



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DE NEUROTROFINAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE UNA POBLACIÓN
CELULAR DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL HUMANA ENRIQUECIDA EN
CÉLULAS TRONCALES Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

ILEANA MONDRAGÓN GARCÍA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. HÉCTOR DE JESÚS MAYANI VIVEROS
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
FACULTAD DE MEDICINA**

**DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DE NEUROTROFINAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE UNA POBLACIÓN
CELULAR DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL HUMANA ENRIQUECIDA EN
CÉLULAS TRONCALES Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

ILEANA MONDRAGÓN GARCÍA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. HÉCTOR DE JESÚS MAYANI VIVEROS
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
FACULTAD DE MEDICINA**

**DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2013

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 20 de mayo de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **MONDRAGÓN GARCÍA ILEANA** con número de cuenta 402013435 con la tesis titulada **"EFECTO DE NEUROTROFINAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE UNA POBLACIÓN CELULAR DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL HUMANA ENRIQUECIDA EN CÉLULAS TRONCALES Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. HÉCTOR DE JESÚS MAYANI VIVEROS**:

Presidente: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Secretario: DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
Suplente: DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de agosto de 2013

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por acreditarme como estudiante y ahora Maestra en Ciencias Biológicas.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Héctor Mayani Viveros por su apoyo incondicional como tutor principal de este proyecto.

Al Dr. Iván Velasco y al Dr. Juan José Montesinos por sus importantes aportaciones y sugerencias como miembros del Comité Tutor de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Héctor Mayani Viveros por su apoyo y confianza irrestrictas, por la motivación constante y por la inspiración infundida en cada charla y discusión. Por ser no sólo mi tutor académico sino mi mayor apoyo moral durante los momentos más duros y los más críticos de estos años. Mil gracias, hizo más por mí de lo que cree.

A mi familia. Papá, Mamá, Arena, su apoyo y amor han sido lo más importante que he aprendido a valorar y a reciprocitar. Mano, eres el mejor combo compinche-confidente-apoyo que puede existir y te quiero como a nada más en la vida.

A Bere, siempre serás mi otra hermana.

A Paty Flores, entre las buenas y malas rachas me has dado muchas lecciones tanto de laboratorio como de vida. Gracias. Al Laboratorio de Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas, por ser un gran equipo.

A todos los miembros de la UIMEO por ser un grupo de científicos y proto-científicos con gran visión, calidad científica y enormes corazones.

A mi familia extendida, al resto del clan Mondragón, a las García, a los Sandoval por todo lo que cada uno aporta a mi vida.

A todas las personas con las que he recorrido camino, quienes están, quienes ya no. A todos los quiero y de todos he aprendido.

“The very basic core of a man’s living spirit is his passion for adventure. The joy of life comes from our encounters with new experiences, and hence there is no greater joy than to have an endlessly changing horizon, for each day to have a new and different sun.”

Alex McCandless



ÍNDICE

Lista de figuras y cuadros	1
Abreviaturas	2
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	
Células Troncales	7
<i>El sistema hematopoyético</i>	9
<i>Neurogénesis y progenitores neurales</i>	12
Regulación por factores tróficos	14
Plasticidad	16
Antecedentes	18
Planteamiento del problema	20
Hipótesis	21
Objetivos	
Objetivo General	21
Objetivos Particulares	21
Materiales y Métodos	
Muestras de SCU	22
Enriquecimiento Celular	22
Cultivo Celular	23
Cuantificación Celular	25
Inmunocitoquímica	27
Morfología	28
Citometría	28
Análisis Estadístico	30
Resultados y Discusión	
Descripción de las muestras	31
Proliferación y Expansión Celular	36
Expresión de Marcadores Neurales	43
Morfología	49
Expresión de CD45	51
Discusión General	54
Conclusiones	58
Bibliografía	60

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

1 Modelo Jerárquico de la Hematopoyesis	11
2 Modelo Jerárquico de la Neurogénesis	14
3 Esquema de cultivo en 3 fases	25
4 Enriquecimiento de la población celular CD34+CD38-	32
5 Inmunocitoquímicas d0 CMN y Lin-	35
6 Proliferación de células Lin en exposición a las neurotrofinas NGF, BDNF y GDNF de manera individual o en combinación.	37
7 Proliferación de células Lin- a lo largo de 25 días de cultivo	39
8 Porcentaje de adherencia al día 25 de cultivo posterior a cultivo en medios de cultivo neural	41
9 Expansión de células hematopoyéticas contenidas en cultivos expuestos a neurotrofinas o citocinas hematopoyéticas por 14 días.	42
10 Porcentaje de células en cada grupo de morfologías a los días 14 y 25 in vitro posterior al cultivo en medios de cultivo neural	51

TABLAS

Tabla 1 Composición de citocinas y neurotrofinas en los cultivos utilizados	24
Tabla 2 Anticuerpos y concentraciones utilizadas	27
Tabla 3 Composición de citocinas y neurotrofinas en los cultivos utilizados	29
Tabla 4 Resumen de características principales de las muestras utilizadas	31
Tabla 5 Contenido de UFC Mieloides, Eritroides o Mixtas previa y posteriormente a la separación inmunomagnética.	33
Tabla 6 Porcentaje de células positivas para los receptores de neurotrofinas TrkA y TrkB, y para el receptor de SCF en la población de CMN o en la fracción enriquecida Lin-.	34
Tabla 7 Porcentaje de células positivas para marcadores de linaje neurales: Nestina, GFAP, MAP2 y A2B5 al día 0 de cultivo en las poblaciones CMN y Lin-	35
Tabla 8 Porcentaje de células positivas para marcadores de linaje neurales: Nestina, GFAP, MAP2 y A2B5 y para receptores TrkA, TrkB y SCFR al día 7 y 25 de cultivo en la fracción adherente y no adherente.	45-46
Tabla 9 Porcentajes relativos de expresión de CD45 en las poblaciones celulares al día 25 de cultivo.	52

ABREVIATURAS

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor

CMN: Células Mononucleares

CP: Célula Progenitora

CPr: Célula Precursora

CPN: Célula Progenitora Neural

CT: Célula Troncal

CTN: Célula Troncal Neural

CTE: Célula Troncal Embrionaria

CTPH: Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas

EF: Cultivo EGF+FGF2

EGF: Epidermal Growth Factor

FGF2: Fibroblast Growth Factor 2

GDNF: Glial Derived Neurotrophic Factor

Lin-: Población linaje negativa

MX: Cultivo Mixto

MO: Médula Ósea

N2: Medio de expansión neural N2

NC: Medio de expansión neural Neurocult

NGF: Nerve Growth Factor

H1: Cultivo Hemato-neural

H2: Cultivo Hemato-neural 2

PN: Progenitor Neural

SCU: Sangre de Cordón Umbilical

SEM: Cultivo Seminal

SFB: Suero Fetal Bovino

SNC: Sistema Nervioso Central

SP: Sangre Periférica

SPM: Sangre Periférica Movilizada

TPO: Trombopoyetina

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

ZSV: Zona Subventricular

ZSG: Zona Subgranular

RESUMEN

Las células troncales son células inmaduras, indiferenciadas, con alta capacidad proliferativa, autorrenovables y con potencial de diferenciación múltiple. El potencial de diferenciación depende del estado ontogénico, de manera que las células troncales embrionarias tienen un potencial de diferenciación mayor que aquellas de tejidos fetales y en éstas, a su vez, dicho potencial es mayor que en células troncales adultas o somáticas. Las células troncales somáticas, de manera tradicional, se consideran células con un compromiso definido a la producción de células de tejidos particulares, cuyo proceso es estrechamente regulado por los componentes del microambiente. A pesar de la predeterminación de las células troncales adultas se han documentado casos en los cuales dichas células son capaces de rebasar la diferenciación de los linajes celulares a los cuales están comprometidas para dar paso a células con características de tejidos distintos al propio (diferenciación no convencional o plasticidad). Esto ha sugerido que las células troncales adultas tienen un potencial de diferenciación mayor al considerado previamente, y que la modulación por componentes del medio son responsables de dicha plasticidad.

Existen evidencias, algunas de nuestro propio grupo de trabajo, de que la sangre de cordón umbilical (SCU) contiene poblaciones celulares primitivas que son capaces de adquirir características propias de linajes neurales; sin embargo, existe controversia sobre la identidad de las células que participan en este proceso y sobre qué factores lo favorecen. En particular, existe controversia sobre el potencial neurogénico de las células hematopoyéticas de la SCU y sobre los factores y condiciones que puedan favorecer dicha plasticidad.

En el presente trabajo empleamos un esquema de cultivo en 3 fases (fase de expansión, fase de inducción y fase de determinación) para explorar el efecto de las neurotrofinas *Nerve Growth Factor*, *Brain Derived Neurotrophic Factor* y *Glial Derived Neurotrophic Factor* (NGF, BDNF y GDNF, respectivamente por sus siglas en inglés) y de los factores de crecimiento FGF2 y EGF sobre células hematopoyéticas primitivas (células CD34+CD38-Lin-) de la SCU cuando éstas son cultivadas en condiciones que favorecen su desarrollo; es decir, en presencia de citocinas estimuladoras de la hematopoyesis. A lo largo del periodo de cultivo se evaluó la adquisición de marcadores neurales, así como la posible preservación de la identidad hematopoyética.

Se observó que dentro de la población enriquecida CD34+CD38-Lin-, la cual contiene un alto porcentaje de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (CTPH), existe una pequeña proporción de células que expresan marcadores neurales (Nestina: $11.88 \pm 3.7\%$; GFAP: $2.43 \pm 2\%$; MAP2: $6.05 \pm 2.19\%$; A2B5: $4.71 \pm 2.57\%$).

Conforme el periodo de cultivo avanzó, se presentó un incremento en la frecuencia de células que expresan los marcadores analizados, en especial en aquellas que fueron cultivadas en presencia de neurotrofinas y los factores FGF2 y EGF. A pesar de mostrar una cinética de proliferación y un mantenimiento de progenitores hematopoyéticos similar entre cultivos expuestos únicamente a neurotrofinas o únicamente a FGF2 y EGF, la proporción de células positivas para GFAP y Nestina al final del cultivo es significativamente mayor en los cultivos expuestos a ambos grupos de moléculas solubles. No obstante, la expresión de marcadores y la adquisición de morfologías no convencionales, no se observó la pérdida del marcador pan hematopoyético CD45, ni la pérdida súbita de progenitores hematopoyéticos como resultado de la exposición a neurotrofinas.

El medio de proliferación neural utilizado en la última fase de cultivo resultó ser un factor relevante en el desarrollo celular. Por un lado, dependiendo del medio de cultivo empleado en esta última fase (Neurocult o N2), se observaron diferencias significativas en los porcentajes y

números de células adherentes generadas; por otra parte, se vieron diferencias sustanciales en cuanto a la morfología de las células adherentes.

Este estudio demuestra que dentro de la población de células hematopoyéticas CD34+CD38-Lin- de SCU, existe una pequeña fracción de células receptivas a neurotrofinas y que en ensayos *in vitro* demuestran ser capaces de responder a estímulos tempranos con dichas moléculas, aumentando la expresión de marcadores neurales tempranos y de estadios maduros con un estímulo de refuerzo posterior.

ABSTRACT

Stem cells are immature, undifferentiated, highly proliferative, self-renewing cells, able to differentiate into multiple cell types. Differentiation potency is dependent on ontogenic state, embryonic stem cells have a higher potency than stem cells from fetal tissues and these have a higher potency than adult or somatic stem cells. Adult stem cells, traditionally, are considered to have a defined differentiation commitment to specific tissues and this process is closely regulated by the different components of the microenvironment. In spite of the pre-determination of adult stem cells, there's been cases/events published (documented) in which adult stem cells are able to surpass their cell lineage commitment to usher cells with characteristics from different tissues from their original (unconventional differentiation or plasticity). This evidence has suggested that adult stem cells may have a greater differentiation potency than it was previously thought and that the environmental components are responsible for these plasticity events.

There is evidence, some coming from work in our lab, that Umbilical Cord Blood (UCB) contains primitive cell populations that are capable of acquiring and expressing neural characteristics, however there is controversy regarding the identity of the cell populations that are involved in these events and the factors that assist such plasticity. Furthermore, there is controversy about the neurogenic potential that hematopoietic stem cells from UCB have and the factors and conditions conducive to such plastic events.

In our present work we used a 3-phase culture (expansive phase, inductive phase and determination phase) to explore the effect of the neurotrophins Nerve Growth Factor, Brain-derived neurotrophic factor, Glial-derived neurotrophic factor (NGF, BDNF, GDNF) and growth factors FGF2 and EGF on UCB hematopoietic stem/progenitor cells (CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ population) when cultured in conditions that allow their growth; that is, in the presence of cytokines and growth factors that bolster hematopoiesis. Throughout the culture, expression of neural markers and the possible maintenance of the hematopoietic identity were evaluated.

We observed within the CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ enriched population, which contains a high percentage of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC), a small fraction of cells positive for neural markers (Nestina: $11.88 \pm 3.7\%$; GFAP: $2.43 \pm 2\%$; MAP2: $6.05 \pm 2.19\%$; A2B5: $4.71 \pm 2.57\%$).

As the culture progressed, there was an increase in the frequency of cells positive for the markers analyzed, specially in cells cultured in the presence of neurotrophins and FGF2 and EGF. Despite of the apparent similar proliferation and colony-forming kinetics between the cultures exposed only to neurotrophins or only to FGF2 and EGF, the proportion of cells at the end of culture positive for GFAP and Nestin is significantly higher for those cultures exposed to both sets of soluble factors. Nevertheless the expression of neural markers and non-conventional morphologies, the expression of the pan-hematopoietic marker CD45 was not lost, nor was a sudden loss of hematopoietic progenitors seen as a result of exposure to neurotrophins.

The neural medium used during the last phase of culture turned out to be a determining factor in cell development. Differences were observed in terms of adherence and morphological appearance depending on the culture medium used (Neurocult or N2).

This study shows that within the UCB hematopoietic CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ enriched population exists a small fraction of cells receptive to neurotrophins, that *in vitro* are capable of

responding to early stimuli by such molecules. These increase the expression of neural markers after a reinforcing stimulus.

INTRODUCCIÓN

La plasticidad celular puede entenderse como la capacidad que tiene una célula indiferenciada de variar su patrón de desarrollo para generar distintos tipos celulares, en respuesta al ambiente que lo rodea ¹.

Las Células Troncales (CT) son aquellas células indiferenciadas que tiene el potencial de diferenciarse en distintos tipos celulares de acuerdo a ciertos estímulos ambientales en un contexto espacial y temporal determinados. El número y tipo de linajes celulares que una célula puede llegar a generar se reconoce como el potencial de diferenciación que tiene cierta CT. En las etapas embrionarias y fetales la potencialidad que tienen éstas células es grande dado que un grupo celular limitado debe originar a todos los distintos tipos celulares que conformarán a un mismo individuo. En etapas adultas las CT exhiben una potencialidad restringida que permite la regeneración y restitución de tejidos particulares a los cuales se encuentran asociados desde etapas embrionarias y fetales. No obstante, se considera que existen eventos de plasticidad en los que las células pueden superar su potencialidad previamente definida.

CELULAS TRONCALES

En el esquema clásico de desarrollo, la formación de tejidos y órganos comienza con la activación y proliferación de una célula inicial, o CT. Esta célula o grupo celular se divide para formar poblaciones celulares que, de manera azarosa definen el linaje a diferenciar y que secuencialmente adquieren características de tejidos específicos.

La definición general de CT describe a aquella célula o células en un estado no diferenciado, capaces de generar por división asimétrica tanto células indiferenciadas similares (auto-renovación) como células que pueden progresar en la diferenciación ^{2,3,4}. Éstas células indiferenciadas o primitivas se encuentran resguardadas en un espacio físico, conocido como nicho, el cual está conformado por componentes celulares determinados⁵ que regulan los procesos celulares de proliferación y determinación de manera estrecha. Esta definición es muy amplia y describe en términos generales las características comunes a todas las CT, sin

embargo no considera las diferencias existentes entre las diferentes estirpes de CT, sus atributos funcionales y su estado ontogénico⁶.

El cigoto es la primera CT. Esta célula se considera totipotente debido a la capacidad que tiene de diferenciar tanto a los tejidos embrionarios como a los extraembrionarios (placenta, saco amniótico, cordón umbilical y saco vitelino). Con la formación del blastocisto, las CT embrionarias, las cuales están en la cavidad interna, pierden la totipotencialidad y restringen su diferenciación a las tres capas embrionarias que formarán al organismo. Es durante este proceso que éstas CT se vuelven pluripotentes. Durante la gastrulación las células que conforman al epiblasto proliferan en una estructura laminar y comienzan a migrar y converger en una línea media llamada línea primitiva hasta crear una invaginación. Las células engrosan al epiblasto y migran a través de la línea primitiva para dar lugar a una segunda capa celular que formará al mesodermo. A su vez, conforme la proliferación y el movimiento celular transcurre, las células del hipoblasto son reemplazadas por un grupo celular que formará la tercer capa embrionaria, el endodermo definitivo. Es a partir de ésta proliferación y migración celular que se forman las tres capas embrionarias¹. Durante esta etapa las células primitivas comienzan a determinar su repertorio celular para conformar los tejidos relativos a cada una de las capas embrionarias. Conforme se da la formación y maduración de órganos y tejidos, las CT y progenitores tempranos, provenientes de las diferentes capas embrionarias determinan su distribución espacial y los linajes celulares a los que darán origen^{7,8}. Las CT restringen aún más los linajes celulares a lo que derivarán, con lo que se vuelven células multi o unipotentes y estos grupos celulares se resguardan y mantienen durante la vida del organismo por lo que se nombran como CT somáticas o adultas³.

La pérdida secuencial de potencialidad de las CT y la restricción a tejidos particulares se ha considerado como un mecanismo de especialización. Sin embargo se han documentado eventos de plasticidad o diferenciación en los cuales CT adultas parecen rebasar la determinación al linaje celular al que están comprometidas⁹ y en ciertos casos los linajes determinados a su capa embrionaria. La posibilidad de que pueda inducirse una reorientación en la diferenciación celular de una CT adulta resultan de gran interés.

En el esquema canónico de determinación y diferenciación celular, la CT debe salir del estado quiescente para llevar a cabo un primer evento de maduración. Este primer paso da lugar a las Células Progenitoras (CP) las cuales, a diferencia de las CT, ya no son autorrenovables pero

todavía mantienen un potencial proliferativo y de diferenciación amplio. Conforme se da la determinación y compromiso de las CP a linajes celulares particulares, éstas pierden la multipotencialidad (si es que existe más de un linaje en el repertorio de dicha CP) y progresan hacia una Célula Precursora (CPr). Las CPr dejan de ser proliferativas y son un estado temprano en el proceso de maduración hacia la célula madura funcionalmente competente³. Este modelo ha sido utilizado en la caracterización de diferentes estirpes celulares, sin embargo hay variaciones entre las diferentes CT de distintos tejidos.

El sistema hematopoyético

La hematopoyesis es el proceso por el cual se generan las células sanguíneas de las series mieloide, eritroide y linfoide, a partir de una CT de origen mesodérmico¹⁰. En la hematopoyesis la Célula Troncal Hematopoyética (CTH) sale de los nichos hematopoyéticos, progresa hacia la determinación a linajes celulares definidos, posteriormente son movilizadas hacia los vasos sanguíneos y donde maduran y adquieren función celular (en los linajes mieloides) o migran hacia órganos linfoide como el timo (en el linaje linfoide T). Estos eventos son finamente regulados por el microambiente, mediante interacciones intercelulares (con células del estroma medular y con células hematopoyéticas)¹¹, interacciones con moléculas de matriz extracelular e interacciones con moléculas solubles^{5,10,12}. Se ha estimado que en condiciones normales el humano adulto produce más de 10^{12} células sanguíneas diariamente¹³. Esto muestra que la tasa de generación del tejido sanguíneo es rápida, frecuente y en constante activación.

Las primeras células hematopoyéticas y la hematopoyesis primitiva se generan en el saco vitelino, y en la región de los primordios embrionarios conocida como zona AGM (Aorta-Gónada-Mesonefros), pero con el inicio de la circulación las primeras Células Troncales y Progenitores Hematopoyéticos (CTPH) migran y colonizan el hígado, el bazo, la médula ósea (MO) y el timo. Posterior al nacimiento la producción de células hematopoyéticas desaparece de la mayoría de los sitios hematopoyéticos fetales y se restringe a la MO³.

En la década de 1960, James Till y Ernest McCulloch estudiaron el efecto de la radiación en la hematopoyesis de ratón. Observaron que posterior a un tratamiento con radiación, un ratón inmunosuprimido transplantado con células de MO de un sujeto sano restituía la hematopoyesis normal pero que aparecían nódulos en el bazo. Al estudiarlos encontraron que

estaban compuestos por colonias hematopoyéticas tanto mieloide como eritroides, las cuales podían restituir la hematopoyesis y formar nódulos en el bazo de un segundo trasplante¹⁴. Estas observaciones llevaron a la confirmación de la existencia de progenitores multipotentes en el adulto las cuales era posible cuantificar a través de ensayos *in vitro*. A partir de estas observaciones, Till y McCulloch propusieron un modelo estocástico de la hematopoyesis el cual serviría de base para delinear el modelo jerárquico de diferenciación de las CT.

La identidad de la CTPH se ha tratado de definir utilizando la presencia o ausencia de moléculas de superficie en correlación a sus atributos celulares^{3,15}. Las células de linaje hematopoyético se caracterizan comúnmente por la expresión de la tirosin-fosfatasa CD45, también conocida como antígeno común leucocitario. Esta molécula tiene una expresión consistente en los linajes hematopoyéticos (exceptuando a eritrocitos y megacariocitos maduros) por lo que la presencia de CD45 es de gran relevancia para la identificación de las estirpes celulares hematopoyéticas. La población de CTPH se caracteriza por ser capaz de reconstituir la hematopoyesis normal en modelos *in vivo* de depleción por radiación y por ser capaz de generar colonias hematopoyéticas tempranas y tardías *in vitro*. Esta población se ha caracterizado por expresar la glicoproteína CD34¹⁶, marcador clásico de los linajes tempranos linfohematopoyéticos¹⁷, y por carecer tanto de la ectozima CD38⁵ como de marcadores de linajes hematopoyéticos. A partir de la caracterización inicial y de la complementación con otros marcadores, se pueden definir compartimentos teóricos que describen a grupos hematopoyéticos particulares: CTH, CPH, Células Precursoras y Células Maduras. Se han utilizado otros marcadores de superficie (CD133, CD90, CD117) para identificar y caracterizar sub poblaciones particulares de CPH con características particulares¹⁰, no obstante, se considera que dentro de la población CD34+CD38-Lin- es que se concentra la mayor población de CTPH¹⁵. En la **Figura 1** se muestra el esquema jerárquico de diferenciación del linaje hematopoyético.

