H, Lange C, Zander A, Noll T. Primary cells as feeder cells for coculture expansion of human hematopoietic stem cells from umbilical cord blood—A comparative study. *Stem Cells and Development* 2009; 18:173-186

Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin M, Dennis J, Haynesworth S, Koc O. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 597-604

Mariotti E, Mirabelli P, Abate G, Schiattarella M, Martinelli P, Fortunato G, Di Noto R and Del Vecchio L. Comparative Characteristics of mesenchymal stem cells from

human bone marrow and placenta: CD10, CD49d, and CD56 make a difference, *Stem Cells and Development* 2008; 17: 1039-1042

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

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

Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos J, Flores-Guzman P y Chavez-Gonzalez A. Hematopoyesis. *Cancerología* 2007; 95-107

McNiece I, Harrington J, Turney J, Kellner J, Shpall EJ. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2004; 6: 311-317

Mendez-Ferrer S, Michurina T, Ferraro F, Mazloom A, Macarthur B, Lira S, Scadden D, Ma'ayan A, Enikolopov G, Frenette P. Mesenchymal and hematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010; 466: 829-834

Meuleman N, Tondreau T, Ahmad I, Kwan J, Crockaert F, Delforge A, Dorval C, Martiat P, Lewalle P, Lagneaux L and Bron D. Infusion of Mesenchymal Stromal Cells Can Aid Hematopoietic Recovery Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Myeloablative Transplant: A Pilot Study. *Stem Cells and Development* 2009; 18: 1247-1252

Miller C and Eaves C. Long-term culture initiating-cell assays for human and murine cells. *Hematopoietic Stem Cell Protocols* 2002; 63: 123-141

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

Montesinos J, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzmán P, Hernández-Estévez E, Fajardo-Orduña G, Orozco S and Mayani H. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology,

immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy* 2009; 11: 163-176

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

Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol* 2011; 32: 315-320

Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kobayashi I, Gomei Y, Matsumoto Y, Yoshihara H, Suda T. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood* 2010; 116: 1422-1432

Noort W, Kruisselbrink A, in't Anker P, Kruger M, van Bezooijen R, de Paus R, Heemskerk M, Löwik C, Falkenburg J, Willemze R, Fibbe W. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2002; 30: 870-878

Odorico J, Jaufman D, Thomson J. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19:193-204

Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 2010; 33: 387-399

Overstraeten-Schlogel V, Beguin Y and Gothot A. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur J Haematol* 2006; 76: 488-493

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

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

Pak H-N, Qayyum M, kim D, Hamabe A, Miyauchi Y, Lill M, Frantzen M, Takizahua K, Chen L, Fishbein M, Sharifi B, Chen P, Makkar R. Mesenchymal stem cell injection

induces cardiac nerve sprouting and increase tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; 14: 841-848

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

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

Papayannopoulou T, Priestley G, Nakamoto B, Zafiropoulos V, Scott LM. Molecular pathways in bone marrow homing: Dominant role of $\alpha 4\beta 1$ over $\beta 2$ -integrins and selectins. *Blood* 2001; 98: 2403-2411

Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I. Células troncales y medicina regenerativa. 1ª. Edición 2011, pg 37-42

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

Petrini M, Pacini S, Trombi L, Fazz R, Montali M, Ikehara S and Abraham N. Identification and purification of mesodermal progenitor cells from human adult bone marrow. *Stem Cells Dev.* 2009; 18: 857-866

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

Pineault N, Cortin V, Boyer L, Garnier A, Robert A, Thérien C, Roy DC. Individual and synergistic cytokine effects controlling the expansion of cord blood CD34(+) cells and megakaryocyte progenitors in culture. *Cytotherapy* 2010; 13: 467-480

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

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

Punzel M, Liu D, Zhang T, Eckstein V, Miesala K, Ho AD. The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment. *Exp Hematol* 2003; 31: 339-347

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

Rickard D, Kassem M, Hefferan T, Sakar G, Spelsberg T, Riggs B. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner. Res.* 1996; 11: 312-324

Robinson S, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis J, Karandish S, Kaur I, Fu P, Del Angel M, Messinger R, Flagge F, de Lima M, Decker W, Xing D, Champlin R, Shpall E. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37: 359-366

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

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

Schajnovitz A, Itkin T, D'Uva G, Kalinkovich A, Golan K, Ludin A, Cohen D, Shulman Z, Avigdor A, Nagler A, Kollet O, Seger R, Lapidot T. CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions. *Nat Immunol* 2011; 12: 391-398

