



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCALES
HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS EN CONDICIONES MESENQUIMALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA ANGÉLICA MUÑIZ RIVERA CAMBAS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:

DR. JESÚS CHIMAL MONROY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. MARÍA ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2014



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
BIOMEDICINA

**PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCALES
HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS EN CONDICIONES MESENQUIMALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA ANGÉLICA MUÑOZ RIVERA CAMBAS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:

DR. JESÚS CHIMAL MONROY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. MARÍA ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2014

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 14 de octubre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MUÑIZ RIVERA CAMBAS MARÍA ANGÉLICA** con número de cuenta 304561991, con la tesis titulada **"PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN IN VITRO DE CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS EN CONDICIONES MESENQUIMALES"**, realizada bajo la dirección del **DR. HÉCTOR DE JESÚS MAYANI VIVEROS**:

Presidente: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
Vocal: DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE
Secretario: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Suplente: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
Suplente: DR. JESÚS CHIMAL MONROY

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de noviembre de 2013



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradezco el apoyo brindado para la realización de este proyecto a:

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(CONACYT) Número de becario: 262608

Del mismo modo agradezco al comité tutorial por su apoyo y sus valiosas aportaciones para poder llevar a cabo este trabajo

DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS

DR. JESÚS CHIMAL MONROY

DRA. MARÍA ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL

RECONOCIMIENTOS

Agradezco al apoyo y enseñanzas teóricas y técnicas para la realización de este proyecto a:

Dra. Patricia Piña Sánchez

Dr. Juan José Montesinos Montesinos

Dra. Eugenia Flores Figueroa

Dra. Guadalupe Alarcón

Dra. Lourdes Arriaga Pizano

Biol. Luis Enrique Torres Galeana

Técnico Laboratorista Ignacio Valencia Plata

De manera muy especial agradezco al Dr. Héctor Mayani, mi tutor y maestro, por abrirme las puertas de su laboratorio, enseñarme y encaminarme a ser una investigadora de calidad en un futuro cercano.

Igualmente, agradezco enormemente a la Dra. Patricia Flores Guzmán por toda la guía, apoyo y enseñanza que fueron indispensables para mi desarrollo durante la maestría.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, los que están y los que ya se fueron, por formar conmigo un equipo tan especial y ayudarme en asuntos tanto académicos como personales: Roberto, Ileana, Julieta, Yenny, Eunice, Alejandro, Gabriel y Blanca. Muchas gracias.

Y a todos mis compañeros de la unidad, especialmente a Oswaldo, Lupita, Martina y Martha, por toda su ayuda para la realización de mis experimentos. También a Jannet, Damián, Jessy, Jessica Purizaca, Sócrates, Dafne, Lalo, Nancy, Lucero y en general a todos los que hacen de la unidad un lugar mejor.

A Jesús Argueta, por ser tan buen amigo y por todo tu apoyo en este trabajo.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES: Por darme la vida, por todos sus cuidados, por apoyarme en cada paso para cumplir mi sueño de dedicarme a la ciencia. Por quererme desde el primer día de mi vida y por estar dispuestos a tantas cosas por el amor tan grande que me tienen. Este trabajo es otra demostración de lo que han logrado conmigo. Yo también los amo.

A MIS HERMANOS: Por enseñarme su perspectiva de la vida y ayudarme así a construir la mía, por ayudarme a valorar y reconocer todo lo que he crecido y logrado y por ofrecerme su apoyo.

A MIS SOBRINAS: Stephanie y Michelle, que tantas veces me han alegrado la vida sólo con su existencia. Por permitirme ser parte de su crecimiento, aunque sea sólo unos meses al año. Las amo.

A MI CUÑADA: Karla, como siempre por ser mi ángel guardián a pesar de la distancia, por estar en las buenas y en las malas, por enseñarme tanto de la vida y sobre todo por mostrarme un camino distinto cuando más lo necesité.

A MIS HERMANOS ADOPTIVOS:

CRIS: Por ser exactamente la hermana que nunca tuve y siempre pedí, por estar en tantos momentos buenos y malos que han pasado en estos últimos cuatro años, por escucharme, cuidarme, acompañarme y quererme. Por recordarme que pase lo que pase, te tengo a ti y ya lo sabes, que tú a mí.

GIO: Por ser un espejo enorme del que aprendo mucho sobre mi misma y sobre la vida. Por quererme tal como soy y por confiar en mí, por recordarme quién soy cuando se me olvida y tan solo por llegar a mi vida.