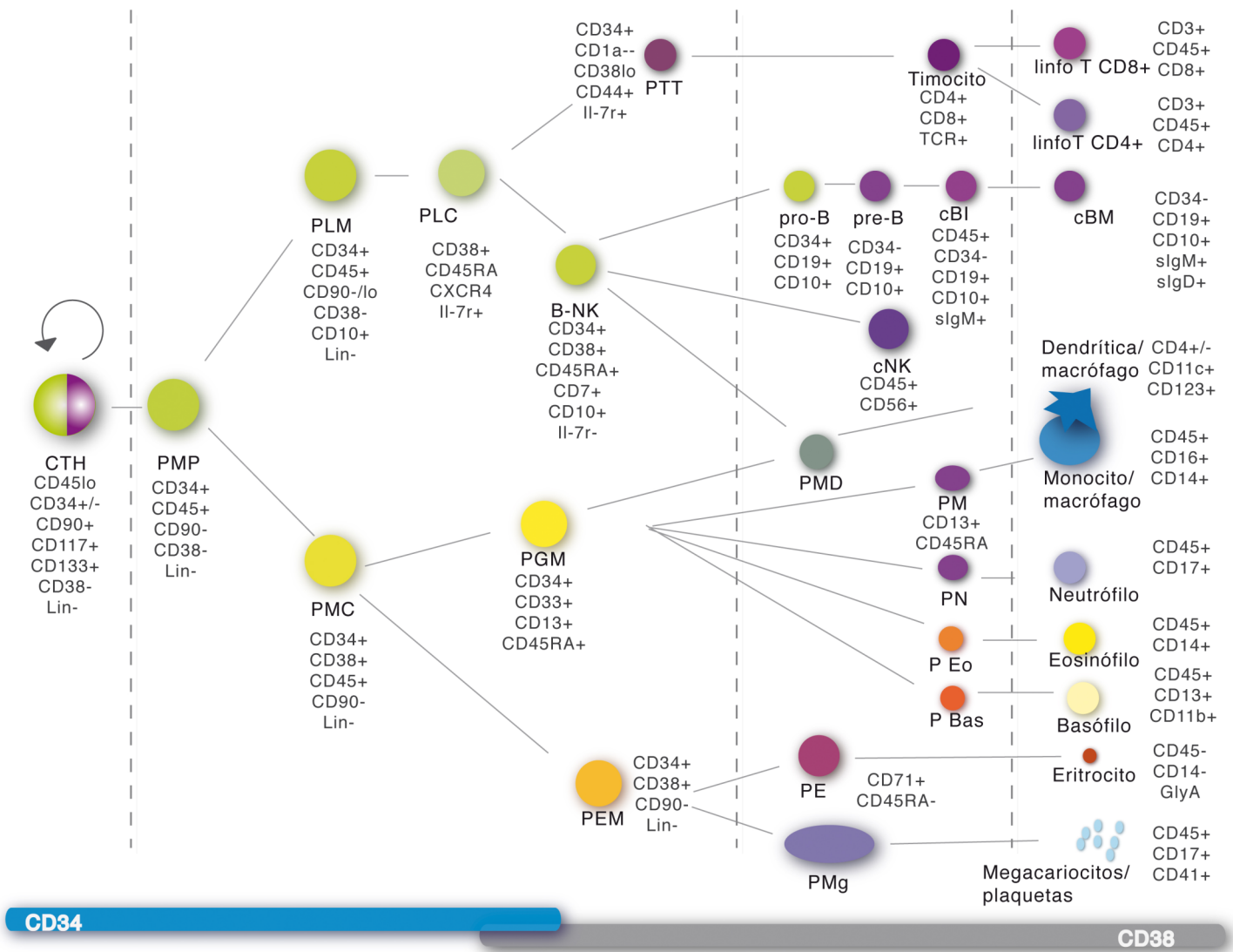


Fig. 1. Modelo Jerárquico de la Hematopoyesis. Se presenta esquemáticamente la determinación y diferenciación de los linajes sanguíneos utilizando la clasificación jerárquica progresiva descrita en el texto para la distinción de los compartimentos. De izquierda a derecha: el primer compartimento corresponde a la célula troncal hematopoyética multipotente autorrenovable, el segundo compartimento a progenitores hematopoyéticos, un tercer compartimento a células precursoras y finalmente un cuarto compartimento a las células maduras. Se listan los grupos celulares con los marcadores utilizados comúnmente para su identificación.

CTH- Célula Troncal Hematopoyética; PMP- Progenitor Multipotente; PLM- Progenitor Linfoide Multipotente; PMC-progenitor mieloide Común; PLC- Progenitor Linfoide Común; PGM-Progenitor GránuloMonocítico; B-NK- Progenitor común de células B y Natural Killer; PTT- Progenitor Tímico Temprano; PEM-Progenitor Eritroide-Megacariocítico; pro-B- Células pro B; pre-B- Células pre B; PMD- Progenitor Macrófago-dendrítico; PET- Progenitor Eritroide; PMg- Progenitor Megacariocítico; cBI- Células B Inmaduras; cBM- Células B Maduras; PM-Precursor Monocítico; PN- Precursor neutrófilico; P Eo- Precursor de eosinófilo; P Bas- Precursor de basófilo. lo-expresión baja.

(Esquema integrado y modificado de Mayani et al., 2007, Doulatov et al., 2010)

Las CTHs han sido estudiadas y utilizadas en la clínica con gran éxito, sin embargo, existen ciertas restricciones técnicas para su obtención. Las muestras de MO y de Sangre Periférica Movilizada (SPM) requieren de protocolos hospitalarios para su obtención y en el caso de MO mediante procedimientos invasivos, por lo que la disponibilidad de estos tejidos para investigación no es óptima. La Sangre Periférica (SP) tiene contenidos muy bajos de CTPH y existen fuertes dilemas éticos sobre la obtención y el uso de hígado fetal¹².

La Sangre de Cordón Umbilical es la sangre residual proveniente del bebé que queda atrapada en la placenta con el aislamiento y separación del producto y es desechada posterior al nacimiento. En contraste con las fuentes previamente descritas, la SCU, al ser un producto residual del parto, considerado como tejido de desecho, tiene una alta disponibilidad y su uso no representa dilemas éticos. Aunque se ha reportado que contiene un porcentaje menor de células CD34+ (0.83% en comparación con 1.68% en MO y 2% en SPM¹⁹) se ha reportado también que estas células tienen una mayor capacidad de formar colonias multipotentes y mayor capacidad reconstitutiva²⁰ lo que sugiere que son más primitivas. Dadas las ventajas técnicas que representa, se ha utilizado extensivamente en investigación^{18,19,21}. Adicionalmente estas células han probado ser de gran utilidad para la clínica ya que tienen una alta inmadurez inmunológica lo que permite que en transplantes exista una muy baja incidencia de enfermedad de injerto contra hospedero así como reacciones adversas a éstas^{4,12,23,24}. Estas características han favorecido el uso de esta fuente tanto para la investigación como para uso terapéutico^{25,26,27}.

Neurogénesis y progenitores neurales

La neurogénesis es el proceso a través del cual se generan las células que componen al sistema nervioso a partir de una célula primitiva de origen ectodérmico²⁸. La Célula Troncal Neural (CTN), utilizando el modelo general, es una célula indiferenciada que produce progenitores multipotentes que pueden dar origen tanto a los linajes neuronales como a los gliales. A diferencia del sistema hematopoyético, el estudio y caracterización de la neurogénesis adulta así como la identificación de la Célula Troncal Neural o Progenitor/Precursor Neural (CTN/PN) no está del todo resuelta. Estas poblaciones primitivas en el organismo adulto tienen una tasa de división celular y una capacidad reconstitutiva bajas^{29,30} razón por la cual se consideró durante muchos años que no existía neurogénesis en el adulto^{3,28,31}.

En etapas embrionarias, con la formación de la placa neural y del tubo neural, las células del neuroepitelio se dividen para generar el primer grupo de progenitores multipotentes. Estos

progenitores, con la formación del tubo neural, son reemplazados por la población de progenitores neurales que dan lugar a la primera ola neurogénica. Con la maduración y formación del sistema nervioso se generan los progenitores basales y la glia radial. Estos progenitores posteriormente se diferencian en los linajes neuronales y gliales, migran y colonizan los que serán los nichos neurogénicos en el organismo adulto³².

En el sistema nervioso central (SNC) adulto se han descrito dos zonas neurogénicas principales: la zona subventricular (ZSV) que genera neuronas que se diferencian en bulbo olfatorio y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo. A pesar de ser los dos centros neurogénicos identificados en adultos los componentes de los nichos así como la dinámica existente en estos es distinta. En estos nichos se han descrito grupos celulares distintos que llevan a cabo procesos de neurogénesis en respuesta a distintos estímulos microambientales³³ para generar distintos tipos de células neurales^{34,35}. Se ha descrito que los neuroblastos de la ZSV migran en la Vía Migratoria Rostral en la cual encuentran gradientes protéicos que estimulan una diferenciación contexto dependiente. En el caso de los neuroblastos y la glia radial en ZSG, la asociación a tejido vascular y señalización por factores solubles favorece la diferenciación terminal²⁸. La CTN, desde su descubrimiento también ha sido objeto de estudio, sin embargo todavía existe mucha controversia respecto a la jerarquía, características fenotípicas y plasticidad debido a la diversidad de PN y sus características particulares³⁶ (Ver **Figura 2**).

A diferencia de las CTPH, la obtención de células primitivas humanas de origen neural es mucho más difícil, tanto por la restricción numérica de PN en los tejidos adultos como las implicaciones éticas del uso de fuentes fetales y/o embrionarias³⁷.

A pesar de que la inmunofenotipificación ha resultado muy útil para estudiar distintos grupos celulares es importante notar que la determinación, la diferenciación y la maduración no son eventos puntuales sino una serie continua de procesos y estadios. Esto es importante dado que las variaciones en la conducta de poblaciones definidas pueden ser fruto de la gran diversidad de fenotipos celulares transitorios³⁸.

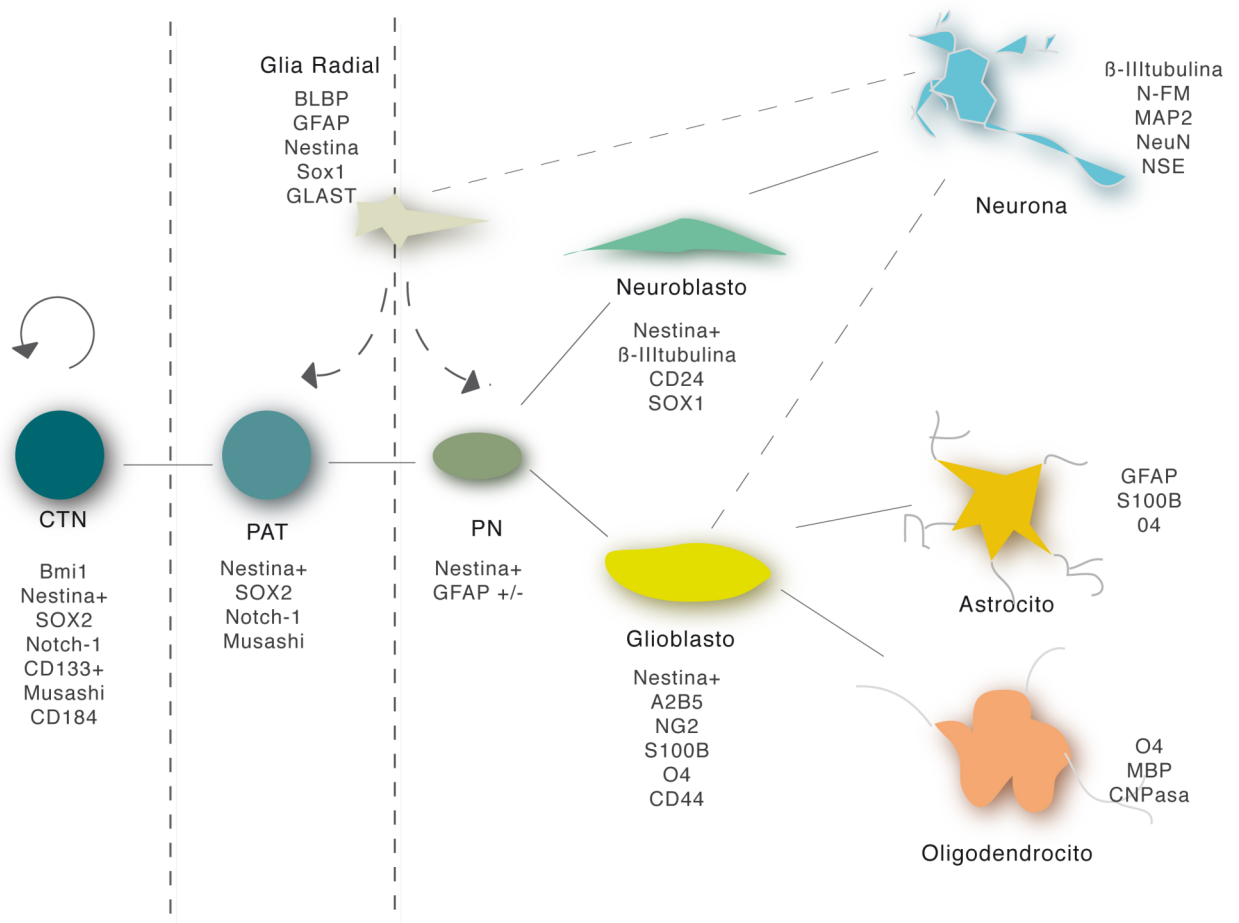


Fig. 2. Modelo Jerárquico de la Neurogénesis. Se presenta un diagrama simplificado de la neurogénesis a partir del modelo jerárquico. De izquierda a derecha se nota en primer lugar la CTN la cual es una célula multipotente autorrenovable capaz de proliferar y continuar con el tránsito a la determinación. En el segundo compartimento se ubica al progenitor neural transitorio del desarrollo embrionario y a la glia radial como progenitor embrionario e hipotético en el organismo adulto. En el tercer compartimento se incluyen células precursoras y células maduras. Existe controversia sobre la identidad de progenitores y precursores neurales en el organismo adulto. Las líneas discontinuas muestran relaciones hipotéticas propuestas de diferenciación. Se notan los marcadores utilizados comúnmente para la identificación de los distintos grupos celulares.

CTN- Célula Troncal Neural; PAT- Progenitor de Amplificación Transitoria; PN-Precursor Neural.

(Esquema modificado de Kempermann 2006 y Acevedo Fernández et al 2011 en Pelayo, Santa-Olalla, Velasco eds.)

REGULACIÓN POR FACTORES TRÓFICOS

Como se ha mencionado previamente, la actividad de las CT y CP es regulada por una red compleja de señales ambientales. Se han diseñado modelos *in vitro*, que han permitido diseccionar y analizar los elementos del microambiente y los efectos biológicos que tienen en las poblaciones primitivas. Los factores tróficos representan uno de los elementos ambientales más importantes en la regulación de los procesos biológicos de las CT³⁹. A partir de diversos estudios se ha

demostrado que el tránsito entre estadios celulares, así como la regulación y la determinación a linajes particulares, tanto para la hematopoyesis como la neurogénesis, es mediado por factores de crecimiento, citocinas, morfógenos, neurotransmisores y neurotrofinas, entre otros.

Entre la gran cantidad de moléculas identificadas como participantes en la hematopoyesis, las citocinas hematopoyéticas tienen un papel prioritario^{40,41,42}. Se han podido clasificar como de efecto temprano, intermedio o tardío en función de la influencia que ejercen sobre los procesos de proliferación, expansión, quiescencia, autorrenovación, comprometimiento, diferenciación y maduración de los diferentes compartimentos hematopoyéticos^{43,44}. Como parte del repertorio de citocinas que tienen efecto sobre las poblaciones hematopoyéticas más tempranas se han identificado al ligando del receptor *FMS-like tyrosine kinase 3* (Flt-3), *Stem Cell Factor* (SCF), interleucina 6 (IL6) y trombopoyetina (TPO). Estas moléculas han probado, ya sea de manera autónoma o en sinergia, ser inductores de la proliferación y mantenimiento de las poblaciones primitivas. Factores como la interleucina 3 (IL3) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) se consideran intermedios al permitir la proliferación y mantenimiento de los progenitores multipotentes de linajes específicos. En contraste, moléculas como los factores estimuladores de colonias (G-CSF, M-CSF) y la eritropoyetina (EPO) se consideran de efecto tardío ya que su mayor influencia recae en la maduración de los linajes hematopoyéticos. No obstante la participación sinérgica de éstas citocinas ejercen funciones más finas en la determinación y comprometimiento hacia linajes específicos. Por ejemplo, en la población de CP, la TPO puede actuar de manera sinérgica con EPO para favorecer la determinación de los linajes megacariocíticos y eritroides; y en CP_r el estímulo con GM-CSF⁴⁵, M-CSF y G-CSF favorecen la diferenciación y maduración de los linajes mieloides^{39,45,46}.

Por su parte, factores de crecimiento, morfógenos y neurotrofinas son esenciales para la proliferación, diferenciación y supervivencia de los linajes neurales^{3,4}. La neurogénesis adulta, en comparación con la hematopoyesis, es un proceso restringido. En éste proceso, la tasa de proliferación es baja y la diferenciación de los PN se restringe a linajes celulares limitados y su regulación está mediada principalmente por morfógenos y por neurotrofinas. El mantenimiento de las poblaciones primitivas se da por la señalización de noggin, de manera similar a como sucede en etapas embrionarias, inhibiendo a las proteínas BMP. El mantenimiento y la proliferación de la población primitiva son mediadas por factores de crecimiento como EGF (*Epidermal Growth Factor*) y FGF (*Fibroblast Growth Factor*). PEDF (*Pigment-epithelium derived factor*) así como BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) permiten la autorrenovación de la población más primitiva al inhibir la expresión de Mash1, gen pro neural que favorece el tránsito

en la diferenciación. El neurotransmisor GABA funciona en la ZSV como inductor de la migración de los neuroblastos, así como en su diferenciación y maduración. En cultivo la adición de LIF (*Leukemia Inhibitory factor*) permite la amplificación de los PN^{28,47}. La progresión a los linajes neuronales o gliales es mediada por moléculas como el ácido retinoico, derivado de la vitamina A, el cual activa la expresión de los genes HOX.

Los diferentes linajes neuronales son favorecidos por la exposición secuencial a factores de las mismas familias: la transición a linajes neuronales dopaminérgicos es favorecida por exposición a FGF8 y a Shh; los linajes neuronales serotoninérgicos son promovidos por FGF4; y la diferenciación de los linajes gliales requiere de la inducción secuencial con FGF2, EGF y PDGF, y CNTF para el linaje astrocítico³. En protocolos de expansión y de diferenciación de PN la adición de FGF2 y EGF es esencial para permitir la proliferación de los progenitores y mantenimiento de un fenotipo primitivo hasta la inducción de la determinación neural⁴⁷. En presencia de FGF2 se induce la diferenciación a astrogliá, BDNF en ensayos *in vivo* permite la proliferación de precursores de ZSV y promueve la migración neuronal³⁵. Las neurotrofinas son moléculas de señalización que tienen un gran número de funciones en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso, y comprende al grupo de moléculas que sirven de ligandos a los receptores de la misma familia de receptores, los receptores *trk*. El rol principal de las neurotrofinas en el sistema nervioso central es el de promover la proliferación y diferenciación de linajes neuronales a partir de la activación de las cascadas de señalización por activación de los receptores de la familia *Trk*^{48,49}. GDNF (*Glial Derived Neurotrophic Factor*) es una proteína relacionada a la superfamilia de TGF- β y particularmente en el sistema nervioso funciona como una molécula neurotrófica para diversos linajes neuronales, promoviendo la supervivencia⁵⁰

Es importante notar que a pesar del efecto que todas las moléculas mencionadas tienen en los linajes a los que se hace referencia, la mayoría de los factores tróficos son moléculas con actividad pleiotrópica. Es por esto que, aunque favorecen ciertos procesos en grupos y linajes celulares definidos, no excluye su participación en la regulación de muchos otros linajes celulares^{51,52,53,54,55}.

PLASTICIDAD

Las CT adultas, dentro de un repertorio definido, diferencian a varios linajes celulares en respuesta a señales ambientales particulares^{56,57}. Estos procesos de diferenciación son necesarios en los procesos de restitución de los tejidos a los cuales pertenecen. Sin embargo, se

han observado casos en los que éstas células pueden llevar a cabo procesos de diferenciación que no necesariamente concuerdan con el esquema tradicional. Se han documentado eventos particulares en los cuales las CT somáticas parecen extender su potencial de diferenciación a estirpes celulares no convencionales; y de manera extraordinaria, hasta de origen embrionario diferente.

Se han propuesto al menos tres mecanismos por los cuales una célula es capaz de adquirir fenotipos no convencionales: desdiferenciación, transdiferenciación y transdeterminación^{58,59}. Cada uno de estos procesos tiene como característica común el cambio, aparente y/o funcional, de una célula de un linaje a una célula de otro^{59,60}. Se ha sugerido que estos procesos pueden ocurrir de manera normal como una propiedad emergente de grupos celulares específicos^{61,62} o en respuesta a daño^{63,64}. Se ha explicado que dicha diferenciación no convencional, tanto en modelos humanos como animales, es resultado de la modulación mediada por el contacto célula-célula⁶⁵, por el contacto con moléculas de matriz extracelular y con moléculas de adhesión⁶⁶, por la inducción de factores solubles^{67,68,69}, por inducción por el contenido de microvesículas⁷⁰ o por fusión celular^{71,72}.

Tradicionalmente se considera que la plasticidad entre linajes celulares está restringida a tejidos originados en la misma capa embrionaria⁷³, sin embargo, se han documentado eventos de diferenciación a linajes de distintas capas embrionarias, como el linaje hematopoyético y el neural a partir de las mismas poblaciones celulares^{68,74}. No obstante, la participación de éstas células diferenciadas en la restitución tisular es controversial^{75,76}.