Schofield K, Humphries M, de Wynter E, Testa N, Gallagher J. The effect of $\alpha 4\beta 1$ -integrin binding sequences of fibronectin on growth of cells from human hematopoietic progenitors. *Blood* 1998; 91: 3230-323

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

Sorrentinoa A, Ferracinb M, Castellia G, Biffonia M, Tomasellia G, Baiocchia M, Faticac A, Negrinib M, Peschlea C and Valtier M, Isolation and characterization of CD146p multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental Hematology* 2008; 36: 1035-1046

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

Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; 25: 977-988

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

Teixidó J, Hemler M, Greenberger J, Anklesaria P. Role of $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* 1992; 90: 358-367

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

Vassalli G and Moccetti T. Cardiac repair with allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Swiss Med Wkly.* 2011; 141:1-6

Voura E, Billia F, Iscove N, Hawley R. Expression mapping of adhesion receptor genes during differentiation of individual hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 1997; 25: 1172-1179

Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, Eckstein V, Ho AD. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 2007; 10: 2638-2657 (a)

Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, Eckstein V, Ho AD., Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp Hematol.* 2007; 35: 314-325 (b)

Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, Ho AD. Adhesion of human hematopoietic progenitor cells to mesenchymal stromal cells involves CD44. *Cells Tissues Organs* 2008; 188: 160-9 (a)

Wagner W, Saffrich R, Ho AD. The stromal function of mesenchymal stromal cells. *Transf Med Hemotherapy.* 2008; 35: 185-193 (b)

Walenda T, Bork S, Horn P, Wein F, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, Ho AD, Wagner W. Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of hematopoietic progenitor cells. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 337-350

Walenda T, Bokermann G, Ventur Ferreira M, Piroth D, Hieronymusa T, Neuss S, Zenke M, Ho A, Müller M, Wagner W. Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol.* 2011; 39: 617-28

Wang M, Consoli U, Lane C, Durett A, Lauppe M, Champlin R, Andreeff M, Deisseroth A. Rescue from apoptosis in early (CD34-selected) versus late (non-CD34-selected) human hematopoietic cells by very late antigen 4- and vascular cell adhesion molecule (VCAM)1-dependent adhesion to bone marrow stromal cells. *Cell Growth Differ* 1998; 9:105-112

Wang H, Hung S, Peng S, Huang C, Wei H, Guo Y, Fu Y, Lai M, Chen C. Mesenchymal stem cells in the Wharton`s jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22: 1330-1337 (a)

Wang J, Wang L, Wu Y, Xiang Y, Xie CH, Jia B, Harrington J, Mcniece I. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34+ hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica* 2004; 89: 837-844 (b)

Wein F, Pietsch L, Saffrich R, Wuchter P, Walenda T, Bork S, Horn P, Diehlmann, Eckstein V, Ho A, Wagner W. N-Cadherin is expressed on human hematopoietic progenitor cells and mediates interaction with human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research* 2010; 4: 129-139

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov K, Tarasova Y, Wersto R, Boheler K, Wobus A. Nestin expression - a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004; 61: 2510-2522

Wilson C, Bekele G, Nicolson M, Ravussin E, Pratley R E. Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin. *Br J Hematol* 1997; 99: 447-451

Wilson A, Laurenti E, Trumpp A. Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Curr Op Genet Devel* 2009; 19: 461-468

Williams J, Southerland S, Souza J, Calcutt A, Cartledge R. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 1999; 65: 22-26

Wognum A, Eaves A, Thomas T. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch of Med Res* 2003; 34: 461-475

Yokota T, Oritani K, Mitsui H, Aoyama K, Ishikawa J, Sugahara H, Matsumura I, Tsai S, Tomiyama Y, Kanakura Y, Matsuzawa Y. Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: Structural requirement for fibronectin activities of CS1 and cell-binding domains. *Blood* 1998; 91: 3263-3272

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

Zhang Y, Li Ch, Jianga X, Zhanga S, Wua Y, Liua B, Tanga P, and Mao N. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Experimental Hematology* 2004; 32: 657-664

Zhang Y, Chai Ch, Jiang X, Teoh S and Leong. Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering* 2006; 12: 2161-2170

Zhang C, Kaba M, Iizuka S, Huynh H, Lodish HF. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood* 2008; 111: 3415-3423

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