A MIS AMIGOS:

NANÉ: Por seguirme enseñando tanto, por convertirte en un gran ejemplo de vida, por escucharme y entenderme en cosas que la mayoría no comprende, por estar siempre presente y hasta por conflictuarme de vez en cuando.

DINORAH: Por ser esa persona tan dulce que me ha acompañado en tantos momentos felices y de crisis, por seguir teniendo la capacidad de calmarme con tu energía, por tus muy buenos consejos, por aliarte conmigo y por defenderme. Pero sobre todo por haber creído en mí en un momento en que te hubieran podido convencer de algo que no soy.

VANE: Porque aunque nuestras vidas ya no coincidan, siempre me quedaré con los mejores recuerdos de nuestra amistad.

VIANEY: Por seguir siendo una gran maestra aún después de tres años en que académicamente ya no lo eres. He seguido aprendiendo mucho de ti y de lo mucho que te has fortalecido en este tiempo, de verdad y aunque no lo creas, eres un gran ejemplo a seguir.

A mis amigos incansables del coro de Claret: TANIA, ANDREA, PAU, LALO Y NOELIA. Por enseñarme otro significado de lo que es ser familia, por seguir siendo una luz en mi vida. Jamás olvidaré los momentos increíbles que pasamos cada fin de semana, gracias por seguir en mi vida, sé que siempre será así, de una u otra forma.

A mis amigos del coro JAB: SOPHY, ADRI, CONNY, CLAU, XIM, ZAIDA, DENISSE, CHARLY, CARLOS, JAS, TRIBI Y MA. ELENA. Por permitirme ser parte de su familia, por llenar un poco más de bendiciones y calidez mi vida.

A todos mis amigos que han dejado huella en mi vida y que siguen estando presentes en mi vida y a pesar de que los tiempos han cambiado, y no hemos podido coincidir por ritmo de vida, siguen muy presentes en mi corazón: OLIVIA, DANIELA, KAREN, GERARDO, AXEL Y MARCO

Finalmente, pero no menos importante, a Dios, por ayudarme en cada paso que doy y llenar mi vida de tantas bendiciones que me han permitido llegar a donde estoy y disfrutar de mi vida con todo su esplendor. Porque cada día es mejor que el anterior.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
1.1 Marco Teórico.....	5
1.1.1 Hematopoyesis.....	5
1.1.1.1 Células Troncales Hematopoyéticas.....	7
1.1.2 Fuentes de Células troncales hematopoyéticas.....	10
1.1.2.1 Células troncales y progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical.....	11
1.1.3 Estudio <i>in vitro</i> de células troncales hematopoyéticas.....	14
1.1.3.1 Efectos de factores solubles sobre células troncales hematopoyéticas..	15
1.1.4 Plasticidad.....	18
1.1.5 Células Estromales Mesenquimales.....	19
1.1.5.1 Adipocitos.....	21
1.1.5.1.1 Adipogénesis.....	22
1.2 Antecedentes.....	24
1.2.1 Estudio <i>in vitro</i> de la población celular humana CD34 ⁺ CD38 ⁻ Lin ⁻ de sangre de cordón umbilical.....	24
1.2.2 Plasticidad a partir de células de sangre de cordón umbilical.....	26
1.2.2.1 Plasticidad de células hematopoyéticas hacia adipocitos.....	27
2. Planteamiento del problema y justificación.....	30
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivos.....	33
5. Metodología.....	34
5.1 Criterios de exclusión y obtención de la sangre de cordón umbilical.....	34
5.2 Obtención de células mononucleares de la sangre de cordón umbilical.....	35
5.3 Obtención de la población CD34 ⁺ CD38 ⁻ Lin ⁻	36
5.4 Ensayos de colonia de fibroblastos.....	37
5.5 Protocolos de cultivo.....	37
5.6 Ensayos de colonias de progenitores hematopoyéticos.....	39

5.7 Tinción con rojo oleoso.....	40
5.8 PCR en tiempo real.....	41
5.8.1 Extracción del RNA.....	41
5.8.2 Producción de cDNA.....	44
5.8.3 qRT- PCR.....	44
5.9 Separación por el marcador CD163.....	46
5.10 Análisis estadístico.....	47
6. Resultados.....	48
6.1 Unidades formadoras de colonias de fibroblastos.....	48
6.2 Obtención de la población CD34 ⁺ CD38 ⁻ Lin ⁻	50
6.3 Cinética de cambios en el número celular, viabilidad y expansión en condiciones adipogénicas	51
6.4 Análisis con la tinción de rojo oleoso.....	57
6.4.1 Fracción no adherente.....	57
6.4.2 Fracción adherente.....	60
6.5 PCR en tiempo real.....	64
6.6 Cultivo de células separadas por el marcador CD163.....	67
7. Discusión.....	69
8. Conclusiones.....	74
9. Perspectivas.....	75
10. Referencias bibliográficas.....	76