La SCU, como se ha descrito previamente, es una suspensión celular heterogénea en la cual la presencia de células primitivas está compuesta principalmente por células de linajes sanguíneos²⁰ sin embargo se han encontrado en frecuencias bajas células de linaje endotelial⁷⁷ y mesenquimal⁷⁸ así como poblaciones celulares multipotentes, consideradas como poblaciones más tempranas^{79,80,81}. Debido a la gran cantidad de progenitores multipotentes y la baja inmunogenicidad de este tejido es que se ha probado su uso terapéutico lo cual en varios casos ha resultado prometedor^{82,83,84,85}. Por esto es que se ha dirigido una gran cantidad de estudios en búsqueda de estas poblaciones neurogénicas provenientes de CT somáticas.

Los trabajos publicados sobre estos eventos de plasticidad son controversiales pues se ha discutido que la expresión de características de linajes celulares inesperados es expresada por poblaciones minoritarias multipotentes no muy bien caracterizadas⁸⁶. Sin embargo hay trabajos contrastantes que resaltan las capacidades plásticas de las poblaciones hematopoyéticas.⁸⁷

ANTECEDENTES

En el 2001 Krause et al.⁸⁸ documentaron en ratón la existencia de una población celular de MO, que al ser transplantada en animales irradiados no sólo reconstituía la hematopoyesis normal sino que una pequeña fracción se integraba a tejido epitelial de pulmón, a piel y al tracto gastrointestinal del hospedero. Estas células adicionalmente mostraban marcadores propios de los tejidos a los que se integraban. Esta observación abrió la posibilidad de que células hematopoyéticas provenientes de MO pudieran ser utilizadas en protocolos de diferenciación a linajes no hematopoyéticos lo que motivó el desarrollo de ensayos para explorar los alcances de dicha plasticidad; en particular, la diferenciación hacia linajes celulares más restringidos como el neural.

A partir del estudio de la SCU como fuente alternativa de células multipotentes se generaron estudios para evaluar si en este tejido se podían encontrar poblaciones celulares capaces de adoptar un fenotipo y/o función neural. En los trabajos de Chen^{89,90} se analizó si la SCU contenía células capaces de llevar a cabo una diferenciación hacia los linajes neurales y encontraron que células tanto adherentes como no adherentes inicialmente tienen una expresión basal no sólo de marcadores neurales tempranos sino de receptores a neurotrofinas. Al estimular ambas fracciones con medio neurotrófico (adicionado con FGF2, NGF, BDNF, cAMP, GDNF, ácido retinóico y SFB, entre otras moléculas) observaron diferenciaciones no convencionales de células CMN de SCU hacia células con características neurales. Observaron que con el transcurso del cultivo había una separación de la población celular en una fracción no adherente que expresa SCFR (4%), CD34 (29%) y nestina (23%), y una adherente disminuida en CD45 (de 90% en la población inicial al 58%) y enriquecida en vimentina de morfología extendida de tipo neural. A partir de estos resultados sugirieron que las CMN de SCU expuestas a un medio de inducción neural eran capaces de adquirir características que potencialmente podían reflejar funcionalidad. Al transplantar éstas células, cultivadas previamente en presencia de EGF, FGF, LIF y SCF, en la ZSV de ratas observaron 21 días después del transplante una cantidad pequeña de células vivas MAP2+ en la vía migratoria rostral. Concluyeron que se podía inducirse a las CMN de SCU hacia los linajes neurales y que la pre estimulación *in vitro* es crucial para la integración a tejido vivo. Sin embargo, en estos trabajos el uso de una población tan heterogénea como es la fracción de CMN impide identificar el grupo celular capaz de llevar a cabo tal diferenciación.

A partir de estos trabajos se diseñaron diferentes protocolos para estudiar si la expresión de características neurales sucedía en poblaciones más definidas, células de origen

hematopoyético. Rogers y colaboradores en el 2007 reportaron que células hematopoyéticas CD45+ Lin- de MO eran capaces de adquirir características tanto mesenquimales como neurales después de ser cultivadas 14 días en medios de diferenciación para dichos tipos celulares. No obstante, la adquisición de estas nuevas características sólo podía llevarse a cabo si las células eran inicialmente cultivadas 8 días en ausencia de suero y en exposición a FGF-4, SCF y Flt3⁸⁰. En 2010 el mismo grupo reportó que ésta combinación de factores de crecimiento en poblaciones enriquecidas en CPHs de SCU induce la expresión del factor de transcripción de células pluripotentes Oct4 en una concentración similar a la expresada por una línea celular embrionaria⁹¹. Este trabajo planteó que era posible inducir una reprogramación parcial de células consideradas como comprometidas mediante factores exógenos y que éste “priming” o impronta celular en estados tempranos de determinación permite la adquisición de nuevas características posteriormente.

Otros trabajos documentaron que la exposición de células hematopoyéticas a factores solubles (incluidas neurotrofinas y neurotransmisores) y moléculas de matriz extracelular⁹², y las interacciones con células/tejido del linaje a adoptar y reprogramación⁹³, favorecen la expresión de marcadores neurales, el cambio en la morfología y la modulación en la expresión de marcadores hematopoyéticos⁹⁴. Se ha documentado también que una población característica de CTPH de SCU (CD133+ CD34+) expuesta a un medio de expansión neural posterior a un cultivo en presencia de citocinas y neurotrofinas fue suficiente para que éstas expresaran miRNAs asociados a la diferenciación neuronal⁹⁵. Esta evidencia abona a la noción de que diversas poblaciones de CTPH pueden ser inducidas a exhibir plasticidad dirigida hacia los linajes neurales.

Los diferentes protocolos de diferenciación de células de SCU (a partir de diversas poblaciones: CMN, CD34+, CD34+CD133+ y más) utilizan componentes comunes: medios de cultivo adicionados con los factores de crecimiento EGF y FGF2 que, en conjunto, permiten la autorrenovación y potencial multilinaje de células con potencial neural⁹⁶, citocinas y neurotrofinas, principalmente NGF y BDNF, como sirven como inductores de la determinación y diferenciación neural. Existe evidencia de que la familia de proteínas FGF son capaces de alterar la estructura de la cromatina para favorecer la reprogramación y así favorecer un cambio de destino⁹⁷ y que en fibroblastos la activación de receptores de la familia Trk induce la transformación maligna de fibroblastos y la adopción de morfologías neurales⁴⁸ al activar oncogenes *trk*; sin reprogramación por introducción de factores de transcripción.

Es importante notar que los trabajos citados previamente utilizan poblaciones celulares inespecíficas y que los medios de cultivo y de diferenciación para estimular la diferenciación se utilizan en el marco de su uso en poblaciones celulares neurales o embrionarias.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios han mostrado que poblaciones hematopoyéticas de SCU son capaces de exhibir características de linajes celulares no hematopoyéticos en respuesta a estimulación por medios de cultivo diseñados para tejidos neurales o embrionarios. La evidencia sugiere que es la exposición a los diferentes suplementos presentes en los medios lo que permite la adquisición de características no convencionales.

En nuestro laboratorio hemos observado que la exposición inicial de la población enriquecida y purificada de CTPH a los medios de diferenciación neural resultan desfavorables para la proliferación y supervivencia celular. No obstante, experimentos realizados por la Dra. Patricia Flores Guzmán muestran que una población purificada de CTPH (células CD34+ CD38- Lin-) expuesta inicialmente a citocinas hematopoyéticas, no sólo sobreviven y proliferan sino que, después del cultivo en un medio comercial para células neurales, exhiben cambios distintivos hacia una caracterización neural. Las células terminales se adhieren a los platos de cultivo y exhiben morfologías de apariencia neurítica, expresan transcritos y proteína de los marcadores neurales MAP2, GFAP, NeuN y NF200. Además en ensayos electrofisiológicos muestran tener responsividad a estimulación eléctrica de manera similar a aquella observada en células diferenciadas de una línea celular de neuroblastoma. Estos resultados refuerzan la teoría de que la población hematopoyética temprana es capaz de adquirir características neurales ante el estímulo del medio de diferenciación comercial; y la exposición inicial a citocinas hematopoyéticas permite la proliferación y supervivencia de las poblaciones primitivas previa a la inducción con medios de diferenciación.

El presente trabajo busca evaluar si el uso de citocinas, neurotrofinas y los factores tróficos EGF y FGF2 durante la primera fase de cultivo, ejercen una influencia importante sobre la adquisición de características y marcadores neurales después de un estímulo refuerzo con los medios neurales.

HIPÓTESIS

La población enriquecida en células CD45+ CD34+ CD38- Lin- es una población sensible a regulación por factores solubles. La exposición inicial a neurotrofinas y factores tróficos en combinación con citocinas hematopoyéticas permite la proliferación y supervivencia de la población hematopoyética y favorece la expresión de marcadores no hematopoyéticos posterior a la exposición a un medio neural.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si la exposición temprana de una población enriquecida en células CD34+ CD38- Lin- de SCU a un medio de cultivo para CTPH adicionado con las neurotrofinas NGF, BDNF y GDNF, y a los factores de crecimiento FGF2 y EGF *in vitro* modifica los patrones de proliferación y expansión hematopoyética, la expresión de marcadores neurales y la adquisición de morfologías no convencionales en linajes hematopoyéticos.

PARTICULARES

- Observar el efecto de la adición de neurotrofinas en los patrones de proliferación celular.
- Evaluar el efecto de la adición de neurotrofinas en el contenido de progenitores conforme los días en cultivo
- Cuantificar la expresión de marcadores neurales en la población inducida
- Evaluar el efecto de la adición de neurotrofinas en la adopción de morfologías no convencionales.
- Observar si el tratamiento a 3 fases, y la exposición a los medios neurales, modifica la expresión del marcador hematopoyético CD45.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS DE SCU

De acuerdo a las normas institucionales del Hospital General de Zona Troncoso y del Comité de Ética del Centro Médico Nacional SXXI se tomaron muestras de SCU de embarazos normales a término de mujeres de 19 a 40 años de edad. La sangre fue obtenida por la Dra. Guadalupe Alarcón y por el personal de tococirugía del hospital posterior al nacimiento de la placenta mediante la punción de la vena umbilical y vaciamiento de la sangre por gravedad en bolsas de colecta. Las bolsas de colecta son de fabricación especificada con medio CDF y 35ml de heparina como anticoagulante. Las muestras fueron procesadas durante las 12 horas posteriores a la toma.

Para obtener la banda de CMN de SCU se realizó un gradiente de densidad con Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare™). Las células fueron sembradas en medio Advanced RPMI 1640 (Gibco) con 20 % de suero fetal bovino (SFB) Hyclone® y 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de la mezcla de 5 antibióticos (eritromicina [12 $\mu\text{L}/\text{mL}$], penicilina-estreptomicina [12 $\mu\text{L}/\text{mL}$], gentamicina [10 $\mu\text{L}/\text{mL}$], vancomicina [12 $\mu\text{L}/\text{mL}$]) en cajas de petri de poliestireno para favorecer la adherencia de células sanguíneas adherentes así como células de linajes no hematopoyéticos como fibroblastos, células endoteliales y células mesenquimales o bacterias que pudieran haber sido desprendidas durante el procedimiento de obtención.

El número celular y la viabilidad se determinaron a partir de conteo en hemocitómetro con diluyente de Turk y con azul de tripano, respectivamente.

ENRIQUECIMIENTO CELULAR

Las CMN sembradas se recuperaron al día siguiente y las cajas se lavaron suavemente con PBS para disminuir el desprendimiento de las células adheridas así como de bacterias provenientes de la muestra.

Para el procedimiento de enriquecimiento, se lavó la muestra con PBS y se obtuvo una suspensión celular que posteriormente se incubó con el coctel de anticuerpos del kit StemSep® *Human Primitive Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Kit* (Stem Cell Technologies™) para enriquecimiento por selección negativa de la población CD34+CD38-Lin-. El coctél de anticuerpos para identificación de las poblaciones Lin+ se compone de: CD2, CD3, CD4, CD16, CD19, CD24,

CD36, CD38, CD45RA, CD56, CD66b y glicoforina A . Se incubó la suspensión a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se incubó con un coloide magnético para permitir la adherencia de las células en la columna inmunomagnética utilizada posteriormente.

CULTIVO CELULAR

Los cultivos celulares de la fracción enriquecida se llevaron a cabo en un esquema de cultivo tipo Delta de tres fases desarrollado previamente en nuestro laboratorio, con una duración total de 25 días en cultivo a 37°C y a 5% de CO₂ .

Los primeros siete días de cultivo se consideraron como la fase de inducción, que tiene como objeto promover una inducción prematura de las células primitivas por factores solubles. Los siguientes siete días se consideraron como la fase de expansión en la cual se expone al cultivo a SFB para favorecer el crecimiento de la población. Los siguientes 14 días en cultivo se consideran como la fase de diferenciación/determinación en la cual el cultivo es expuesto a un medio de diferenciación neural.

Primera Fase

La suspensión celular recuperada y contada se dividió en 5 fracciones las cuales se sembraron en una misma placa de poliestireno de 24 pozos en medio libre de suero Stem Span® SFEM (Stem Cell Technologies) adicionado con citocinas (SCF, Flt-3, IL6, TPO, GM-CSF, G-CSF, IL3; todas a una concentración de 10ng/mL) o con una combinación de citocinas, factores de crecimiento (FGF2 y EGF; a 10ng/mL) (Peprotech®) y neurotrofinas (NGF, BDN, GDNF; a 15ng/mL) (Peprotech®). De acuerdo al número de recuperación celular el número celular sembrado fue de 5,000 a 15,000 células por pozo por mL de medio adicionado. Se mantuvo el cultivo durante siete días. La adición de citocinas como inductores se utilizó a partir de su uso en otros protocolos de diferenciación neural ⁸⁹.

Se excluyó el uso de eritropoyetina (EPO) en los cultivos dado que en ensayos previos, y de manera concordante con la literatura⁴¹ esta citocina favorece fuertemente la diferenciación, y por lo tanto el agotamiento, de los progenitores hematopoyéticos.

Las combinaciones de citocinas o citocinas-neurotrofinas utilizadas se detallan a continuación:

Tabla 1. Composición de citocinas y neurotrofinas en los cultivos utilizados.

Cultivo	Factores de crecimiento	Neurotrofinas
Seminal (SEM)	SCF, TPO, IL6, Flt-3	-
Mixto (MX)	SCF, TPO, IL6, Flt-3, GM-CSF, G-CSF, IL3	-
Hemato-neural (H1)	SCF, TPO, IL6, Flt-3	NGF, BDNF, GDNF
Hemato-neural2 (H2)	SCF, TPO, IL6, Flt-3, FGF2, EGF	NGF, BDNF, GDNF
Seminal + EGF+ FGF2 (EF)	SCF, TPO, IL6, Flt-3, FGF2, EGF	-

Se evaluó el efecto de las neurotrofinas en combinación dado que en la literatura se utilizan de esta manera; adicionalmente, ensayos preliminares mostraron que éstas tienen efectos similares en la proliferación celular tanto individualmente como en combinación. Dado que el propósito del trabajo es estudiar el efecto de las neurotrofinas sobre la diferenciación terminal se adicionaron únicamente en combinación con citocinas tempranas.

La combinación mixta se utilizó en los ensayos previos realizados por la Dra Flores Guzmán con resultados positivos, por lo cual se utilizó este cultivo como comparativo.

Segunda Fase

Al día 7 del cultivo se recuperaron las células de cada pozo, se lavaron con PBS y se resembraron en 2 mL totales de medio RPMI adv con 10% adicional de SFB. Se distribuyeron equitativamente en cajas de 2, 4 u 8 pozos, Lab-tek-CC²[™] de fondo de vidrio (Nunc®) recubierto químicamente con la molécula CC²[™] que asemeja la poli-l-lisina (información resguardada por el fabricante) que favorece la adhesión (recomendada para el crecimiento de células neurales). El cultivo se mantuvo siete días en esta fase.

Tercera Fase

Al día 14 de cultivo se recuperaron las células de cada caja, se lavaron con PBS y el número celular se dividió en 2. La mitad se resembró en la mitad de los pozos previamente utilizados en presencia del medio comercial NeuroCult® NS-A (Stem Cell Technologies™) y la segunda mitad se resembró en la segunda mitad de los pozos previamente utilizados en presencia del medio

DMEM-F12 N2 (utilizando el protocolo provisto por el Dr. Iván Velasco). El medio fue cambiado cada 3 días, durante 11 días más. Se esquematiza el método de cultivo en la **Figura 3**

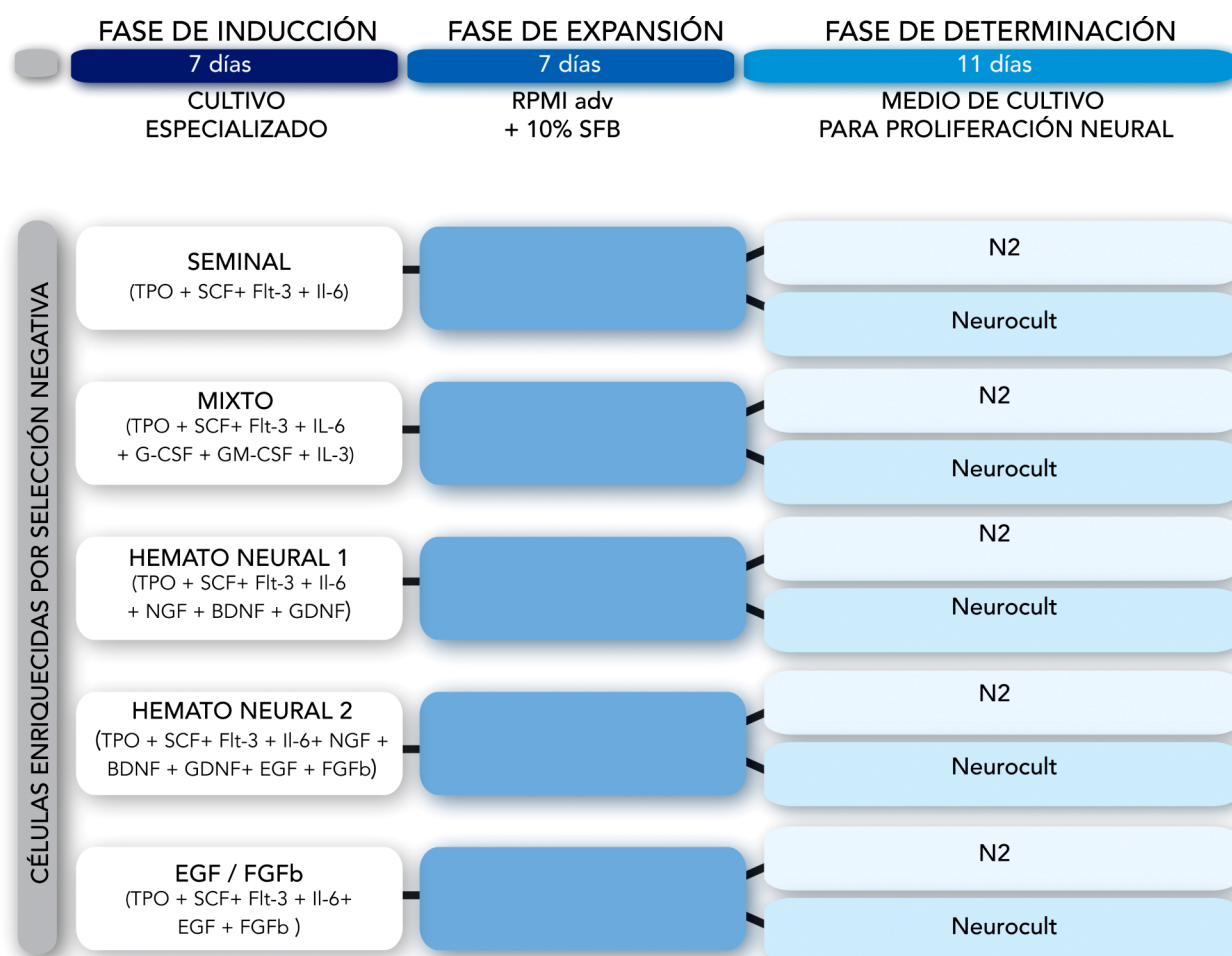


Fig. 3. Esquema de cultivo en 3 fases. En el cultivo a 3 fases. Durante la primera fase (la fase de inducción) las células se exponen a diferentes factores tróficos. Posterior a esta primera inducción el resto del cultivo, tanto en la fase de expansión como de determinación las células son cultivadas en las mismas condiciones.

CUANTIFICACIÓN CELULAR

La división de las CTH se da en función de la necesidad que tiene el organismo de restituir las poblaciones celulares sanguíneas o de repoblar las poblaciones celulares primitivas. En estos eventos la división celular puede analizarse a partir de 2 fenómenos distintivos, uno es aumentar el número total de las poblaciones celulares y el segundo es de incrementar poblaciones particulares a partir de la división clonal de un mismo progenitor.

La proliferación es la capacidad que tienen las células de multiplicar (sin distinción de linaje) los números totales celulares. La expansión, en contraste, es la capacidad que tienen las CTPH de

aumentar el número celular con características comunes. De esta manera, a partir de la cuantificación del aumento en el número total celular en cultivo puede evaluarse la proliferación celular y mediante ensayos de unidades formadoras de colonias puede evaluarse la expansión ⁴². A partir del comportamiento de las CTPH *in vivo* se han desarrollado técnicas para estudiar *in vitro* e *in vivo* las características y propiedades de las CTPH. Se ha observado que la siembra de progenitores comprometidos en medios semi sólidos (como el agar suave o en metilcelulosa) adicionados con factores inductores hematopoyéticos permiten la formación de agrupaciones celulares; colonias celulares. Las colonias que se forman a partir de la división clonal de un mismo progenitor pueden identificar a células progenitoras de diferente potencial. Así una colonia mixta (CFU-MIX; que contiene tanto células blancas o mieloides como células de linajes eritroides) caracteriza a un progenitor temprano multipotente, colonias compuestas de una estirpe particular como monocitos-granulocitos (CFU-GM) o eritroblastos tempranos (BFU-E) identifican a progenitores tempranos restringidos a estirpes celulares determinadas y colonias compuestas distintivamente de monocitos (CFU-M), granulocitos (CFU-G) o eritroblastos hemoglobinizados (CFU-E) identifican a progenitores más comprometidos ^{10,13}.

Proliferación Celular

Las células en cultivo se recuperaron y lavaron con PBS. Se hicieron conteos celulares en cada cambio de fase utilizando hemocitómetro y el diluyente de Turk; la viabilidad celular (conteo con azul de tripano) se empleó para hacer un cálculo del número de células vivas en cultivo. Los datos presentados posteriormente son datos de células vivas en cultivo y están normalizados al número celular inicial de siembra. Para realizar el conteo de células adherentes, las células adheridas se incubaron con Tripsina-EDTA, durante 3-5 minutos a 37°C. Después de este tiempo se inhibió la acción de tripsina con SFB. Se recuperaron las células y se lavaron 2 veces.