Lista de ilustraciones, tablas y figuras:

Ilustración 1: Esquema de la hematopoyesis mostrando los cuatro compartimentos	7
Ilustración 2: Conceptos de diferenciación y expansión.....	13
Ilustración 3: Fases de la adipogénesis.....	23
Ilustración 4: Métodos de selección para separar células según sus marcadores.....	27
Tabla 1: Número de células sembradas para en ensayo de colonias de progenitores hematopoyéticos.....	40
Tabla 2: Primers y sondas utilizados para la reacción de PCR en tiempo real.....	45
Tabla 3: Programa de ciclos y temperaturas.....	46
Tabla 4: Recuperación celular y enriquecimiento en células primitivas después de la inmunoselección de células de sangre de cordón umbilical.....	50
Figura 1: Ensayos de colonias de fibroblastos (UFC-F).....	49
Figura 2: Viabilidad.....	53
Figura 3: Cambios en el número celular.....	54
Figura 4: Frecuencia de progenitores.....	56
Figura 5: Tinción con rojo oleoso.....	58
Figura 6: Porcentaje de células positivas a rojo oleoso en la fracción no adherente.....	59
Figura 7: Porcentaje de células positivas a rojo oleoso en la fracción adherente durante la exposición a medio adipogénico en el cultivo de 3 fases.....	61
Figura 8: Número de células adheridas.....	61
Figura 9: Porcentaje de células positivas a rojo oleoso en la fracción adherente en los tres protocolos.....	63
Figura 10: Número absoluto de células teñidas con rojo oleoso en la fracción adherente.....	63
Figura 11: Expresión relativa de los genes LPL y PPAR γ 2.....	66
Figura 12: Porcentaje de células positivas a rojo oleoso de la fracción adherente de las células separadas por CD163.....	68
Figura 13: Porcentaje de células positivas a rojo oleoso de la fracción no adherente de las células separadas por CD163.....	68

RESUMEN

La hematopoyesis es el proceso fisiológico mediante el cual se desarrollan todas las células maduras de la sangre a partir de las células troncales hematopoyéticas (CTH). Estas células, en el caso del humano presentan un inmunofenotipo $CD34^+ CD38^- Lin^-$, siendo el primero un marcador primitivo de estas células, el segundo uno de progenitores y el tercero de células maduras; y se pueden obtener de tres fuentes: médula ósea, sangre periférica movilizada y sangre de cordón umbilical, de las cuales, la última, es la de más fácil acceso y cuyas células tienen mayor capacidad de proliferación y expansión.

Por otro lado, las células estromales mesenquimales son capaces de diferenciarse a adipocitos condrocitos y osteocitos. Los adipocitos son células encargadas del procesamiento y almacenamiento de los lípidos y están en estrecho contacto con las células hematopoyéticas en médula ósea.

Existen diversos estudios que plantean que las CTH pueden diferenciarse a linajes distintos al sanguíneo, esta capacidad se conoce como plasticidad, pero dichos estudios aún son muy controvertidos. La diferenciación de CTH a adipocitos no es la excepción, diversos autores han trabajado con modelos murinos y plantean esta posibilidad.

En esta tesis se observó el comportamiento de las CTH humanas de sangre de cordón umbilical en un medio de diferenciación adipogénica con el fin de contribuir a la resolución de la controversia de la plasticidad de estas células hacia adipocitos.

Para ello se utilizaron células $CD34^+ CD38^- Lin^-$ y se cultivaron *in vitro* bajo la influencia únicamente de factores solubles. Se utilizaron cuatro protocolos de cultivo distintos: el control (condiciones hematopoyéticas durante todo el cultivo), el de una fase (condiciones adipogénicas durante todo el cultivo), el de dos fases (una fase en condiciones hematopoyéticas y la otra en condiciones adipogénicas) y el de tres fases (similar al de dos fases pero con una fase intermedia de medio rico en suero fetal bovino).