Como controles de proliferación se mantuvo una fracción celular durante los 25 días de cultivo en exposición de medio libre de suero y con las citocinas de los diferentes esquemas (SEM, MX, H1, H2 o EF).

Ensayo de Colonias Hematopoyéticas (Expansión celular)

Para hacer la estimación de la expansión de progenitores hematopoyéticos se realizó un ensayo de colonias en cada fase del cultivo. En cada cambio de fase se recuperaron 1,000 células de cada tipo de cultivo y se sembraron en el medio comercial de metilcelulosa suplementada con citocinas (SCF, GM-CSF, IL3, EPO) MethoCult® H4434 (Stem Cell Technologies™) en placas de poliestireno de 24 pozos a 37°C y a 5% CO₂ durante 14 días. Al término de este tiempo,

utilizando un microscopio invertido en campo claro, se cuantificaron y clasificaron las colonias hematopoyéticas de acuerdo a la clasificación descrita previamente. Para su análisis, las colonias hematopoyéticas clasificadas y cuantificadas se agruparon en mieloides (CFU-G, CFU-M, CFU-GM), eritroides (BFU-E, CFU-E) o mixtas (MIX). Se estimó el número de progenitores contenido a partir de la relación del número de colonias hematopoyéticas con el número de células en cultivo.

INMUNOCITOQUÍMICA

Para evaluar la expresión de marcadores de linajes neurales se utilizó la técnica de inmunocitoquímica por revelado con cromógeno y contraste con hematoxilina.

Se utilizó el kit Dako Envision™+System-HRP(DAB) (REF K4007) o se utilizó el equipo automatizado VENTANA Benchmark GX (Roche).

En el día de obtención y enriquecimiento, en el día 7 de cultivo y en el día 25 de cultivo se recuperaron las células y lavaron con PBS. Se hicieron laminillas por citocentrifugación (Cytocentrifuge 7620 Cytopro™). Una vez secas, éstas fueron fijadas con acetona al 100% a -20°C durante 5 minutos y se dejaron secar al aire. En el caso de los pozos con células adherentes, los pozos fueron enjuagados rápidamente con PBS y posteriormente con acetona fría y dejadas a secar al aire. Las laminillas fueron almacenadas a 4°C o a -20°C si el uso sería a largo plazo.

Las muestras se hidrataron con PBS, se permeabilizaron con Tween 20 al 0.01% en frío. Se utilizó el bloqueador de la peroxidasa del kit durante 15 minutos y se hizo un bloqueo de sitios inespecíficos utilizando albúmina bovina al 10%. Se aplicó el anticuerpo primario de 4 a 6 horas; toda la noche en el caso de células adherentes o una hora en el sistema automatizado.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales y en las concentraciones indicadas:

Tabla 2. Anticuerpos y concentraciones utilizadas	
TrkA (abcam® Cat. AB76291)	[1:100]
TrkB (abcam® Cat. AB18987)	[1:200]
SCFR (R&D® Cat. MAB332)	[1:100]
MAP2 (Millipore™ Cat. MAB3418)	[1:100]

A2B5 (Millipore™ Cat. MAB312)	[1:200]
Nestina (Millipore™ Cat. MAB5326)	[1:100]
Gfap (Dako No. M 0761)	[1:100]

Se utilizó el polímero pol-HRP del kit o el multímero-HRP (TrkA, TrkB) durante 1 hora. Se utilizó diaminobencidina (DAB) como revelador y la hematoxilina como contraste. Una vez secas se utilizó el medio de montaje no acuoso VectaMount™ para montar las laminillas.

Se fotografiaron 5 campos aleatorios a una magnificación de 20x (utilizando y estabilizando la iluminación con ayuda del software AxioVision 4.8.2). Se contó el número de células positivas y negativas (con precipitación café) utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ⁹⁸

Se utilizaron como controles positivos las líneas celulares de neuroblastoma y glioblastoma, SH-SY5Y (ATCC® Cat. CRL-2266™) y CCF-STTG1(ATCC® Cat. CRL-1718) respectivamente, y tejido disociado de cerebro de rata, regalo de la M en CQ Janet Barroso. Como controles negativos se utilizaron las propias muestras omitiendo el anticuerpo primario, y las líneas celulares M210B4(ATCC® Cat. CRL-1972), CaSki y HS5, las últimas regalos de los laboratorios del Dr. Alberto Monroy y del Dr. Juan José Montesinos.

MORFOLOGÍA

Para evaluar el cambio en la morfología celular conforme los días en cultivo, se fotografiaron 5 campos aleatorios a una magnificación de 20x utilizando y estabilizando la iluminación con ayuda del software AxioVision 4.8.2. Se evaluaron 3 grupos de morfologías definidas: Redondas, Dendríticas, Bipolares, agrupando morfologías similares. Se utilizaron y modificaron los paneles de identificación morfológica previamente descritos para células mesenquimales⁷⁸ y para células CD34+¹⁰⁰ derivadas de SCU en protocolos de diferenciación neural.

CITOMETRÍA

Para evaluar la expresión de marcadores de linaje hematopoyético se recuperaron y lavaron células en el día de obtención (1×10^6) y de enriquecimiento ($\approx 300 \times 10^3$), en el día 7 y 25

de cultivo (de 60×10^3 a 150×10^3 por bajo número celular). Se realizó una tinción directa. Las muestras se incubaron durante veinte minutos a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados:

Tabla 3. Composición de citocinas y neurotrofinas en los cultivos utilizados.	
CD38 FITC	Mouse anti-human mAb clona HIT2 (Invitrogen MHCD38014)
CD34 APC	Mouse anti-human mAb clona 581 (BD Pharmingen™ Cat.555824)
CD45 APC	Mouse anti-human mAb clona HI30 (BD Pharmingen™ Cat.555485)
CD45 FITC	Mouse anti-human mAb clona HI30 (Invitrogen MHCD38014)
Mouse IgG1, (TRI-COLOR®)	Mouse (Invitrogen MG106)

Se lisaron eritrocitos y se fijaron las muestras utilizando la solución de lisis y fijación BD FACS™ Lysing Solution. Se lavaron posteriormente con PBS EDTA. Las muestras se resuspendieron en PBS con 3% de SFB y se guardaron a 4°C hasta su lectura. Las muestras fueron leídas en un periodo no máximo de 7 días posteriores a la tinción y fijación. Se utilizó un equipo BD FACSCalibur flow cytometer con BD FACS Loader con la configuración original de los sistemas óptico, electrónico y de fluidos.

La calibración del equipo y el establecimiento de los parámetros se realizó utilizando las células cultivadas en citocinas hematopoyéticas todos los días de cultivo, y ajustando a las poblaciones autofluorescentes. Para la evaluación del número total de las poblaciones CD45+, CD34+, CD34+CD38- se utilizó como guía el *gating* descrito por Doulatov et al¹⁰¹

Para la evaluación de CD34 y CD45 al d7 de cultivo se analizó la región descrita para las poblaciones de linfocitos dada la distribución mayoritaria de células en esta región^{102,103}.

Para las poblaciones al día 25 de cultivo se guardó el número total de eventos y se analizaron las poblaciones existentes en regiones separadas, evitando las poblaciones extremas para evitar el análisis de dímeros y de detritos celulares. Se analizaron los datos con el software de análisis FlowJo (©TreeStar).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el paquete estadístico *SPSS* para el análisis de proliferación, adherencia, expresión de receptores y marcadores, unidades formadoras de colonias y morfología. Se aplicó la prueba Kolmogorov-Smirnov para evaluar normalidad de las poblaciones para todas las variables.

Se realizaron ANOVA de un factor para comparar proliferación y número de progenitores entre cultivos, y una prueba de Wilcoxon para datos pareados para expresión de marcadores y adherencia. Se utilizó la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos significativos se consideraron a una $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se utilizaron 42 muestras de SCU en total. Las CMN de SCU obtenidas después de un día de cultivo presentaron viabilidades mayores al 90% en todos los casos (aquellas con viabilidad <90% fueron descartadas). Posterior a la separación inmunomagnética, las células presentaron una viabilidad cercana al 100% en todos los casos (n=30).

En la **Tabla 4** se resumen las características principales de las muestras utilizadas:

Tabla 4. Resumen de características principales de las muestras utilizadas	
	Media ± Desv. St
Edad de las madres (n=19)*	Media 27.3 Mediana 27 años Rango- 19-40 años
Volumen promedio por unidad de SCU (ml) (n=33)	107.5 ± 21.4
Número total de células nucleadas por unidad de SCU (x10 ⁸)	3.00 ± 1.21
# de CMN/mL de SCU el día de toma (n=33)	2.67x10 ⁶ ± 0.8710 ⁶
% de recuperación de células mononucleares de SCU posterior a un día de cultivo (considerando como 100% el total de células obtenidas del gradiente de Ficoll; n=33)	61.5% ± 17.08
% relativo de células CD34+ en CMN de SCU previo a columna (n=4)	0.84% ± 0.61
% relativo de células CD34+ CD38- en la población CD34+ de CMN de SCU previo a columna (n=4)	33.45% ± 11.59
% de recuperación celular posterior a selección negativa por columna inmunomagnética. (n=4)	0.26% ± 0.27
% relativo de células CD34+ en la fracción enriquecida al D0 (n=4)	54.27% ± 8.78
% relativo de células CD34+ CD38- en la población CD34+ de la fracción enriquecida al D0 (n=4)	99.125% ± 0.97
* En la evaluación de la edad de las madres al momento del nacimiento se reporta tanto la mediana como el rango de edades.	

El porcentaje de células CD34+ en SCU es cercano al 1% de la población total, lo cual es consistente con reportes previos^{104,105}. La recuperación de células CD45+, CD34+ se encuentra en el rango de incremento descrito por el fabricante para el kit de separación utilizado. Las poblaciones celulares de SCU previa y posterior a la columna se nombraron como CMN o Lin- respectivamente debido a la naturaleza de la población.

Al analizar los porcentajes relativos de células CD45+ en las poblaciones de CMN y Lin- encontramos que son similares, $96.2\% \pm 4.03$ y $97.17\% \pm 2.46$ respectivamente. A pesar de que en ambas poblaciones hay una expresión similar de CD45+, el porcentaje relativo de células CD34+ aumenta 64.6 veces en la población de Lin- en comparación con las células CMN lo cual se encuentra dentro de lo reportado previamente en la literatura¹⁰⁶. Adicionalmente, al analizar por citometría a la población CD34+ de la población Lin-, esta es casi exclusivamente CD38- $98\% \pm 1.1$ (Ver **Figura 4**). Estas observaciones permitieron deducir que la población utilizada era una población enriquecida en células primitivas de linaje hematopoyético.

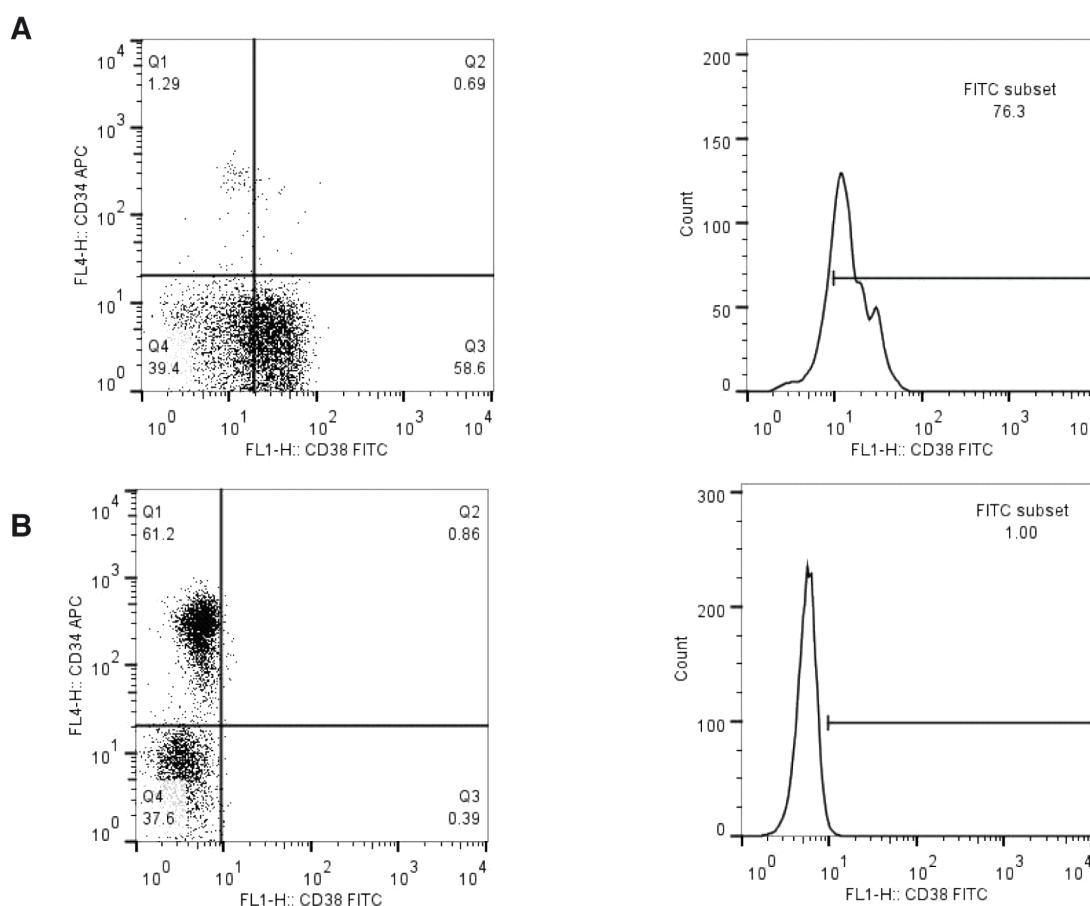


Fig. 4. Enriquecimiento de la población celular CD34+ CD38-. **A** Las figuras superiores representan a la población CMN, a la izquierda se muestra el porcentaje relativo de células CD34+, a la derecha se muestra el porcentaje de células CD38+ en la población CD34+. **B** Las figuras inferiores representan a la población Lin-, a la izquierda se muestra el porcentaje relativo de células CD34+, a la derecha se muestra el porcentaje de células CD38+ en la población CD34+

Para corroborar la eficiencia del procedimiento de separación y enriquecimiento en las poblaciones tempranas se evaluó la presencia de progenitores hematopoyéticos funcionales tanto de las poblaciones celulares CMN y Lin- mediante ensayos de UFC. En la **tabla 5** se presentan los porcentajes de UFC encontrados en relación al número celular absoluto.

Tabla 5. Contenido de UFC Mieloides, Eritroides o Mixtas previa y posteriormente a la separación inmunomagnética. Los datos se reportan en % ± desviación estándar de progenitores en relación al número de células en cultivo (n=10)				
	Mieloides	Eritroides	Multipotentes	Totales
CMN	0.31 ± 0.27	0.18 ± 0.11	0	0.51 ± 0.39
Lin-	2.5 ± 0.19	2.6 ± 0.18	0.05 ± 0.07	6.08 ± 3.39

El número de UFC totales aumenta 11.9 veces posterior al enriquecimiento por columna, este incremento es concordante con reportes previos realizados por nuestro grupo¹⁰⁶. El enriquecimiento en el número de progenitores contenidos en la población recuperada, refuerza la evidencia de que las poblaciones celulares iniciales son células primordialmente hematopoyéticas con una proporción importante de células con características primitivas.

Todas las células recuperadas posterior a la columna de separación son similares en morfología: células pequeñas, redondas y en suspensión, como se han caracterizado previamente las poblaciones primitivas hematopoyéticas².

Se ha documentado con anterioridad que células de linajes hematopoyéticos expresan receptores a factores neurotróficos, TrkA, TrkB, TrkC y la familia de co-receptores de Ret tanto en linajes hematopoyéticos maduros para funciones específicas^{48,108,109,110} como en células de SCU de manera constitutiva¹¹¹ e inducida⁸⁹. Se evaluó de manera inicial la expresión de los receptores a neurotrofinas TrkA y TrkB y así como la expresión del receptor para SCF para evaluar si existe una variación en la expresión de los receptores por el esquema de cultivo. En la **Tabla 6** se presentan los porcentajes de células positivas a los receptores evaluados (**Ver figura 5**).

Tabla 6 Porcentaje de células positivas para los receptores de neurotrofinas TrkA y TrkB, y para el receptor de SCF en la población de CMN o en la fracción enriquecida Lin-. Se evaluaron 3 muestras no relacionadas en cada caso. Se reporta % de células positivas \pm error estándar.			
	TrkA	TrkB	SCFR
CMN	24.89 \pm 18.95%	16.13 \pm 3.88 %	65.67 \pm 28.75%
Lin-	3.39 \pm 1.24%	18.6 \pm 3.85 %	30.47 \pm 16.32%

La expresión de SCFR es importante dado que se ha reportado que éste es un marcador de células hematopoyéticas tempranas y dicha expresión se encuentra favorecida en las poblaciones de SCU¹². Sin embargo, es importante notar que este receptor se encuentra en mayor proporción en la fracción mononuclear y posterior a la columna el porcentaje de células positivas disminuye casi a la mitad. Se ha descrito previamente que las poblaciones celulares CD34+CD38+ de SCU tiene una mayor frecuencia de expresión de éste receptor que las poblaciones CD34+CD38-¹⁰⁴ y hay poblaciones celulares, descritas en MO, que lo expresan como progenitores comprometidos de la línea mieloide y en una pequeña fracción de células NK¹¹⁵. El porcentaje de células CD117+ es mucho mayor al reportado en otros estudios⁸⁹, no obstante es importante notar que ésta evaluación, a diferencia de otros estudios, no se realiza en muestras criopreservadas. A pesar de esta diferencia en la población de CMN, el porcentaje de expresión de este receptor en la población Lin- es concordante con reportes previos¹⁰⁴.

Se ha documentado que la expresión de TrkA es casi 5 veces mayor en la población CD34+ de CMN de SCU (aprox 30%) que en la misma población proveniente de MO¹¹⁰, sin embargo, como se ha expuesto con anterioridad, las células CD34+ en la sangre de cordón umbilical no sólo identifican a las poblaciones celulares más primitivas, por lo que la fuerte presencia del receptor sea relevante en diversos procesos biológicos. Se ha observado el efecto de NGF en la maduración de órganos inmunológicos y así la maduración de células B¹³⁵. A pesar de esto, se sabe que gran cantidad de factores tróficos tienen funciones pleiotrópicas por lo que el efecto que pudiera tener ésta u otras neurotrofinas en las poblaciones hematopoyéticas más primitivas se desconoce así como la relevancia de la expresión de la señalización de este receptor en poblaciones celulares más primitivas.

Al igual que los receptores a neurotrofinas, se ha descrito con anterioridad que en la fracción de CMN de SCU existe una fracción celular con características hematopoyéticas, capaces de presentar marcadores de linajes neurales en proporciones bajas. Sin embargo no se ha analizado

la expresión de marcadores para poblaciones celulares hematopoyéticas en la población Lin-. Para caracterizar con más detalle a la población inicial y para poder tener referencia se evaluó por inmunocitoquímica la expresión de marcadores neurales. Se identificaron células positivas para Nestina, GFAP, MAP2 y A2B5 en proporciones bajas tanto en la fracción mononuclear de SCU como en la fracción enriquecida Lin- (**Tabla 7, Ver figura 5**).

Tabla 7. Porcentaje de células positivas para marcadores de linaje neurales: Nestina, GFAP, MAP2 y A2B5 al día 0 de cultivo en las poblaciones CMN y Lin-. Se evaluaron 3 muestras no relacionadas en cada caso. Se reporta % de células positivas \pm error estándar				
	Nestina	GFAP	MAP2	A2B5
CMN	8.12 \pm 4.18	0.16 \pm 0.01	12.38 \pm 5.9	36.83 \pm 16.9
Lin-	11.88 \pm 3.7	2.43 \pm 2.0 *	6.05 \pm 2.19	4.71 \pm 2.57

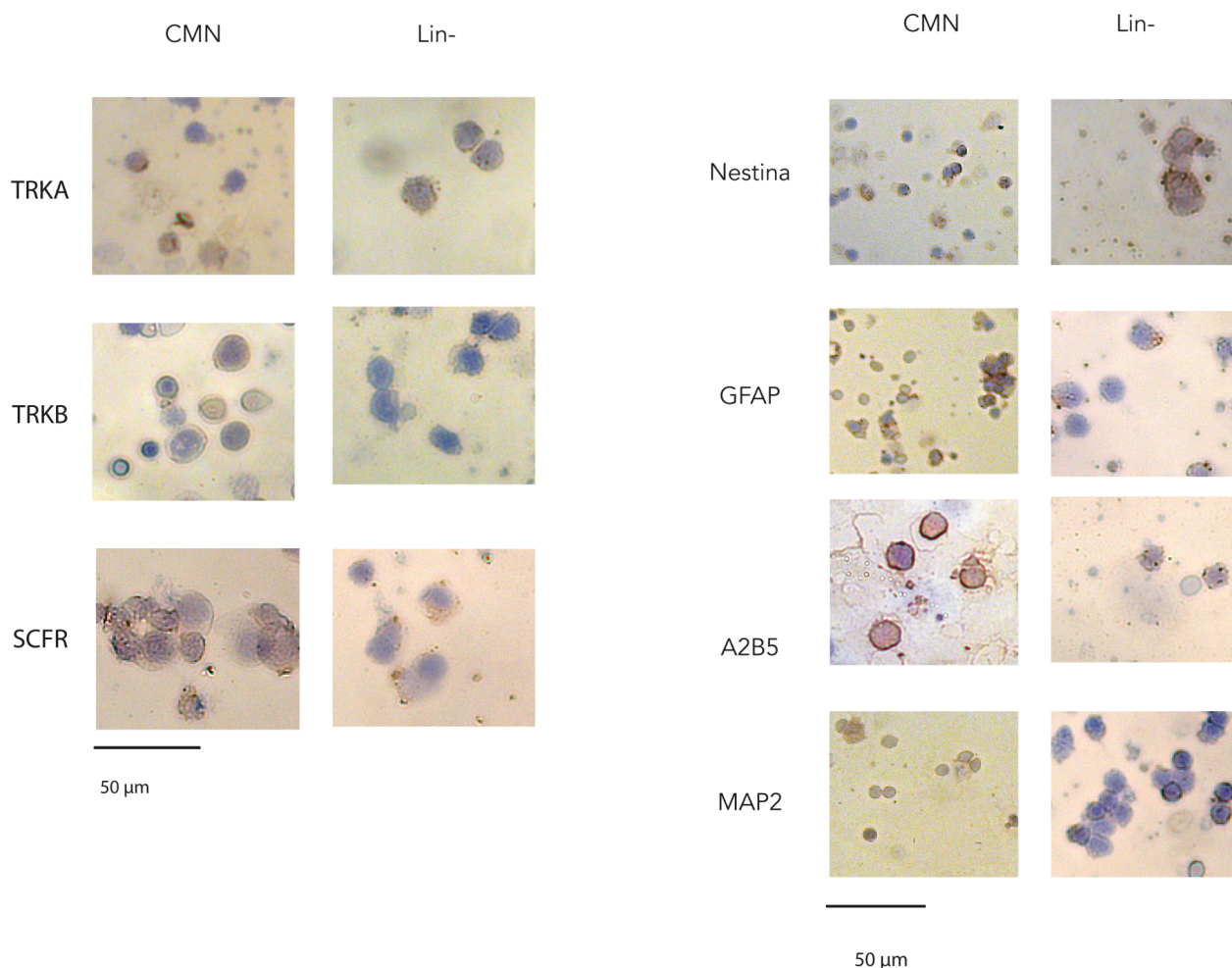


Fig. 5. Inmunocitoquímicas d0 CMN y Lin-. Panel izquierdo. Inmunocitoquímicas (de arriba hacia abajo) de TrkA, TrkB y SCFR. Las figuras en la línea izquierda son fotografías a

campo claro de CMN de SCU , en la línea derecha se muestran fotografías en campo claro de la fracción enriquecida Lin- para los mismos marcadores. **Panel derecho.** Inmunocitoquímicas (de arriba hacia abajo) para Nestina, GFAP, A2B5 y MAP2. Las figuras de la línea izquierda son fotografías en campo claro de CMN de SCU. Las figuras de la línea derecha son fotografías en campo claro de la fracción enriquecida Lin- para los mismos marcadores.

Como se ha mencionado previamente, se han descrito poblaciones positivas para Nestina, GFAP, MAP2 y A2B5 en SCU sin embargo la relevancia, proporciones e identidad de las células que expresan dichos marcadores no han sido descritas detalladamente. A pesar de que los porcentajes de células positivas para Nestina, GFAP y MAP2 son relativamente bajos en la fracción de celular heterogénea de CMN, no se observa una gran diferencia en la expresión de estos marcadores en comparación con la población enriquecida, no así en el caso de la expresión de A2B5. Es notorio que el porcentaje de células positivas para la marca de A2B5 es muy alta, mientras que este valor disminuye casi 8 veces en la fracción enriquecida, no obstante esta percepción, la diferencia no es estadísticamente significativa. Se ha reportado que la estirpe celular monocito/macrófago expresa gangliósidos¹²³, lo cual podría explicar la disminución de la marca al eliminar estos linajes, sin embargo, el tipo de gangliósidos que se asocia a estos linajes celulares no es aquel para el cual se ha identificado principalmente el anticuerpo (Ver p.42). La diferencia en marca puede estar asociada a la expresión de otro tipo celular que exprese dicha serie lipídica o que existan diferencias en la expresión lipídica de éstos grupos celulares en SCU. Dicha caracterización no se ha hecho previamente.

PROLIFERACIÓN y EXPANSIÓN CELULAR

Las características proliferativas y de expansión de las poblaciones celulares hematopoyéticas han sido estudiadas *in vivo* e *in vitro* para caracterizar poblaciones celulares particulares. Se sabe que los cultivos *in vitro* necesitan el estímulo de citocinas hematopoyéticas para la supervivencia¹¹², el tránsito en el ciclo celular¹¹³ o a determinación y diferenciación celular⁵⁵.

En la literatura, distintos protocolos de plasticidad han utilizado neurotrofinas como inductores tanto de manera individual como en combinaciones de éstas, sin embargo el efecto en nuestra

población y en el esquema de cultivo utilizado no estaba determinado. Para determinar cuál sería la o las neurotrofinas a utilizar en los posteriores experimentos, se evaluó si el uso individual o en combinación de las neurotrofinas NGF, BDNF y GDNF ejercía un efecto distintivo en el comportamiento celular normal. Se cuantificó la proliferación de la población Lin⁻ en presencia de citocinas hematopoyéticas de supervivencia (cultivo SEM) y las neurotrofinas individuales o en combinación. Se observaron variaciones leves en el número celular en exposición a cada una de las neurotrofinas en comparación con el cultivo SEM. A pesar de no haber diferencias significativas en la variación del número celular total se observó una ligera tendencia positiva a la presencia de neurotrofinas en combinación al día 14 de cultivo (**Ver Figura 6**). Dado que los números celulares inicialmente sembrados y recuperados en cada una de las fases del cultivo son una gran limitante para realizar los diferentes ensayos se optó por utilizar la combinación de neurotrofinas y así poder recuperar la mayor cantidad celular posible.

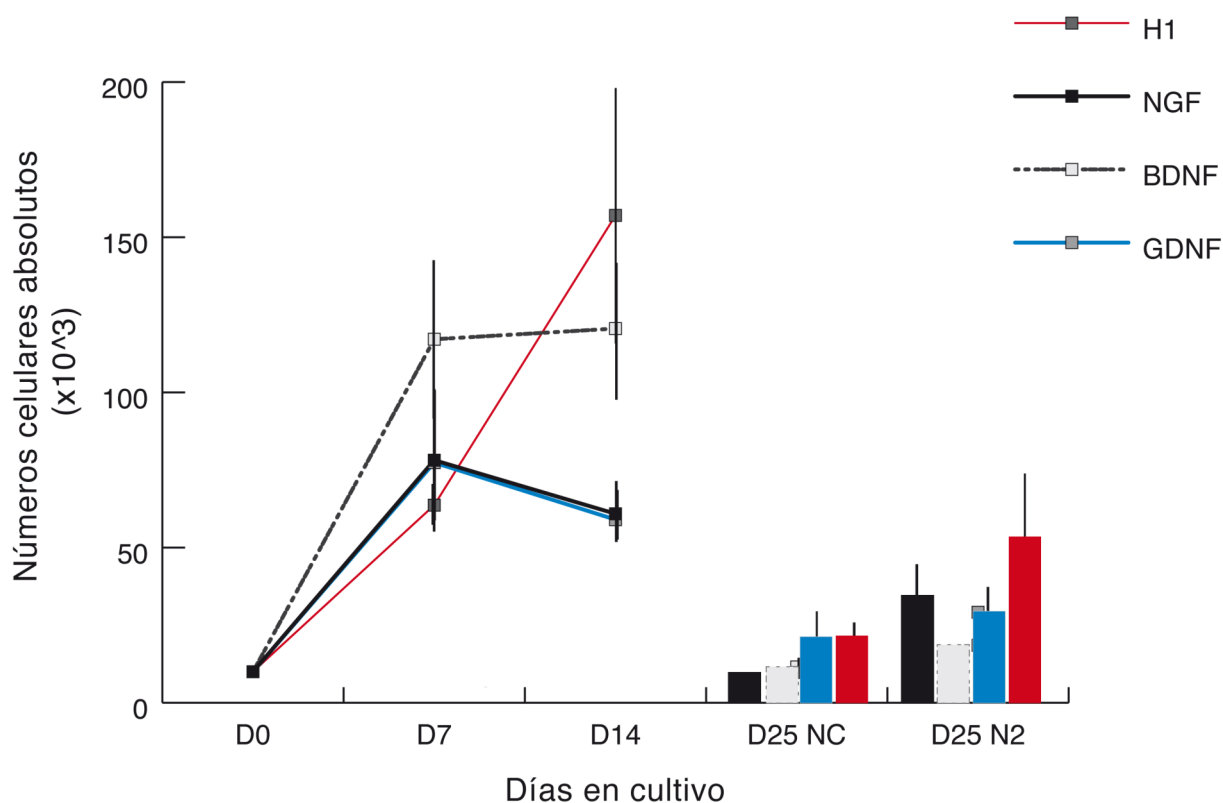


Fig. 6. Proliferación de células Lin⁻ en exposición a las neurotrofinas NGF, BDNF y GDNF de manera individual o en combinación. La cinética de proliferación de las células Lin⁻ en un esquema de tres fases no muestra diferencias significativas en ningún punto entre la exposición a neurotrofinas individuales o en combinación. Se muestran las medias ± error estándar (n=4).

Proliferación

Al día 7, el cultivo SEM y el cultivo MX tuvieron incrementos de 6 y 21 veces, respectivamente, respecto al número celular inicial, lo cual es concordante con reportes previos¹⁰⁶, así como el súbito incremento en el número celular del día 7 al 14 en el cultivo MX^{41,114}. Respecto a los cultivos adicionados con neurotrofinas o EGF y FGF2, los cultivos H1, H2 y EF exhibieron un patrón de proliferación similar al cultivo SEM a lo largo de todo el cultivo. El aumento en el número celular del cultivo MX aumentó significativamente hasta el día 14 de cultivo, después del cual hay un decremento en las poblaciones con lo cual el número celular ya no es significativamente diferente del resto de los cultivos. El aumento en el número celular al día 7 del cultivo MX fue significativamente mayor a los cultivos SEM y H1 ($p < 0.01$), no así de los cultivos adicionados con EGF y FGF2. Al día 14, el mismo cultivo muestra un aumento en la proliferación celular que es de casi 3 veces el número celular del día 7 *in vitro*. Sin embargo, al día 25 *in vitro*, los números celulares absolutos de todos los cultivos (incluido el cultivo MX) disminuyen en comparación con el número de células vivas al día 14. Aunque persiste una diferencia aparente en las poblaciones MX la desviación del número celular total es tan grande que en realidad no hay diferencias estadísticamente significativas (**Ver figura 7**). Los demás cultivos presentan un incremento poblacional moderado durante los primeros 7 días en ausencia de suero y en exposición a citocinas que, a pesar de alcanzar un pico en el número poblacional (en general) de ninguna manera se compara con los valores obtenidos en las poblaciones expuestas a citocinas hematopoyéticas intermedias y tardías.

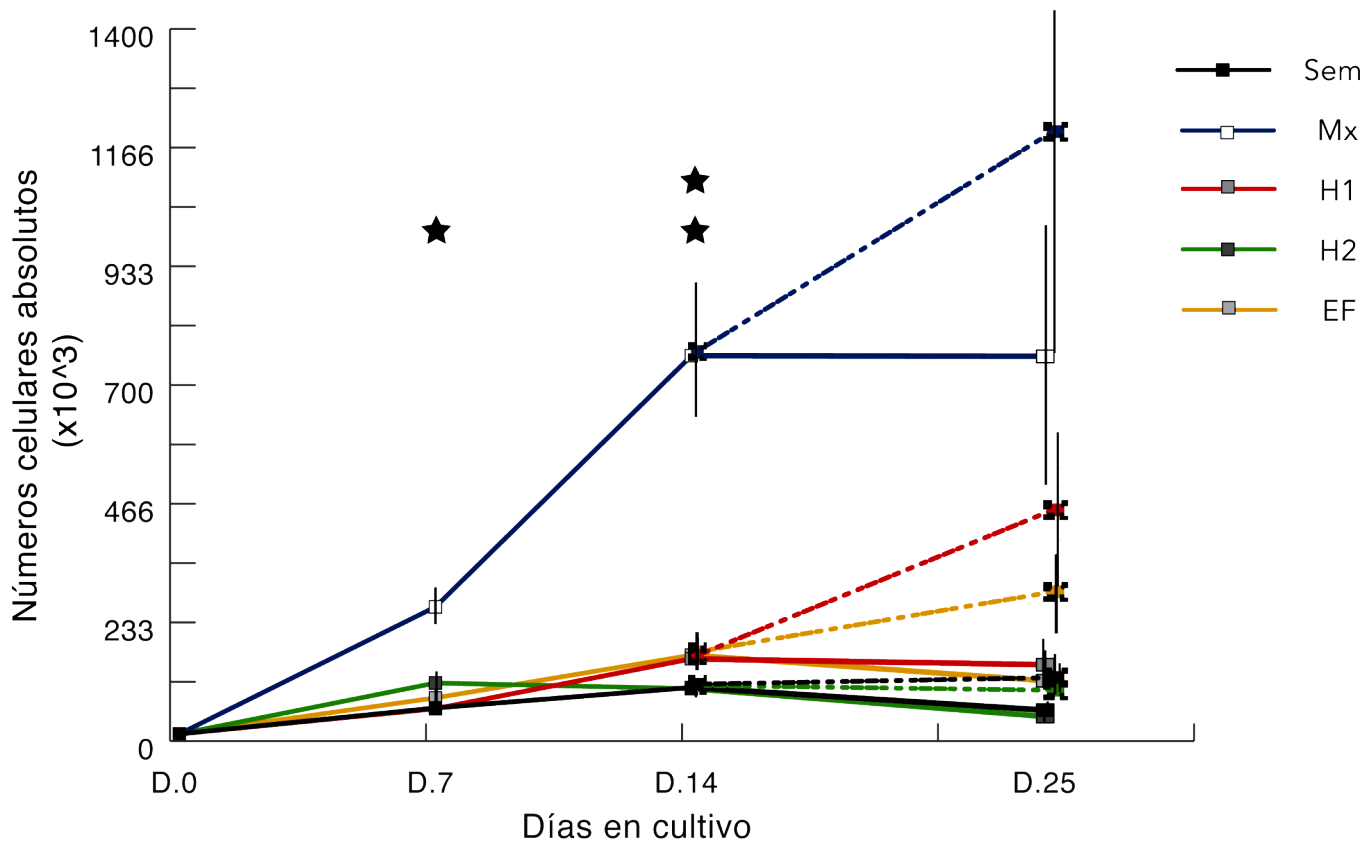


Figura 7. Proliferación de células Lin- a lo largo de 25 días de cultivo. Posterior al día 14 de cultivo se divide el número celular para siembra en medios de determinación neural. Se grafica el número total de células en cultivo, tanto la fracción adherente como no adherente. Del día 14 de cultivo al día 25 hay una distinción en las fracciones expuestas a Neurocult o a N2. Las líneas continuas representan los cultivos expuestos a medio comercial Neurocult, las líneas discontinuas a los cultivos en N2. Se nota con ★ el día durante el cultivo en el cual se encuentran diferencias significativas. El número celular es significativamente mayor al día 7 en el cultivo mixto en comparación con el cultivo SEM y H1 mientras que al día 14 de cultivo es mayor el número a todos los demás cultivos (posterior al cultivo en SFB). Se nota diferencia significativa ($p < 0.05$) ($n = 7$). Se presentan las medias \pm error estándar.

La tendencia de mantener las poblaciones celulares de manera constante a lo largo del cultivo en los cultivos SEM, H1, H2 y EF sólo nos pueden sugerir que, a pesar de que parecen no ser relevantes en el estímulo proliferativo de las CTPH, no parecen ser inhibitoras de la proliferación y supervivencia de las poblaciones hematopoyéticas. Este efecto aparentemente irrelevante o neutro cobra importancia en posteriores evaluaciones.

Adherencia

Se ha documentado que tanto células de linajes neurales como células derivadas hacia linajes neurales necesitan adherirse para sobrevivir y posteriormente para iniciar los procesos de diferenciación y determinación^{66,68,90}. Se ha descrito que la proliferación y diferenciación de las

CPN *in vitro* es dependiente de la adherencia al sustrato²⁸ y en ensayos con tejido embrionario y líneas celulares de neuroblastoma el contacto con poli-L-lisina favoreció la supervivencia y la división celular¹¹⁶. Estos reportes sirvieron como antecedente metodológico para los ensayos realizados previamente por la Dra. Flores-Guzmán en nuestro laboratorio. Ella observó que las células efectivamente se adherían y adquirían con mayor facilidad morfologías no hematopoyéticas por lo cual decidimos mantener el mismo método de cultivo en el presente trabajo.

Durante la primera fase del cultivo las células se cultivan en una placa de poliestireno estéril y es durante estos primeros días de cultivo que los componentes en el medio de cultivo son los únicos estímulos a las poblaciones celulares. Al día 7 *in vitro* las células en suspensión se recuperaron y sembraron en placas pre tratadas con una molécula análoga a la poli-L-lisina para así favorecer la adhesión celular. Al día 14 en los pozos se encontraron de manera aleatoria e inconstante células adheridas a las placas (al realizar los lavados del pozo para hacer cambios de medio se desprendió la mayoría), sin embargo al día 25 hay una separación notoria en todos los pozos de una fracción adherente de morfología diversa y una fracción no adherente de células pequeñas y, en la mayoría de los casos, con baja viabilidad.

A pesar de las diferencias observadas en la proliferación celular, la proporción entre células adherentes y no adherentes fue la misma al día 7 y 14 *in vitro* en todos los cultivos. Al día 25 se observó que la exposición a los diferentes medios provocó una ligera diferencia entre las proporciones de células adheridas y no adheridas en los mismos cultivos expuestos a diferentes medios durante la tercera fase. A pesar de encontrar una mayor proporción de células adheridas en los cultivos expuestos a N2, las diferencias respecto al mismo cultivo expuesto a un medio neural diferente no fueron estadísticamente significativas debido a una gran variabilidad entre muestras (Ver **Figura 8**).

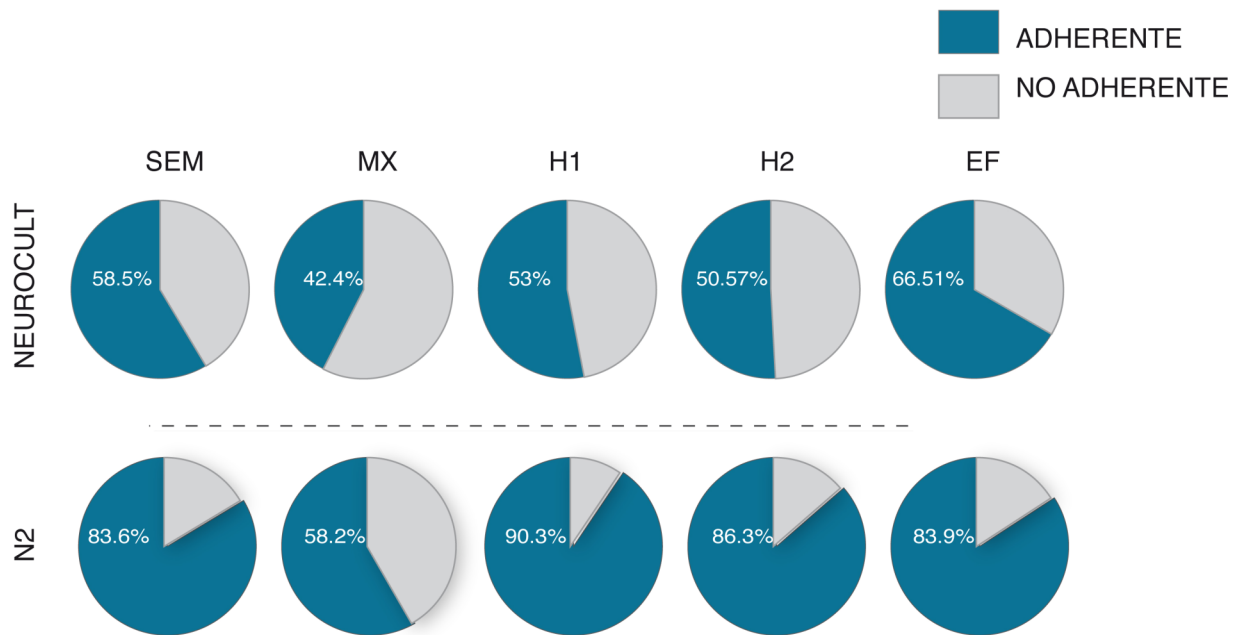


Fig 8. Porcentaje de Adherencia al día 25 de cultivo posterior a cultivo en medios de cultivo neural. Se grafica el porcentaje de células adherentes y no adherentes en relación al número celular total de células vivas recuperadas. En la línea superior se muestra la proporción de células adherentes y no adherentes de los cultivos expuestos a Neurocult. En la línea inferior se muestra la proporción de células adherentes y no adherentes de los cultivos expuestos al medio N2.

Expansión

Como se ha descrito previamente, uno de los criterios más importantes para evaluar la funcionalidad de la población hematopoyética primitiva es la cuantificación de UFC. A partir de los ensayos de colonias se pueden evaluar tanto el contenido de progenitores hematopoyéticos en una población celular determinada, como el comportamiento de los diferentes cultivos en el mantenimiento o agotamiento de las poblaciones primitivas.

El porcentaje inicial de progenitores respecto al número celular total, como se reportó en párrafos anteriores, es cercano al 6%. Al día 7 *in vitro*, el contenido de UFC en todos los cultivos aumenta de manera equivalente, alrededor de 2.5 veces, posterior a lo cual hay un decaimiento en todos los cultivos (Ver **Figura 9**). Se observó que la adición de neurotrofinas y de FGF2/EGF no inhibe ni modifica de manera notoria el desarrollo de UFC en comparación con los cultivos expuestos únicamente a citocinas hematopoyéticas. Sin embargo, la exposición a SFB favorece el agotamiento rápido de los progenitores hematopoyéticos lo que se ve reflejado en la disminución de unidades formadoras de colonias al día 14 y concuerda con el aumento en las poblaciones celulares totales observadas previamente en el análisis de proliferación celular.