A partir de ellos se comparó la viabilidad de las células, el aumento o disminución de las mismas durante el cultivo, el cambio en el número de progenitores hematopoyéticos, el porcentaje de células tanto adherentes como no adherentes que se tiñen con rojo oleoso, mostrando la presencia de lípidos internos y la expresión de genes que generalmente se aceptan como marcadores relacionados al linaje

adipocítico. Por otro lado se cultivaron células CD163⁺ y CD163⁻ (marcador de macrófagos) bajo los mismos protocolos para notar si la tinción observada de rojo oleoso se relaciona con la población de macrófagos.

Se observó que el medio adipogénico no favorece la viabilidad, la proliferación ni el mantenimiento de progenitores hematopoyéticos en comparación con el medio hematopoyético. También que hay un bajo porcentaje de células teñidas con rojo oleoso en la fracción no adherente y uno alto en la fracción adherente, pero no es diferente entre ambos medios. Tampoco se observó una diferencia significativa en la expresión de genes adipogénicos entre las células que están en medio hematopoyético y las que están en medio adipogénico, pero si fue significativamente menor con respecto a los adipocitos derivados de células mesenquimales cultivados con el mismo medio adipogénico.

Se observó una tendencia hacia un incremento en el porcentaje de células positivas a rojo oleoso en la población CD163⁺ así como mayor uniformidad en dicho porcentaje que en la CD163⁻ donde la población es más heterogénea.

La tinción de rojo oleoso es normalmente usada para teñir adipocitos, sin embargo esta se observó en los macrófagos, y tal vez en otras células sanguíneas que también presentan lípidos internos. Además se observó bajo condiciones de cultivo hematopoyético y adipogénico, la expresión de los genes LPL y PPAR γ 2 que son igualmente aceptados como marcadores adipogénicos. Por lo tanto, aunque las células hematopoyéticas presentan características adipocíticas no se observó una diferenciación de estas a adipocitos puesto que no hay diferencia de dichas características entre las células que estuvieron en condiciones hematopoyéticas y adipogénicas. En este sistema no hubo adipogénesis a partir de células hematopoyéticas humanas.

ABSTRACT

Hematopoiesis is defined as the physiological process in which mature blood cells are developed from hematopoietic stem cells (HSC). In human, these cells are defined immunophenotypically as CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ cells. CD34 is a primitive marker, CD38 a progenitor marker and Lineage are all the markers of mature cells. They can be found in three sources: Bone marrow, mobilized peripheral blood and umbilical cord blood, being the latter the one with the easiest access and with the more capable cells in terms of proliferation and expansion.

On the other hand, mesenchymal stromal cells are able to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. The adipocytes are the cells in charge of processing and storage of lipids and are in constant contact with hematopoietic cells in bone marrow.

There are many studies suggesting that hematopoietic cells can differentiate into lineages other than blood. This ability is known as plasticity, but these are still controversial studies. Differentiation from hematopoietic to adipocytes cells is not the exception, some authors have worked with murine models in this subject and have set this possibility.

In this thesis, human HSCs from umbilical cord blood were observed under adipogenic differentiation conditions, in order to contribute to the resolution of the controversy in plasticity of these cells into adipocytes.

For this, CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ cells from cord blood were cultivated *in vitro* under the only influence of soluble factors in the media. These under four different culture protocols: control (hematopoietic conditions throughout the culture), one phase (adipogenic conditions throughout the culture), two phases (the first one with hematopoietic conditions and the second with adipogenic conditions), and three phases (similar to the two phases protocol but with an intermediate phase of an enriched media with fetal bovine serum).

Based on them, we compared cell viability, increase or decrease in cell number, change in the number of hematopoietic progenitors, frequency of Oil Red O positive cells both in adherent and non-adherent cells, showing the presence of internal, and the expression of genes normally accepted as adipocyte markers. On the other hand, we cultivated CD163⁺ and CD163⁻ (macrophage marker) cells under the same protocols to see if Oil Red O positivity was due to the macrophage population.

It is observed that the adipogenic media affects the viability, proliferation, number of progenitors compared to the hematopoietic media. Also, there is a low frequency of positive Oil Red O cells in the non-adherent fraction and a high one on the adherent fraction, but there is no difference between both media. There wasn't either a significant difference in the expression of adipogenic genes between cells developed in hematopoietic media and adipogenic media. But it was significant between them and the positive control of adipocytes differentiated from mesenchymal cells with the same adipogenic media.