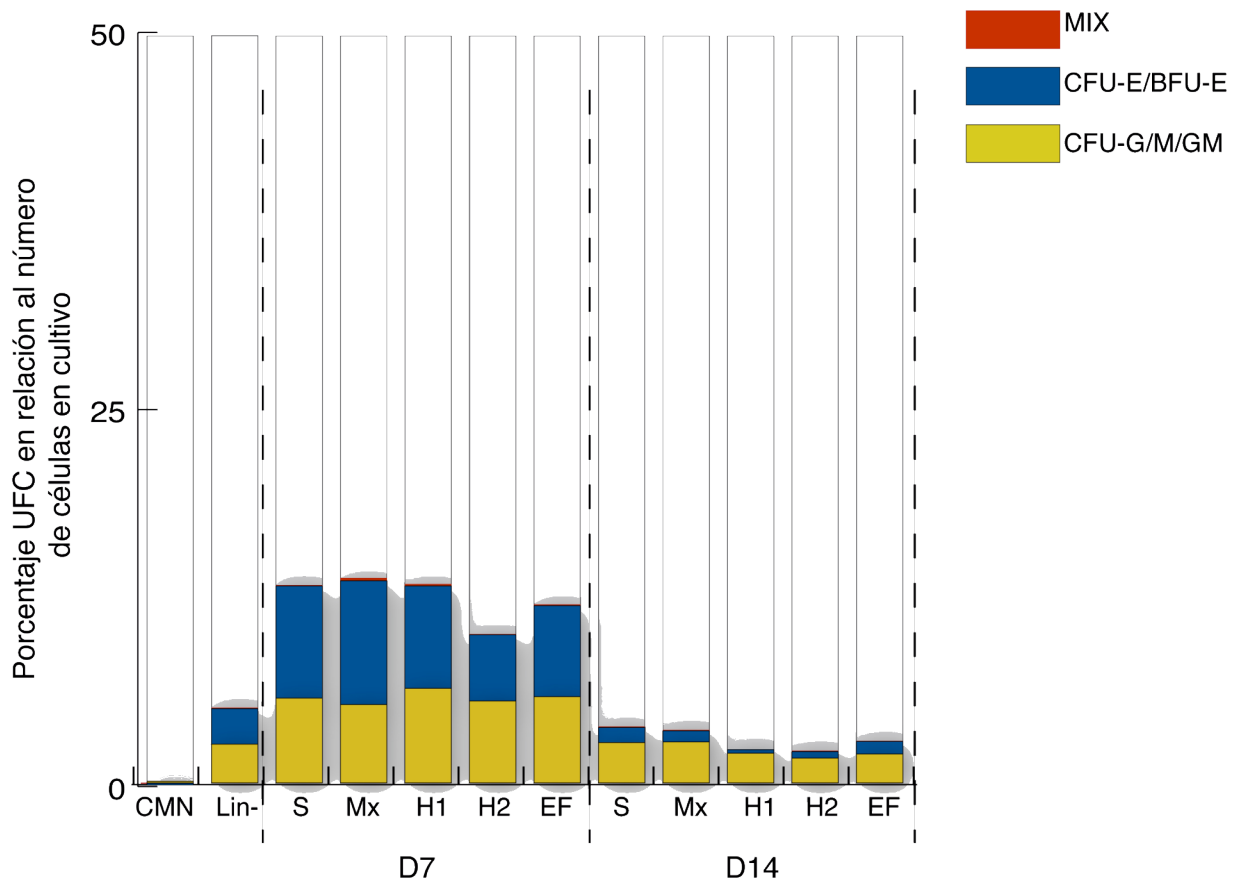


Fig. 9 Expansión de células hematopoyéticas contenidas en cultivos expuestos a neurotrofinas o citocinas hematopoyéticas por 14 días. Se presentan los datos como el porcentaje de progenitores contenidos en el total de células en cultivo de los 5 cultivos al día 7 y 14 así como las UFC de las CMN y de la población Lin- como referencia. No se grafica el contenido de progenitores posterior al día 14 dado que el número de colonias fue mínimo en las fracciones no adherentes y no hay progenitores en la fracción adherente.

MIX- Unidades formadoras de colonias mixtas; CFU-E/BFU-E- Unidades formadoras de colonias eritroides y Unidades formadoras de colonias en burst; CFU-G/M/GM- Unidades formadoras de colonias granulocíticas, unidades formadoras de colonias monocíticas y unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas.

El aumento en el número de UFC al día 7 es concordante con estudios previos¹¹⁴, sin embargo en este estudio la proporción de progenitores eritroides es ligeramente menor a la reportada. A pesar de no haberse encontrado diferencias significativas ni en el número relativo de progenitores en cultivo ni en el tipo de colonias producidas, se pudo observar que de manera muy discreta el cultivo H2 y el cultivo EF presentan una menor cantidad de colonias eritroides. Se ha asociado a FGF2 como un inductor de la mielopoyesis⁵⁵ al favorecer la proliferación y determinación de los progenitores mieloides¹¹⁷, lo cual podría explicar esta ligera diferencia.

Al día 14 *in vitro* el número de colonias en todos los cultivos se redujo a menos de la mitad del punto anterior. Al día 25 *in vitro* el número de colonias fue cercano a cero y aparecieron

únicamente en los ensayos derivados de las células encontradas en la fracción no adherente de los cultivos . A pesar de observar grupos celulares en los cultivos en metilcelulosa, su aparición era irregular en las muestras y los grupos celulares eran muy pequeños (*clusters*) y eran células blancas.

En reportes previos se ha documentado que hay una disminución progresiva de las poblaciones tempranas conforme los días en cultivo; no obstante, la exposición continua a citocinas hematopoyéticas demora el inicio de este decaimiento hasta los 21 días en cultivo ¹¹⁴. La disminución en la aparición de UFC con la caída drástica en el número de UFC posterior a la exposición a SFB y la pérdida casi total de UFC posterior a la exposición al medio neural. Esto podría deberse a que el SFB contiene una gran cantidad de factores y moléculas que funcionan como inductores potentes de la proliferación y diferenciación, y que facilitan el incremento de las poblaciones celulares a expensas del desgaste de la población primitiva o de la muerte de ésta.

EXPRESIÓN DE MARCADORES NEURALES

Como se ha documentado con anterioridad, en los diversos trabajos sobre plasticidad, la adquisición o expresión de moléculas asociadas al tipo celular que se desea obtener posterior a la inducción, o linaje meta, es una de las evidencias más fuertes que sugieren que existen métodos que permiten la variación en la diferenciación terminal hacia diferentes linajes celulares.

En este trabajo la evaluación de la expresión de marcadores de linajes neurales en los diferentes cultivos al inicio y al final del experimento fue de gran importancia para determinar si el tratamiento inicial con neurotrofinas ejerció un efecto en la diferenciación de las poblaciones celulares iniciales. Utilizamos algunos de los marcadores más utilizados en la literatura para identificar CPN o células neurales diferenciadas: Nestina, A2B5, GFAP y MAP2 ^{34,47}.

Al evaluar la expresión de marcadores neurales y de los receptores a neurotrofinas en el transcurso del cultivo se observó que todos fueron regulados positivamente. Sin embargo se encontraron diferencias significativas dependientes del cultivo únicamente en la expresión de Nestina y de GFAP. En la **Tabla 8** se presenta el porcentaje de células positivas para los marcadores neurales y para receptores al día 7 y al día 25 de cultivo. Tanto la expresión de A2B5 como de MAP2 se mantuvieron constantes entre cultivos y a lo largo de los días *in vitro*.

Nestina es una proteína de filamentos intermedios que se utiliza comúnmente como marcador de progenitores neurales³⁶. En la evaluación de la expresión de nestina, el porcentaje de células positivas al día 7 *in vitro* fue similar a la expresión de la población inicial (Lin- 11.88 ± 3.7), a pesar de que hay una ligera disminución (en el porcentaje de células nestina positivas en los cultivos no expuestos a neurotrofinas. Sin embargo, al evaluar los cultivos y las diferentes fracciones al día 25 *in vitro* encontramos que el cultivo H2 exhibe una diferencia significativa en el porcentaje de células positivas a nestina. El cultivo H2 muestra un aumento progresivo en porcentaje de expresión de nestina, aumentando 2.8 veces al día 7, lo cual al día 25 se refleja en una diferencia significativa (p=0.03) en la fracción adherente del cultivo expuesto al medio Neurocult respecto a la fracción no adherente. Sin embargo el resto de los cultivos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

La proteína ácida glial fibrilar (GFAP por sus siglas en inglés) es una proteína de filamento intermedio usualmente utilizada para identificar células gliales astrocíticas así como poblaciones neuronales distintivas, aunque su expresión puede ser más extensa¹¹⁷. En nuestro trabajo, al analizar los porcentajes de células en la población enriquecida en CTPH mostró que la proporción de células positivas en la fracción de CMN era casi indetectable y sólo en la población enriquecida se llegó a detectar un muy bajo porcentaje de células positivas (\approx 2%). Estos porcentajes no aumentaron significativamente posterior a los primeros 7 días *in vitro*. Sin embargo, al día 25, al comparar la expresión de GFAP en las células de los diferentes cultivos expuestos a los distintos medios neurales y entre las fracciones celulares adherente y no adherente se observó que la fracción adherente de los cultivos H2 expuestas tanto al medio N2 como en NC tuvieron una expresión significativamente mayor a la expresada al resto de los días en cultivo y en comparación con la fracción no adherente del mismo cultivo. El porcentaje de células GFAP positivas del cultivo H2 al día 7 *in vitro* aumentó únicamente 2.2 veces respecto a la población inicial, sin embargo la expresión del marcador en las fracciones adherentes en los cultivos en los medios Neurocult y N2 aumentó 16.21 veces y 19.63 veces, respectivamente, del porcentaje original.

Tabla 8 Porcentaje de células positivas para marcadores de linaje neurales: Nestina, GFAP, MAP2 y A2B5 y para receptores TrkA, TrkB y SCFR al día 7 y 25 de cultivo en la fracción adherente y no adherente. Se evaluaron 3 muestras no relacionadas en cada caso. Se reporta % de células positivas \pm error estándar.

		Nestina	GFAP	MAP2	A2B5	TrkA	TrkB	SCFR
D7	SEM	8.5 \pm 8	2.6 \pm 1.21	23.5 \pm 16.32	23.98 \pm 12.85	5.7 \pm 2	28.53 \pm 16.7	62.26 \pm 10.28
	MX	6.6 \pm 3.3	19.9 \pm 18.3	14.87 \pm 8.85	47.62 \pm 24.32	26.19 \pm 9.23	79.9 \pm 16.93	52 \pm 18.2
	H1	20.14 \pm 14.9	11.49 \pm 2.72	32 \pm 26.6	36.84 \pm 18.47	55.3 \pm 5.13	13.31 \pm 5.53	78.8 \pm 8.59
	H2	33.8 \pm 16.2	5.37 \pm 2.31	31.5 \pm 22.5	35.8 \pm 22.6	10.67 \pm 4.34	48.25 \pm 25.8	65.95 \pm 16.12
	EF	7.53 \pm 2.19	6.39 \pm 2	31.96 \pm 25.96	15.36 \pm 7.79	7.29 \pm 2.99	68.17 \pm 21.4	58.96 \pm 18.82
D25 NC								
NC	SEM	8.18 \pm 3.3	5.2 \pm 3.1	38.93 \pm 21.9	37.28 \pm 24.88	26.19% \pm 14.76	56.9 \pm 21.4	32.16 \pm 27.7
NO ADH	MX	17.98 \pm 13.9	2.03 \pm 1.41	28.9 \pm 23.17	54.69 \pm 21.64	60.9% \pm 28.9	63.66 \pm 20.5	5 \pm 4.44
	H1	16.08 \pm 6.5	11.28 \pm 7.4	36.28 \pm 24.21	49.19 \pm 16.47	31.39 \pm 20.26	69.8 \pm 28.78	10 \pm 5.61
	H2	9.08 \pm 2.16	2.12 \pm 0.42	41.94 \pm 18.64	58.3 \pm 19.34	33.46 \pm 14.11	63.66 \pm 20.5	19.62 \pm 19
	EF	12.4 \pm 5.0	10.2 \pm 1.06	18.52 \pm 7.35	56.41 \pm 15.74	59.4 \pm 11.68	73.3 \pm 11.54	13.12 \pm 6.5
	ADH	SEM	48.8 \pm 17.98	18.74 \pm 9.5	37.04 \pm 17.2	23.13 \pm 16.9	65.16 \pm 13.04	58.47 \pm 29.3
	MX	10.4 \pm 6.17	26.56 \pm 14.09	50.9 \pm 21.8	28.9 \pm 22.9	27 \pm 22.38	96.02 \pm 2.38	37.7 \pm 9.99
	H1	32.48 \pm 15.62	12.44 \pm 11.56	33.44 \pm 17	36 \pm 31	26.27 \pm 11.41	54.48 \pm 25.7	35.7 \pm 16.51
	H2	90.15 \pm 5.15 *	39.58 \pm 4.7**	61.37 \pm 27	62.27 \pm 30.93	19.91 \pm 11.92	81.06 \pm 9.49	63.32 \pm 7.01

	EF	9.68 ± 2.36	43.23 ± 23.1	55.7 ± 19.53	21.15 ± 14.5	46 ± 23.2	85.11 ± 4.36	3.09 ± 2.51
D25 N2								
NO ADH	SEM	8.87 ± 4.91	29.24 ± 11.21	15.43 ± 13.54	25.7 ± 15.4	40.17 ± 18.99	31.14 ± 15.89	30.68 ± 16.07
	MX	5.67 ± 3.4	15.02 ± 8.75	35.7 ± 25.7	6.53 ± 4.44	36.35 ± 22.18	63.66 ± 20.56	21.16 ± 15.75
	H1	2.26 ± 1.7	11.09 ± 9.47	20.34 ± 7.15	78.07 ± 8.6	34.08 ± 9.49	71.36 ± 23.4	83.3 ± 9.9
	H2	16.83 ± 5.8	8.58 ± 3.69	29.43 ± 8.65	35.14 ± 23.13	41.65 ± 18.32	30.95 ± 25.8	22.36 ± 13.6
	EF	38.22 ± 25.45	15.17 ± 12.46	23.57 ± 5.67	31.69 ± 18.46	9.81 ± 3.33	73.32 ± 11.54	38.93 ± 14
ADH	SEM	37.78 ± 22.12	0.43 ± 0.17	61.52 ± 29.22	34.13 ± 28.5	55.99 ± 27.95	65.36 ± 31.75	17.81 ± 11.9
	MX	8.46 ± 3.86	20.86 ± 17.07	12.57 ± 11.7	22.89 ± 22.26	23.3 ± 18.7	25.16 ± 25	56.74 ± 24.94
	H1	3.11 ± 1.29	1.42 ± 1.27	23.19 ± 12.63	27.55 ± 24.9	37.3 ± 22.28	65.79 ± 24.41	48.36 ± 20.35
	H2	57.05 ± 23.1	43.39 ± 11.92 **	37.85 ± 23.99	15.7 ± 10.78	41.78 ± 33.8	84.4 ± 1.13	56.4 ± 20
	EF	10.23 ± 6.04	8.66 ± 5.05	44.76 ± 11.6	4.5 ± 2.4	60.34 ± 27.69	84.55 ± 1.04	77.8 ± 11.58

* Diferencia significativa respecto a los demás días en cultivo, respecto a la fracción adherente de la población expuesta a N2 y respecto a las fracciones no adherentes de ambas poblaciones expuestas a los distintos medios neurales.

**Diferencia significativa respecto a los demás días en cultivo y respecto a la fracción no adherente de ambas poblaciones expuestas a los distintos medios neurales.

GFAP y Nestina son 2 de los marcadores neurales más comúnmente utilizados para la identificación de las poblaciones maduras e inmaduras, respectivamente³⁵. En ambos casos se observaron aumentos en la expresión de estos marcadores en el cultivo terminal, de manera diferencial en los cultivos expuestos de manera temprana a factores neurotróficos como a los mitógenos EGF y FGF2. Es importante notar que estos cultivos no muestran diferencias significativas, ni en capacidad proliferativa, ni en expresión de UFC en comparación con los otros cultivos.

Se ha documentado que tanto la expresión de GFAP como la de nestina son reguladas positivamente por la señalización de FGF2. La expresión de nestina se ha documentado que es facilitada a través de la activación de la vía MAPK y ERK por la señalización de FGF2¹¹⁸. GFAP es regulada positivamente, de manera canónica, por 2 vías. La primera a través de la activación de la vía JAK/STAT por señalización de IL6, al favorecer la expresión de RAR α ¹¹⁸ indirectamente, o a través de la señalización de FGF2⁹⁷. En nuestro modelo la expresión tanto de nestina como de GFAP aumentaron en el cultivo H2, porcentajes que tuvieron una diferencia significativa en las fracciones adherentes de los cultivos expuestos al medio NC. Este comportamiento pudiera sugerir que la exposición a estas moléculas potencialmente sensibiliza a las poblaciones tempranas un estímulo posterior. Esta tendencia podría apoyar la evidencia de una regulación positiva de la expresión de nestina y de GFAP a través de la señalización con FGF2. Es importante notar que, en contraste con nuestras observaciones, se ha descrito que en tejidos no neurales la expresión de nestina está asociada a células proliferantes¹²⁷. En este estudio la mayor proporción de células nestina positivas se encontró, en todos los cultivos, primordialmente al final del cultivo en las poblaciones adherentes, no al día 7 el cuál en términos proliferativos fue el inicio de la escalada en el número celular.

A diferencia de lo observado en el análisis de la expresión de nestina y de GFAP, la expresión de MAP2, A2B5 y de los tres receptores no mostraron variaciones significativas a lo largo del cultivo. MAP2 es una proteína que se utiliza tradicionalmente para identificar a poblaciones neuronales maduras por lo cual es importante valorar que existe inicialmente una población, si bien no muy grande, existente dentro de la población celular inicial. Es importante considerar que esta proteína aumentó su expresión del día inicial al día 7 *in vitro* y mantuvo dicha expresión hasta el término del cultivo de manera equivalente en todos los cultivos. Lo mismo pudo observarse en el caso de A2B5, no obstante esto último fue un resultado inesperado.

A2B5 es un anticuerpo desarrollado para identificar epítopes de cerebrogangliósido presentes en el grupo de células neurales más primitivas (precursores gliales bipotentes), el cual se considera restringido a poblaciones de progenitores muy definidas y que dicha marca se pierde conforme se da el compromiso a linaje y se inicia el tránsito hacia la diferenciación terminal ¹¹⁹. Se ha documentado previamente la expresión de A2B5 en células derivadas de SCU a linajes neurales, y los porcentajes reportados para CMN después de cultivo (8.68% adherentes, 32.43% no adherentes)⁸⁹ son cercanos a los obtenidos en el presente trabajo sin embargo la presencia de ésta marca es inusual y la presencia de dicho marcador no ha sido discutida a fondo. Los gangliósidos son glicolípidos ricos en carbohidratos, y la presencia de glicolípidos en las membranas celulares es de gran importancia dado que se ha identificado su participación en la modulación de cascadas de señalización asociadas a eventos de activación y diferenciación. Los gangliósidos se dividen en 3 grupos dependiendo del número de moléculas de ácido siálico asociadas a la cadena principal¹²⁰. La serie *a* y la serie *b* de gangliósidos (mono y disialogangliósidos) se expresan en algunas poblaciones monocíticas¹²¹ sin embargo la serie *c* de gangliósidos (tri y tetrasialogangliósidos) se restringe a los linajes neurales ^{120, 122}, y A2B5 identifica a tetrasialogangliósidos de manera específica ¹²³. A pesar de la especificidad asociada a los linajes neurales, se ha reportado que células progenitoras de MO de rata expresan tetrasialogangliósidos, los cuales decaen en expresión en poblaciones más maduras (timocitos y linfocitos maduros). Esta marca también ha sido identificada en la fracción adherente de SCU a partir de 5 días de cultivo en DMEM-F12 y suero⁹⁰. En ensayos de adición exógena de gangliósidos (serie *a* y *b*) a cultivos de células monocíticas, se observó que la transición a células dendríticas se estanca y se observa un cambio en la morfología de las células en cultivo, favoreciendo adherencia y elongación celulares ¹²¹; cambio morfológicos similares a los observados en nuestros cultivos. A pesar de ser modelos distintos y poblaciones celulares distintas la expresión de morfologías no hematopoyéticas en función de estímulos exógenos podría sugerir una capacidad de plasticidad morfológica en respuesta a los componentes solubles en el medio y la expresión de gangliósidos de la serie *c* como una respuesta fisiológica al cambio. En la diferenciación de PN a neuronas diferenciadas hay cambios metabólicos que modulan la expresión de gangliósidos¹²⁴ sin embargo este comportamiento y los motivos de éstas variaciones en la expresión de éste tipo de lípidos no se ha elucidado en células no neurales. Es por este motivo que la expresión de éste marcador en las poblaciones hematopoyéticas iniciales y su regulación a través del tiempo en cultivo podría ser un punto interesante a estudiar posteriormente.

Se ha documentado con anterioridad, en poblaciones hematopoyéticas de MO⁶⁸, así como en SCU⁹⁰, la expresión de marcadores neurales en concentraciones bajas después de un par o un sólo día de

cultivo en presencia de un medio inductor. Chen reporta en CMN de SCU criopreservada que hay una división en el cultivo de una fracción adherente y una fracción no adherente después de un día de cultivo en presencia de 10% de SFB, EGF, FGF2, SCF y LIF. El medio adicionado con los factores tróficos mencionados permitió la expresión de los marcadores A2B5 (8.68%), MAP2 (2.4%), GFAP (59.35%), TrkB (23.81%) y CD45 (90.85%) en la fracción adherente, al igual que en la fracción no adherente (A2B5 32.43%, MAP2 0%, GFAP 34.38% y TrkB 36.79%) después de un sólo día en cultivo. Dado que la población utilizada por Chen es mucho más heterogénea que la nuestra no podemos hacer una comparación directa de sus resultados con los nuestros; sin embargo, sirven como apoyo a nuestros resultados en la expresión de marcadores neurales y de receptores a neurotrofinas tempranas en el cultivo. En los trabajos de este grupo, la exposición de células hematopoyéticas a inductores como EGF, FGF2 y LIF y a moléculas de adhesión favorecen la adquisición de características novedosas, en particulares de linaje neural. A partir de estas observaciones y de nuestros resultados se puede proponer que la expresión de características neurales no está restringida a linajes celulares plásticos como las células mesenquimales¹²⁵ sino que puede inducirse en otros grupos de CT, tradicionalmente considerados como más restringidos.

Es importante notar que, no obstante la expresión diferencial de Nestina en las células adherentes de los cultivos H2, su aparición no es indicativo de una adopción de linajes neuronales ya que este marcador se ha encontrado en diversos tejidos entre ellos el endotelio y músculo liso^{126,127}. Es necesaria la evaluación y expresión complementaria de otros marcadores para sugerir que una transformación o adquisición del linaje neural se está llevando a cabo efectivamente.

MORFOLOGÍA

Al inicio del cultivo todas las células sembradas tenían la misma morfología. Las células eran pequeñas, redondas, lisas y en algunos pocos casos con una pequeña proyección citoplásmica corta y gruesa (uropodio), descripción que es consistente con la literatura^{4,128}. Se ha descrito en el caso de las CTN, obtenidas de tejido embrionario que éstas son células pequeñas, principalmente redondas pero que pueden presentar pequeñas proyecciones¹²⁹ o, dependiendo del nicho al que pertenezcan, elongadas (las cuales pueden ser bipolares o monopolares)¹³⁰. En las poblaciones utilizadas dichas morfologías no fueron observadas al inicio del cultivo ni posterior a la primera o segunda fase.

Durante los primeros 7 días en cultivo las células mantienen una morfología homogénea, células con apariencia uniforme, no adherentes, redondas; sin embargo, en algunos casos fue posible observar cúmulos celulares en suspensión. Se ha asociado en otros trabajos que la formación de clusters o agrupaciones celulares en protocolos de plasticidad son semejantes a la formación de neuroesferas las cuales contienen PN^{3,4}. Sin embargo, por observaciones preliminares, al disociar y sembrar células individuales, ninguna pudo formar cúmulos celulares secundarios.

Se ha documentado con anterioridad que la exposición a moléculas de adhesión⁶⁸ ejerce una presión adicional en la determinación y diferenciación final. Con esto en mente, el uso de placas pre tratadas con CC2, un análogo de la poli-L-lisina, buscaba no sólo la adherencia de las células sino la inducción a la adopción de morfologías adherentes. Conforme transcurrieron los días en cultivo, las células se adhieren al fondo de la placa. Al día 14 *in vitro* se observan de manera aleatoria y en número bajos células adheridas, las cuales en su mayoría tienen morfología plana y con extensión radial del citoplasma, similares a macrófagos. Al día 25 *in vitro* se evaluó la morfología de las células en cultivo. Se utilizaron clasificaciones morfológicas usadas en ensayos de diferenciación neural a partir de células hematopoyéticas y mesenquimales^{78,100}. Se observaron 3 grupos generales de morfologías: 1) redondas, 2) dendríticas/monocíticas y 3) extendidas. Las células al inicio del cultivo y por los primeros días eran en su mayoría redondas o semi ovoides, podían formar cúmulos y se encontraban en suspensión o suavemente asentadas al fondo. El segundo grupo comprende a células ovoides o a células de citoplasma muy extendido, típica extensión del citoplasma en morfología monocítica o de macrófago. Al día 25 *in vitro* se pueden observar un tercer grupo de morfologías en la cual se incluyen células fibroblastoides, mono polares, bipolares o ramificadas cuya extensión es visiblemente mayor que aquellas células “dendríticas” de proyecciones cortas. A pesar de observar un incremento en las fracciones adherentes de proyecciones largas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de las distintas poblaciones morfológicas al día 25 *in vitro* por haber desviaciones muy grandes en el número de células y las morfologías que presentan. Lo que es importante resaltar es el hecho de que en todos los esquemas de cultivo, se pudieron observar agrupaciones celulares con prolongaciones extensas o de gran ramificación, de modo que el estímulo en las placas tratadas, en combinación con los medios neurales, promueven la adherencia y la adquisición de morfologías hematopoyéticas y no hematopoyéticas por igual (Ver **Figura 10**).

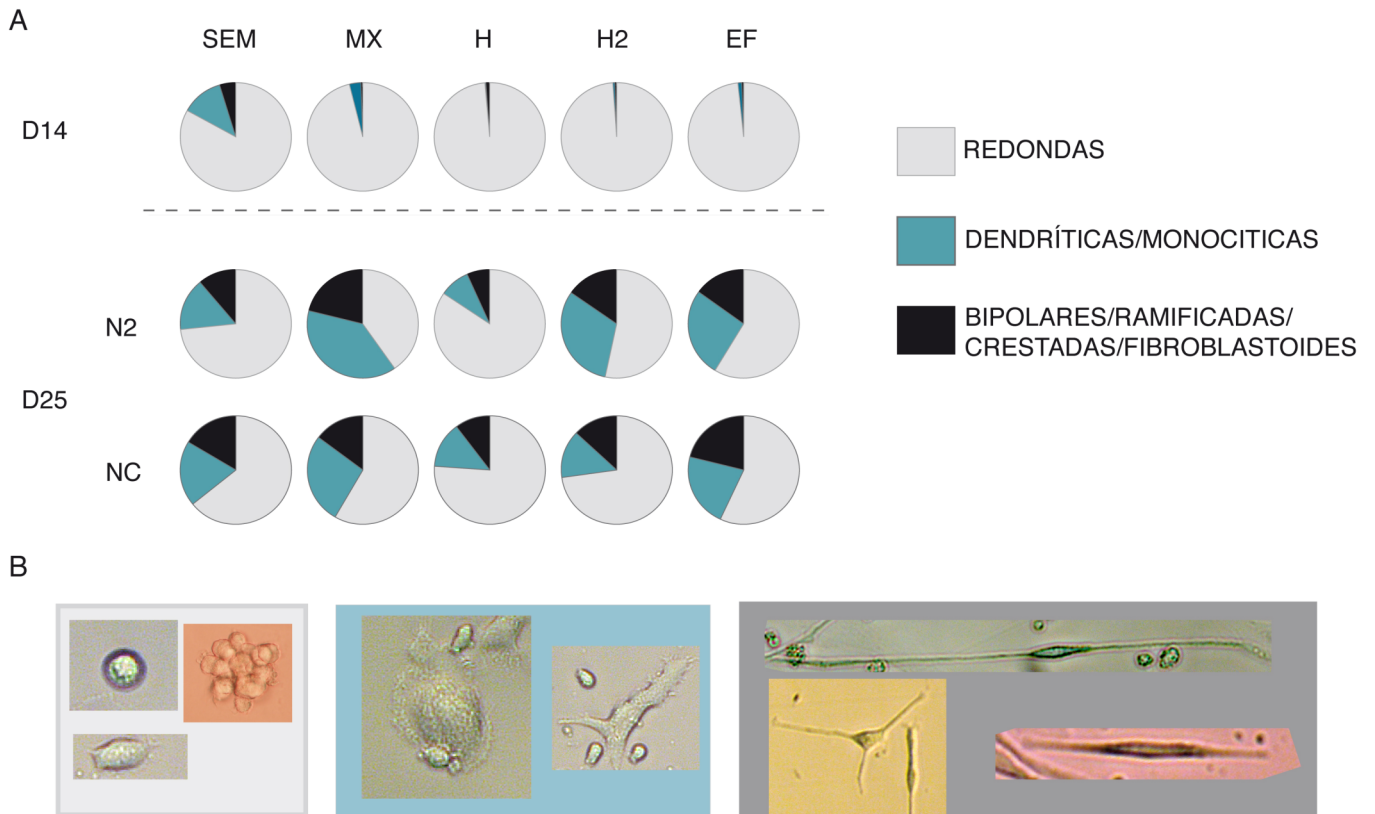


Fig 10. Porcentaje de células en cada grupo de morfologías a los días 14 y 25 *in vitro* posterior al cultivo en medios de cultivo neural.

A) Se grafica el porcentaje de células en cada grupo morfológico observado en cultivo. En el grupo superior a la línea punteada se muestran las proporciones de morfologías exhibidas en cada uno de los cultivos al día 14 *in vitro*. En los dos grupos ubicados debajo de la línea punteada se grafican los cultivos en exposición a N2 (línea superior) y a Neurocult (línea inferior)

B) Se muestran fotografías de las morfologías observada de acuerdo al grupo de evaluación utilizado. Se utiliza como fondo el mismo color utilizado como guía en el grupo A. Gris-células redondas, Verde-células dendríticas/monocíticas, Negro- células extendidas bipolares, con ramificaciones o crestadas.

EXPRESIÓN DE CD45

Como se ha mencionado con anterioridad, la proteína tirosin-cinasa CD45 ha sido utilizado de manera extensiva como marcador hematopoyético. Existe controversia sobre el origen de la población capaz de adquirir características no hematopoyéticas¹³¹.

Dado que la población inicial es una población casi exclusivamente CD45+ (97.1%) quisimos evaluar si la expresión de éste marcador se mantenía posterior a la exposición al medio neural y si variaba con la adquisición de adherencia y modificación de la morfología.

Al evaluar la expresión de CD45 en las fracciones adherentes y no adherentes se observó que las fracciones adherentes de los expuestos a cualquiera de los dos medios neurales eran CD45+ casi al 100%, sin embargo, fue más variable en la fracción no adherente. Esta variabilidad probablemente se debe al bajo número celular y a la baja viabilidad de estas poblaciones. En la **tabla 9** se muestra el resumen de los porcentajes relativos de células CD45+ en los cultivos a lo largo del cultivo.

Tabla 9 . Porcentajes relativos de expresión de CD45 en las poblaciones celulares al día 25 de cultivo. Se reportan 3 experimentos independientes.							
		No Adherente			Adherente		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3
NC	SEM	47.1	ND	ND	95.7	97.7	ND
	MX	85.9	5.09	89.9	87.4	92.3	91.3
	H1	67.7	83.7	ND	96.9	97	83.9
	H2	99.3	93.5	ND	96.9	97.5	79
	EF	98.7	86.2	ND	97.3	97.8	60.1
N2	SEM	ND	ND	ND	92.3	96.9	66.8
	MX	61.8	82.5	93.5	94.9	93.2	94.2
	H1	63	ND	ND	98.5	96.7	92.9
	H2	97.3	79.8	ND	96.8	97.6	77
	EF	83	92.2	ND	98.5	97.8	83.9
ND- No determinado. El bajo número de células vivas no permitió realizar análisis.							

El mantenimiento de la expresión de CD45 en células que adicionalmente son positivas para marcadores neurales ha sido reportado con anterioridad en ensayos con CMN de SCU expuestas tanto a un medio de diferenciación¹¹⁴ como aquellas cuyo único estímulo fue la molécula de adhesión poli-l-lisina para favorecer la adherencia⁹⁰. Sin embargo, se ha observado que células de SCU pre tratadas y transplantadas en rebanadas de cerebro pierden la expresión de ésta molécula^{89,131}

Se ha argumentado que las células capaces de injertar y sobrevivir en tejido en realidad son células no de linaje hematopoyético. No obstante, Pelosi y colaboradores en 2012¹³³ describieron un fenómeno contrastante. En un modelo de recapitulación de endotelio hemogénico por inducción de células CD34+ de SCU en un medio condicionado de hepatocitos de ratón (MH-CM), todas las

células observadas que se encontraban adheridas a las cajas de cultivo eran CD45-. Sin embargo, estas mismas células al ser reintroducidas en un medio suplementado con citocinas hematopoyéticas recuperaban la expresión superficial de CD45 y perdían la morfología fibroblastoide. Esta evidencia abona a la teoría de que la expresión de CD45 es regulada de manera estrecha por el medio y que su presencia o ausencia no es indicativo de una pérdida o ganancia absoluta de funcionalidad, más bien es indicativo de que su expresión es contexto-dependiente. Esta evidencia podría sugerir que la ausencia de células CD45+ en trasplantes no necesariamente es evidencia directa de la muerte o pérdida de las células transplantadas, sino una inhibición del marcador inducida por el medio.

DISCUSIÓN GENERAL

Se ha reportado que en la SCU existen poblaciones celulares capaces de adquirir características de tejidos no sanguíneos. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han sugerido que una de las principales poblaciones capaces de llevar a cabo esta diferenciación es la población de CTPH. En diversos protocolos la exposición de células de SCU a medios diseñados para cultivar y diferenciar PN y células embrionarias es estímulo suficiente para obtener células con características neurales. A pesar de ser exitosos, estos protocolos no hacen una distinción en las poblaciones celulares utilizadas, el momento en el cultivo que es importante realizar la inducción, ni en los factores en el medio que inducen dichos cambios, lo cual se trató de acotar en el presente trabajo.

Dadas las características del tejido, de los protocolos de obtención y de las propiedades de la circulación fetal, se han reportado múltiples poblaciones celulares no hematopoyéticas contenidas en las muestras de SCU¹². Se han encontrado células capaces de diferenciarse a múltiples linajes^{80,152,153, 154}, entre ellas, poblaciones minoritarias de origen mesenquimal y endotelial^{12,151}. No obstante, la posibilidad de que la contaminación con éstas poblaciones sea responsable de los resultados obtenidos es baja. Se ha reportado que la frecuencia de células estromales mesenquimales en la fracción de CMN de SCU es de $0.4 \times 10^{-8} \%$ ⁷⁸ mientras que la frecuencia reportada de progenitores endoteliales es cercana al 0.01%²⁷. Se ha documentado que también pueden obtenerse PN de la SCU, los cuales son negativos para CD34 y CD45³⁶, no obstante la aparición de éstas poblaciones es tan baja que no hay una estimación de la frecuencia de aparición de éstas poblaciones en la SCU. Dichas poblaciones celulares disminuyen aún más cuando se considera que posterior al enriquecimiento inmunomagnético el 97% de las células son CD45+ y tanto las células endoteliales (tanto progenitores tempranos como tardíos y células maduras) como las células estromales mesenquimales y progenitores neurales son CD45-^{78,135}. La eliminación o disminución de estas poblaciones no hematopoyéticas asegura o refuerza que las células que adquieren morfologías no convencionales y que expresan marcadores neurales es fundamentalmente hematopoyética.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar si la adición temprana de factores neurotróficos a un panel de citocinas tempranas sensibilizan a las CTPH a potenciar la respuesta a una inducción con medios de determinación neural en un esquema de cultivo en 3 fases. Este esquema de cultivo no es comparable con los protocolos revisados dado que la inducción de las células de SCU reportadas se

centran en el uso de medios de diferenciación neural determinados ^{68,136} o la adición de suplementos adicionados con neurotrofinas ^{89,90} en un esquema de cultivo de una fase o máximo de dos. La elección de este esquema de cultivo surgió de la observación que células primitivas cultivadas desde su obtención en un medio diseñado para los linajes neurales no sobreviven. Esto sugiere que las poblaciones primitivas son muy sensibles al contenido trófico del medio.

En el caso de las CTPH la presencia de un medio rico en citocinas hematopoyéticas es crucial para la supervivencia y proliferación celular ⁴¹, por lo que quisimos evaluar la modificación del ambiente a partir de la adición de moléculas inductoras de linajes neurales. Consideramos que el efecto de las neurotrofinas de manera temprana en el cultivo podría modular la diferenciación terminal, sin embargo, se observó que su efecto en la adquisición de marcadores neurales está asociado a un segundo estímulo con un medio de cultivo para células neurales.

Tongue y colaboradores propusieron que la heterogeneidad en la respuesta a un mismo estímulo en una línea celular de ESC se debía a que cada célula tiene un cierto “ruido” transcripcional de fondo que puede llegar a enmascarar el “priming” endógeno de una población particular y que el estado de “reacción” al de “no reacción” es continuamente modulado por las señales ambientales ¹⁴⁸. Esta afirmación podría extrapolarse en nuestro modelo, de manera muy libre, a un “priming” temprano por exposición a neurotrofinas u otros factores tróficos, los cuales como estímulo no son suficientemente fuertes para evidenciar cambios en la actividad celular de manera inmediata. Pero pueden aumentar o modificar el “ruido” transcripcional endógeno y así favorecer una respuesta ante un estímulo de mayor magnitud; como se observó en el aumento de la expresión de nestina en la fracción adherente del cultivo expuesto a Neurocult y en la expresión de GFAP en las fracciones adherentes de los cultivos expuestos a Neurocult y a N2. Ésta idea tiene que profundizarse más adelante.

Se ha argumentado, a partir de estudios en CMN de SCU expuestas a un medio suplementado únicamente con SCF, Flt-3 y FGF2, que la recapitulación de un estado más primitivo es mediado por la expresión no específica de CD45 para los linajes hematopoyéticos ⁸⁰. Como lo observado en ensayos de diferenciación de células mesenquimales a neurales, en los que la eficiencia en la obtención de poblaciones celulares adherentes, con morfologías extendidas y positivas para marcadores neurales depende de la exposición a diferentes medios de manera secuencial. Y que estas variaciones en el medio promueven la pérdida de las propiedades intrínsecas a las células mesenquimales para dar paso a las neurales ¹⁴⁹. Esto último, sin embargo, no sucede en el linaje hematopoyético.

En nuestros cultivos, las células resultantes adquieren morfologías distintivas las cuales no sólo concuerdan con las morfologías observadas en CMN de SCU⁹⁰ derivadas a linajes neurales sino con las morfologías exhibidas por células estromales mesenquimales en los ensayos de plasticidad⁷⁸ y las morfologías exhibidas por líneas celulares de glioblastoma y de neuroblastoma diferenciado. También se observa el aumento en la expresión de nestina, MAP2, A2B5 y GFAP, lo que concuerda con el aumento en la expresión reportada en CMN cultivadas en medio con SFB con poli-L-lisina como único inductor⁹⁰. Dichos marcadores neurales, adicionalmente, varían su expresión en función de la presencia o ausencia de neurotrofinas y factores tróficos en las primeras etapas del cultivo. Sin embargo, de manera contrastante a lo planteado en el párrafo anterior, el marcador hematopoyético CD45 no se pierde y la exposición a neurotrofinas no modifica de manera significativa el contenido de UFC del cultivo, lo que nos mostró que la expresión de características neurales no necesariamente se acompaña de la pérdida de la identidad hematopoyética.

A partir de la evaluación inicial de cambios morfológicos y de la expresión de marcadores neurales es que se ha hecho la primera suposición de que la adquisición de linajes no convencionales son posibles y se ha sugerido que en ciertos casos podrían probar ser funcionales¹³⁷. Es importante recalcar que la adquisición de características *in vitro* no es un indicativo directo de una transformación verdadera, sin embargo es una primera aproximación a la descripción de un evento de plasticidad previamente descartado.

Como se ha discutido con anterioridad, los factores solubles son de crucial importancia para inducir la adquisición de características y determinación de los linajes celulares^{20,138,139}. Éstos no sólo permiten la transición a poblaciones diferenciadas, también pueden inducir la recapitulación de un estado más primitivo¹⁴⁰. En los protocolos de plasticidad se han utilizado neurotrofinas^{141,142} en los medios de diferenciación para obtener poblaciones celulares resultantes con modificaciones morfológicas, expresión de marcadores neurales¹⁴³ y de miRNAs asociados a la diferenciación neuronal⁹⁵ y con capacidad de inserción en tejido vivo¹⁴⁴. Sin embargo, se ha documentado también que las neurotrofinas tienen un rol en la modulación normal de funciones hematopoyéticas¹⁴⁵.

Resulta un tanto paradójico que las mismas moléculas utilizadas para inducir una diferenciación no convencional, de manera pleiotrópica ejerzan una influencia sobre la conducta normal de las células hematopoyéticas, sin embargo, se ha sugerido que son patrones genéticos comunes los que permiten generar linajes neurales¹⁴⁶. Existe una hipótesis que plantea que la capacidad de diferenciación bidireccional entre los linajes hematopoyético y neural es resultado de la existencia de un progenitor común⁷⁹.

Es claro que la “inducción” temprana influye en la conducta de células aisladas en cultivo y que de ninguna manera las citocinas o neurotrofinas como estímulos únicos podrán simular los procesos *in vivo*, sin embargo estos ensayos sirven como muestras puntuales de la trascendencia del estímulo en la decisión de diferenciación.

La plasticidad, si es que existe, en realidad es un evento raro el cual potencialmente está reservado para momentos de crisis por lo observado en diversos modelos *in vivo*. Lo que es notorio es que existen todavía en el repertorio celular trazas de potencial perdido con la maduración, el cual puede ser promovido e inducido *in vitro* para la obtención de células con características no convencionales. No obstante, la regulación de dichas características no necesariamente va de la mano con un cambio completo en la identidad celular original. La posibilidad de que éstas células sean funcionales queda como una pregunta por resolver.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que en la SCU existe una población celular CD34+ CD38- Lin-sensible a neurotrofinas las cuales, a pesar de no modificar de manera significativa las propiedades hematopoyéticas de proliferación, expansión y expresión de CD45, sí influyen en la expresión de GFAP posterior a un estímulo tardío en el cultivo con ambos medios neurales y de Nestina en exposición a NC en la última fase de cultivo. Se observó la separación al día 25 de una fracción adherente con un alto porcentaje de células positivas para GFAP y nestina, y de una fracción no adherente de baja viabilidad y con baja expresión de marcadores neurales.

Las CTPH son células sensibles al estímulo con factores solubles. La exposición de una población primitiva a citocinas hematopoyéticas favorece la supervivencia y la proliferación celular. La exposición a citocinas intermedias y tardías favorece el aumento en el número celular de manera significativa en comparación con los cultivos expuestos únicamente a citocinas tempranas y a neurotrofinas. La fase de expansión del cultivo mostró que la exposición del cultivo a SFB es importante para el aumento en las poblaciones celulares totales de todos los cultivos. La tercera fase o fase de determinación mostró ser un periodo durante el cual hay una caída drástica en los números celulares totales en todos los cultivos, resultando en un número final equivalente al inicial.

Las neurotrofinas no tienen un efecto significativo en la proliferación celular, ni de manera individual ni en combinación. Sin embargo, el efecto de la exposición a neurotrofinas y a los factores tróficos EGF y FGF2 en el cultivo H2 repercute en la expresión diferencial de los marcadores neurales en la fracción adherente al día 25.

Las CTPH cultivadas en un medio libre de suero, únicamente en exposición a factores tróficos mantienen una morfología linfocítica principalmente. Posterior a la exposición a SFB y a una placa recubierta con la molécula adhesiva CC2, una proporción celular pequeña comienza a adherirse. Dicha adherencia se dispara después de la exposición a los medios de cultivo neurales, favoreciendo

no sólo la adhesión a la placa, sino la adopción de morfologías tanto convencionales (macrófagos/células dendríticas) como no convencionales (células bipolares/células extendidas/células ramificadas).

Observamos que en la población enriquecida en células CD34+ CD38- Lin- existen células en porcentajes bajos que expresan marcadores neurales, los cuales son regulados positivamente en la condición H2 en exposición tardía a NC en la fracción de células adherentes.

Finalmente, el medio de diferenciación y los componentes de éste son en realidad una de las variables más importantes en los protocolos de diferenciación. Ambos medios neurales favorecieron la adhesión y adquisición de morfologías no convencionales para los linajes hematopoyéticos. Ambos medios favorecieron la expresión de GFAP de manera significativa en la fracción adherente de los cultivos H2, sin embargo, Neurocult mostró ser más eficiente en la inducción de células Nestina positivas en esta misma población.

BIBLIOGRAFÍA

1. Scott F, G. *Biología del Desarrollo*. pp. 889 (Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, 2005).
2. *StemBook [Internet]*. (Harvard Stem Cell Institute: Cambridge (MA),).at
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27063/>>
3. Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., et al. (Eds.). (2009). *Essentials of Stem Cell Biology*. Academic Press: Oxford, RU.
4. Pelayo, R., Santa-Olalla, J., Velasco, I. (Eds.). (2011). *Células Troncales y Medicina Regenerativa*. Universidad Nacional Autónoma de México: Distrito Federal, México.
5. Yahata, T., Mugeruma, Y., Yumino, S. et al. (2008). Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem cell*. **26**, 3228–36
6. Danckhoff, V. (1916). The Differentiation of Cells as a Criterion for Cell Identification, Considered in Relation to the Small Cortical Cells of the Thymus. *The Journal of Experimental Medicine* **24**, 87–105
7. Méndez-Ferrer, S., Michurina, T., Ferraro, F. et al. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829–34
8. Hsieh, J. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. (2012). *Genes & development* **26**, 1010–21
9. Rao, M. S. & Reddy, J. K. (1995). Hepatic transdifferentiation in the pancreas. *Seminars in cell biology* **6**, 151–6
10. Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Pelayo, R., et al. (2007). Hematopoiesis. *Cancerología* **2**, 95–107
11. Guerrouahen, B. S., Al-Hijji, I. & Tabrizi, A. R. (2011). Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. *Stem cells international* 1–8
12. Pranke, P. & Canabarro, R. (2009). *Frontiers of Cord Blood Science*. (pp. 27–90) Springer London: London.
13. Munker, R., Hiller, E., Glass, J. et al. (2007). *Modern Hematology. Biology and Clinical Management*. 499 pp Humana Press: New Jersey.
14. Till, J., McCulloch, E. & Siminovitch, L. A. (1964). Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **51**, 29–36
15. Wognum, A. W., Eaves, A. C. & Thomas, T. E. (2004). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research* **34**, 461–75
16. Kawashima, I., Almeida-Porada, G., Zeng, H. & Ogawa, M. (1996). CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood* **87**, 4136–4142
17. Krause, D., Fackler, M., Civin, C. et al. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* **87**, 1–13

19. Bender, J., Unverzagt, K., Walker, D. *et al.* (1994). Phenotypic Analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clinical immunology and immunopathology* **70**, 10–18
20. Ng, Y., Kessel, B., Lokhorst, H., *et al.* (2004). Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *Journal of leukocyte biology* **75**, 314–323
21. Liu, J., Li, K., Yuen, P., *et al.* (1999). Ex vivo expansion of enriched CD34+ cells from neonatal blood in the presence of thrombopoietin, a comparison with cord blood and bone marrow. *Bone marrow transplantation* **24**, 247–52
23. Smith, A. & Wagner, J. (2009). Alternative Hematopoietic Stem Cell Sources for Transplantation: Place of Umbilical Cord Blood. *British journal of haematology* **147**, 1–18
24. Daikeler, T., Labopin, M., Ruggeri, A., *et al.* (2013). New autoimmune diseases after cord blood transplantation: a retrospective study of EUROCORD and the Autoimmune Disease Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* **121**, 1059–1064
25. Shahrokhi, S., Mena, F., Alimoghaddam, K., *et al.* (2012). Insights and hopes in umbilical cord blood stem cell transplantations. *Journal of biomedicine & biotechnology* 1–11
26. Scaradavou, A., Brunstein, C., Eapen, M., *et al.* (2013). Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia. *Blood* **121**, 752–8
27. Bhattacharya, N., Stubblefield, P. (Eds.) (2009). *Frontiers of Cord Blood Science*. 374 pp. Springer London: London,
28. Kempermann, G. (2006). *Adult Neurogenesis*. Oxford University Press: New York, EE.UU.
29. Alam, S., Sen, A., Behie, L., *et al.* (2004). Cell cycle kinetics of expanding populations of neural stem and progenitor cells in vitro. *Biotechnology and bioengineering* **88**, 332–47
30. Curtis, M., Low, V.F. & Faull, R.L.M. (2012). Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: a comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation. *Developmental neurobiology* **72**, 990–1005
31. Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M. & Tramontin, A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature reviews. Neuroscience* **2**, 287–93
32. Conti, L. & Cattaneo, E. (2010). Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature reviews. Neuroscience* **11**, 176–87
33. Liu, S.-Y. *et al.* SVZa neural stem cells differentiate into distinct lineages in response to BMP4. *Experimental neurology* **190**, 109–21 (2004).
34. Scheffler, B., Walton, N., Lin, D. *et al.* (2005). Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9353–8

35. Emsley, J.G., Mitchell, B.D., Kempermann, G., *et al.* (2005). Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Progress in neurobiology* **75**, 321–41
36. Bottenstein, J. (Ed.) (2003). *Neural Stem Cells: Development and Transplantation*. Kluwer Academic Publishers
37. Ramos-Zúñiga, R., González-Pérez, O., Macías-Ornelas, A., *et al.* (2012). Ethical implications in the use of embryonic and adult neural stem cells. *Stem cells international* **2012**, 1-7
38. Glotzbach, J., Januszyk, M., Vial, I. *et al.* (2011). An Information Theoretic, Microfluidic-Based Single Cell Analysis Permits Identification of Subpopulations among Putatively Homogeneous Stem Cells. *PLoS one* **6**
39. Szilvassy, S. J. (2004). The biology of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research* **34**, 446–60
40. Preston, S., Alison, M., Forbes, S., *et al.* (2003). The new stem cell biology: something for everyone. *Molecular pathology* **56**, 86–96
41. Flores-Guzmán, P., Gutiérrez-Rodríguez, M. & Mayani, H. (2002). In vitro proliferation, expansion, and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of medical research* **33**, 107–14
42. Mayani, H. (2003). A Glance into Somatic Stem Cell Biology Basic Principles, New Concepts, and Clinical Relevance. *Archives of Medical Research* **34**, 3–15
43. Zhang, C. C. & Lodish, H. F. (2008). Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Current opinion in hematology* **15**, 307–11
44. Zhu, J. & Emerson, S. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* **21**, 3295–3313
45. Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**, 485–91
46. Geest, C. R. & Coffey, P. J. (2009). MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology* **86**, 237–50
47. Garzón-Muvdi, T. & Quiñones-Hinojosa, A. (2009). Neural stem cell niches and homing: recruitment and integration into functional tissues. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **51**, 3–23
48. Barbacid, M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *Journal of neurobiology* **25**, 1386–403
49. Kaplan, D. R. & Stephens, R. M. (1994). Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *Journal of neurobiology* **25**, 1404–17
50. Unsicker, K. (1996). Minireview GDNF: a cytokine at the interface of TGF- β s and neurotrophins. *Cell & Tissue Research* **286**, 175–178
51. Yang, M., Li, K., Ng, P. *et al.* (2007). Promoting effects of serotonin on hematopoiesis: ex vivo expansion of cord blood CD34+ stem/progenitor cells, proliferation of bone marrow stromal cells, and antiapoptosis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 1800–6
52. Deverman, B.E. & Patterson, P.H. (2009). Cytokines and CNS development. *Neuron* **64**, 61–78

53. Diederich, K., Schäbitz, W.R. & Minnerup, J. (2012). Seeing old friends from a different angle: novel properties of hematopoietic growth factors in the healthy and diseased brain. *Hippocampus* **22**, 1051–7
54. Wagner, J. (1996). Is IL6 both a cytokine and a neurotrophic factor? *The Journal of experimental medicine* **183**, 2417–2419
55. Coutu, D. L. & Galipeau, J. (2011). Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging* **3**, 920–33
56. Cardozo, A.J., Gómez, D.E. & Argibay, P.F. (2012). Neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: relevance of different signaling molecules, transcription factors, and key marker genes. *Gene* **511**, 427–36
57. Luth, E., Jun, S., Wessen, M. *et al.* (2008). Bone marrow side population cells are enriched for progenitors capable of myogenic differentiation. *Journal of cell science* **121**, 1426–34
58. Eguchi, G. (1995). Introduction: Transdifferentiation. *Seminars in CELL BIOLOGY* **6**, 105–108
59. Jopling, C., Boue, S. & Izpisua Belmonte, J. C. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 79–89
60. Manohar, R. & Lagasse, E. (2009). Transdetermination: a new trend in cellular reprogramming. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **17**, 936–8
61. Lim, J. & Thiery, J.P. (2012). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* **139**, 3471–86
62. Nakamura, K., Maki, N., Trinh, A., *et al.* (2010). miRNAs in newt lens regeneration: specific control of proliferation and evidence for miRNA networking. *PLoS one* **5**, e12058
63. Michalopoulos, G., Barua, L. & Bowen, W. (2005). Transdifferentiation of Rat Hepatocytes Into Biliary Cells After Bile Duct Ligation and Toxic Biliary Injury. *Hepatology* **41**, 535–544
64. Proia, R. L. & Wu, Y.P. (2004). Blood to brain to the rescue. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 1108–1110
65. Nicolaidou, V., Wong, R., Redpath, A. *et al.* (2012). Monocytes induce STAT3 activation in human mesenchymal stem cells to promote osteoblast formation. *PLoS one* **7**, e39871
66. Buzanska, L., Zychowicz, M., Ruiz, A. *et al.* (2010). Neural stem cells from human cord blood on bioengineered surfaces--novel approach to multiparameter bio-tests. *Toxicology* **270**, 35–42
67. Girard, S., Brough, D., Lopez-Castejon, G., *et al.* (2013). Microglia and macrophages differentially modulate cell death after brain injury caused by oxygen-glucose deprivation in organotypic brain slices. *Glia* **813–824**
68. Reali, C., Scintu, F., Pillai, R. *et al.* (2006). Differentiation of human adult CD34+ stem cells into cells with a neural phenotype: role of astrocytes. *Experimental neurology* **197**, 399–406
69. Low, C. B., Liou, Y.-C. & Tang, B. L. (2008). Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy. *Journal of neuroscience research* **86**, 1670–9

70. Aliotta, J., Pereira, M., Johnson, K. *et al.* (2010). Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Experimental hematology* **38**, 233–45
71. Song, Y.-H., Pinkernell, K. & Alt, E. (2011). Stem cell induced cardiac regeneration: Fusion/mitochondrial exchange and/or transdifferentiation? *Cell Cycle* **10**, 2281–2286
72. Acquistapace, A., Bru, T., Lesault, P., *et al.* (2011). Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem cells* **29**, 812–24
73. Nakazawa, F., Nagai, H., Shin, M., *et al.* (2006). Negative regulation of primitive hematopoiesis by the FGF signaling pathway. *Blood* **108**, 3335–43
74. Jay, K. E., Gallacher, L. & Bhatia, M. (2002). Emergence of muscle and neural hematopoiesis in humans. *Blood* **100**, 3193–202
75. Walker, P., Shah, S. K., Harting, M. T. *et al.* (2009). Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation. *Disease models & mechanisms* **2**, 23–38
76. Roybon, L., Ma, Z., Asztely, F., *et al.* (2006). Failure of transdifferentiation of adult hematopoietic stem cells into neurons. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 1594–604
77. Lin, R.Z., Dreyzin, A., Aamodt, K., *et al.* (2010). Functional endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood. *Cell transplantation* **20**, 515–522
78. Montesinos, J.J., Flores-Figueroa, E., Castillo-Medina, S., *et al.* (2009). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy* **11**, 163–76
79. Shih, C.C. (2001). Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood* **98**, 2412–2422
80. Rogers, I., Yamanaka, N., Bielecki, R. *et al.* (2007). Identification and analysis of in vitro cultured CD45-positive cells capable of multi-lineage differentiation. *Experimental cell research* **313**, 1839–52
81. Wojakowski, W., Kucia, M., Liu, R. *et al.* (2011). Circulating very small embryonic-like stem cells in cardiovascular disease. *Journal of cardiovascular translational research* **4**, 138–44
82. Park, D.H., Borlongan, C., Willing, A. *et al.* (2009). Human umbilical cord blood cell grafts for brain ischemia. *Cell transplantation* **18**, 985–98
83. Franceschini, V., Bettini, S., Pifferi, S. *et al.* (2009). Human cord blood CD133+ stem cells transplanted to nod-scid mice provide conditions for regeneration of olfactory neuroepithelium after permanent damage induced by dichlobenil. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**, 825–35
84. De Paepe, M.E., Mao, Q., Ghanta, S., *et al.* (2011). Alveolar epithelial cell therapy with human cord blood-derived hematopoietic progenitor cells. *The American journal of pathology* **178**, 1329–39
85. Arien-Zakay, H., Lecht, S., Nagler, A., *et al.* (2011). Neuroprotection by human umbilical cord blood-derived progenitors in ischemic brain injuries. *Blood* **119**, 233–45

86. Chi, G.F., Kim, M., Kim, D., *et al.* (2010). Schwann cells differentiated from spheroid-forming cells of rat subcutaneous fat tissue myelinate axons in the spinal cord injury. *Experimental neurology* **222**, 304–17
87. Ratajczak, M.Z., Kucia, M., Reza, R., *et al.* (2004). Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells “hide out” in the bone marrow. *Leukemia* **18**, 29–40
88. Krause, D., Theise, N., Collector, M. *et al.* (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369–77
89. Chen, N., Kamath, S., Newcomb, J. *et al.* (2007). Trophic factor induction of human umbilical cord blood cells in vitro and in vivo. *Journal of neural engineering* **4**, 130–45
90. Chen, N., Hudson, J., Walczak, P. *et al.* (2005). Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem cells* **23**, 1560–70
91. Wong, C. J., Casper, R. F. & Rogers, I. M. (2010). Epigenetic changes to human umbilical cord blood cells cultured with three proteins indicate partial reprogramming to a pluripotent state. *Experimental cell research* **316**, 927–39
92. Buzanska, L., Ruiz, A., Zychowicz *et al.* (2009). Patterned growth and differentiation of human cord blood-derived neural stem cells on bio-functionalized surfaces. *Acta neurobiologiae experimentalis* **69**, 24–36
93. Okabe, M., Otsu, M., Ahn, D., *et al.* (2009). Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* **114**, 1764–7
94. Walczak, P., Chen, N., Hudson, J. *et al.* (2004). Do hematopoietic cells exposed to a neurogenic environment mimic properties of endogenous neural precursors? *Journal of Neuroscience Research* **76**, 244–254
95. Hafizi, M., Atashi, A., Bakhshandeh, B., *et al.* (2012). MicroRNAs as Markers for Neurally Committed CD133+/CD34+ Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood. *Biochemical genetics*
96. Tropepe, V., Sibilina, M., Ciruna, B., *et al.* (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Developmental biology* **208**, 166–88
97. Song, M.R. & Ghosh, A. (2004). FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nature neuroscience* **7**, 229–35
98. Schneider, C, Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675
101. Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., *et al.* (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature immunology* **11**, 585–93
102. Basford, C., Forraz, N. & McGuckin, C. (2010). Optimized multiparametric immunophenotyping of umbilical cord blood cells by flow cytometry. *Nature protocols* **5**, 1337–46
103. Stewart, C. & Stewart, S. (1997). Immunophenotyping. *Current protocols in Cytometry* 1–18

104. Pranke, P., Hendriks, J., Debnath, G., *et al.* (2005). Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. *Brazilian journal of medical and biological* **38**, 1775–89
105. Pranke, P., Hendriks, G., Alespeiti, G., *et al.* (2006). Comparative quantification of umbilical cord blood CD34 + and CD34 + bright cells using the ProCount™ -BD and ISHAGE protocols. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **39**, 901–906
106. Flores-Guzmán, P., Flores-Figueroa, E., Martínez-Jaramillo, G., *et al.* (2005). In vitro characterization of two lineage-negative CD34+ cell-enriched hematopoietic cell populations from human UC blood. *Cytotherapy* **7**, 334–44
107. Kerschensteiner, M., Stadelmann, C., Dechant, G., *et al.* (2003). Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Annals of neurology* **53**, 292–304
108. Vargas-Leal, V., Bruno, R., Derfuss, T., *et al.* (2005). Expression and function of glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their receptors on human immune cells. *Journal of immunology* **175**, 2301–8
109. Gattei, V., Celetti, A., Cerrato, A., *et al.* (1997). Expression of the RET receptor tyrosine kinase and GDNFR-alpha in normal and leukemic human hematopoietic cells and stromal cells of the bone marrow microenvironment. *Blood* **89**, 2925–37
110. Bracci-Laudiero, L., Celestino, D., Starace, G., *et al.* (2003). CD34-positive cells in human umbilical cord blood express nerve growth factor and its specific receptor TrkA. *Journal of Neuroimmunology* **136**, 130–139
111. Coppola, V., Barrick, C., Southon, E., *et al.* (2004). Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development* **131**, 5185–95
112. Flores-Guzmán, P., Flores-Figueroa, E., Montesinos, J.J., *et al.* (2009). 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* **11**, 886–96
113. Alvarado-Moreno, A., Chávez-González, A., Cérbulo, A., *et al.* (2010). In vitro cell cycle dynamics of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Hematology* **15**, 11–20
114. Flores-Guzman, P., Fernández-Sanchez, V., Valencia-Plata, I., *et al.* (2013). Comparative in vitro analysis of different hematopoietic cell populations from human cord blood: in search of the best option for clinically oriented ex vivo cell expansion. *Transfusion* **53**, 668-678
115. Escribano, L., Ocqueteaub, M., Almeida, J., *et al.* (1998). Expression of the c-kit (CD117) Molecule in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Leukemia and Lymphoma* **30**, 459-466
116. Bottenstein, J. E. & Sato, G. H. (1980). Fibronectin and polylysine requirement for proliferation of neuroblastoma cells in defined medium. *Experimental cell research* **129**, 361–366
117. Berardi, A.C., Wang, A., Abraham, J. *et al.* (1995). Basic fibroblast growth factor mediates its effects on committed myeloid progenitors by direct action and has no effect on hematopoietic stem cells. *Blood* **86**, 2123–9

118. Herrera, F., Chen, Q. & Schubert, D. (2010). Synergistic effect of retinoic acid and cytokines on the regulation of glial fibrillary acidic protein expression. *The Journal of biological chemistry* **285**, 38915–22
119. Chang, K.W., Huang, Y., Wong, Z., *et al.* (2013). Fibroblast growth factor-2 up-regulates the expression of nestin through the Ras-Raf-ERK-Sp1 signaling axis in C6 glioma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **434**, 854–60
120. Farrer, R. & Quarles, R. (1999). GT3 and its O-acetylated derivative are the principal A2B5-reactive gangliosides in cultured O2A lineage cells and are down-regulated along with O-acetyl GD3 during differentiation. *Journal of Neuroscience Research* **57**, 371–380
121. Svennerholm, L. (1964). The gangliosides. *Journal of lipid research* **5**, 145-155
122. Wöfl, M., Batten, W. Y., Posovszky, C., *et al.* (2002). Gangliosides inhibit the development from monocytes to dendritic cells. *Clinical and experimental immunology* **130**, 441–8
123. Yohe, H., Wallace, P., Berenson, C., *et al.* (2001). The major gangliosides of human peripheral blood monocytes/macrophages: absence of ganglio series structures. *Glycobiology* **11**, 831–41
124. Saito, M., Kitamura, H. & Sugiyama, K. (2001). The specificity of monoclonal antibody A2B5 to c-series gangliosides. *Journal of Neurochemistry* **78**, 64–74
125. Ngamukote, S., Yanagisawa, M., Ariga, T., *et al.* (2007). Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains. *Journal of neurochemistry* **103**, 2327–41
126. Jiang, Y., Jahagirdar, B., Reinhardt, R., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41–49
127. Zulewski, H., Abraham, E., Gerlach, M., *et al.* (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* **1**, 521–533
128. Daniel, C., Albrecht, H., Lüdke, A. *et al.* (2008). Nestin expression in repopulating mesangial cells promotes their proliferation. *Laboratory Investigation* **88**, 387–397
129. Fruehauf, S., Srbic, K., Seggewiss, R., *et al.* (2002). Functional characterization of podia formation in normal and malignant hematopoietic cells. *Journal of leukocyte biology* **71**, 425–432
130. Bottenstein, J. E. (1979). Growth of a Rat Neuroblastoma Cell Line in Serum-Free Supplemented Medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 514–517
131. Kazanis, I., Lathia, J., Moss, L., *et al.* (2008). The neural stem cell microenvironment. *StemBook [Internet]*. (Harvard Stem Cell Institute: Cambridge (MA)).at
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27063/>>
132. Low, C. B., Liou, Y.-C. & Tang, B. L. (2008). Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy. *Journal of neuroscience research* **86**, 1670–9
133. Walczak, P., Chen, N., Eve, D., *et al.* (2007). Long-term cultured human umbilical cord neural-like cells transplanted into the striatum of NOD SCID mice. *Brain research bulletin* **74**, 155–63

134. Pelosi, E., Castelli, G., Matin-Padura, I. *et al.* (2012). Human haemato-endothelial precursors: cord blood CD34+ cells produce haemogenic endothelium. *PloS one* **7**, e51109
135. Mund, J., Estes, M.L., Yoder, M.C., *et al.* (2012). Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 1045–53
136. Ponce-Regalado, M.D., Ortuño-Sahagún, D., Zarate, C. B. *et al.* (2012). Ensheathing cell-conditioned medium directs the differentiation of human umbilical cord blood cells into aldynogial phenotype cells. *Human cell* **25**, 51–60
137. Song, S., Song, S., Zhang, H., Cuevas, J., *et al.* (2007). Comparison of neuron-like cells derived from bone marrow stem cells to those differentiated from adult brain neural stem cells. *Stem cells and development* **16**, 747–56
138. Fallahi-Sichani, M., Soleimani, M., Najafi, S., *et al.* (2007). In vitro differentiation of cord blood unrestricted somatic stem cells expressing dopamine-associated genes into neuron-like cells. *Cell biology international* **31**, 299–303
139. Bauer, S. (2009). Cytokine control of adult neural stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1153**, 48–56
140. Wong, C. J., Casper, R. F. & Rogers, I. M. (2010). Epigenetic changes to human umbilical cord blood cells cultured with three proteins indicate partial reprogramming to a pluripotent state. *Experimental cell research* **316**, 927–39
141. Davies, M. (1994). The role of neurotrophins in the developing nervous system. *Journal of neurobiology* **25**, 1334–48
142. Lim, J., Park, S., Oh, J., *et al.* (2008). Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *Journal of neuroscience research* **86**, 2168–78
143. Sanchez-Ramos, J. R., Song, S., Kamath, S., *et al.* (2001). Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Experimental neurology* **171**, 109–15
144. Mezey, E. (2000). Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. *Science* **290**, 1779–1782
145. Rezaee, F., Rellick, S., Piedimonte, G., *et al.* (2010). Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL6 expression through the MAPK pathway. *PloS one* **5**, e9690
146. Almeida-Porada, G., Crapnell, K., Porada, C., *et al.* (2005). In vivo haematopoietic potential of human neural stem cells. *British journal of haematology* **130**, 276–83