We observed a tendency of the CD163⁺ population to have a higher frequency of Oil Red O positive cells and greater homogeneity in that frequency than in the CD163⁻ population, which is more heterogeneous.

Oil Red O is normally used to dye adipocytes, however, it is also observed in macrophages and maybe in other blood cells that present internal lipids, there was also observed in cells equally under hematopoietic or adipogenic conditions, the expression of LPL and PPAR γ 2 even though they are generally accepted as adipogenic markers. Therefore, even when hematopoietic cells present adipogenic characteristics, there was no differentiation from these cells to adipocytes since there was no difference of such characteristics between cells that were in hematopoietic or adipogenic conditions. In this system, there wasn't any adipogenesis observed from human hematopoietic cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es el proceso mediante el cual células primitivas conocidas como troncales hematopoyéticas (CTH), se autorrenuevan, proliferan y se diferencian hacia los distintos linajes del tejido sanguíneo (Mayani *et al.*, 2007). Esto sucede en la médula ósea del adulto, mientras que en la etapa fetal, las primeras células sanguíneas se observan en un tejido extraembrionario conocido como saco vitelino.

El primer órgano hematopoyético en el embrión propiamente, es el área conocida como aorta-gónada-mesonefros, que proviene de la capa embrionaria mesodérmica. A partir de este momento inicia la fase que es conocida como hematopoyesis primitiva. A partir de la quinta semana de gestación, la hematopoyesis sucede en el hígado y mantiene esta actividad hasta dos semanas después del nacimiento. Sin embargo, poco tiempo antes, se instala la hematopoyesis en la médula ósea, siendo ésta la fase de definitiva, ya que se mantiene ahí durante toda la etapa adulta (Rodak, 2005; Wang y Wagers, 2011).

Para una mejor comprensión del estudio de la hematopoyesis, se le ha dividido en cuatro compartimentos: el primero está conformado por las células troncales, el segundo por las progenitoras, el tercero por las precursoras y el cuarto y último por las maduras (Ilustración 1) (Mayani *et al.*, 2007).

Las CTH tienen la capacidad de auto-renovarse, es decir de generar células iguales a sí mismas, y de diferenciarse, generando células hematopoyéticas maduras a partir de la división celular (Mayani *et al.*, 2007). Del total de las células de la médula ósea, las CTH ocupan el 0.005% además de que generalmente se encuentran quiescentes, es decir, están en la fase G₀ del ciclo celular. Inmunofenotípicamente las CTH humanas se distinguen por los marcadores CD34, CD90 y CD133 y la ausencia de marcadores CD38, HLA-DR,

CD45RA, CD71 así como cualquier otro marcador específico de algún linaje de células hematopoyéticas maduras (Mayani, 2010; Pelayo *et al.*, 2011).

Las CTH dan lugar a las células progenitoras (CPH), las cuales ocupan del 0.1 al 0.5% de células mononucleares en médula ósea. Estas ya perdieron su capacidad de auto-renovación, sin embargo presentan una alta capacidad de proliferar, haciéndolo más rápidamente y generando mayor número celular que las troncales. Estas células no se pueden distinguir entre sí por su morfología pero si por su inmunofenotipo, es decir, cada célula progenitora presenta distintos marcadores según el tipo celular que puede generar, aún así comparten marcadores como CD34 y CD38 (Ching, 2006; Mayani *et al.*, 2007, Mayani, 2010). Dentro de este compartimento encontramos células con distintos potenciales de diferenciación: multipotenciales (que tiene la capacidad de diferenciarse a más de dos linajes sanguíneos), bipotenciales o monopotenciales (Mayani *et al.*, 2007, Mayani, 2010).

A partir de las células progenitoras surgen las precursoras, las cuales ya pueden reconocerse por su morfología pero ya no poseen la capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos celulares sino que están comprometidas a un solo tipo celular hematopoyético maduro. Estas corresponden al 90% de células mononucleares dentro de la médula ósea y su capacidad de proliferación es menor que las progenitoras (Mayani *et al.*, 2007).

Finalmente, se generan las células maduras, las cuales ya no proliferan y salen a la circulación sanguínea cumpliendo con sus distintas funciones, (Mayani *et al.*, 2007). Existen al menos nueve linajes sanguíneos: granulocitos (que incluyen tres subtipos, basófilos, neutrófilos y eosinófilos), eritrocitos, trombocitos (plaquetas), linfocitos B, linfocitos T y células NK (Mayani *et al.*, 2007).

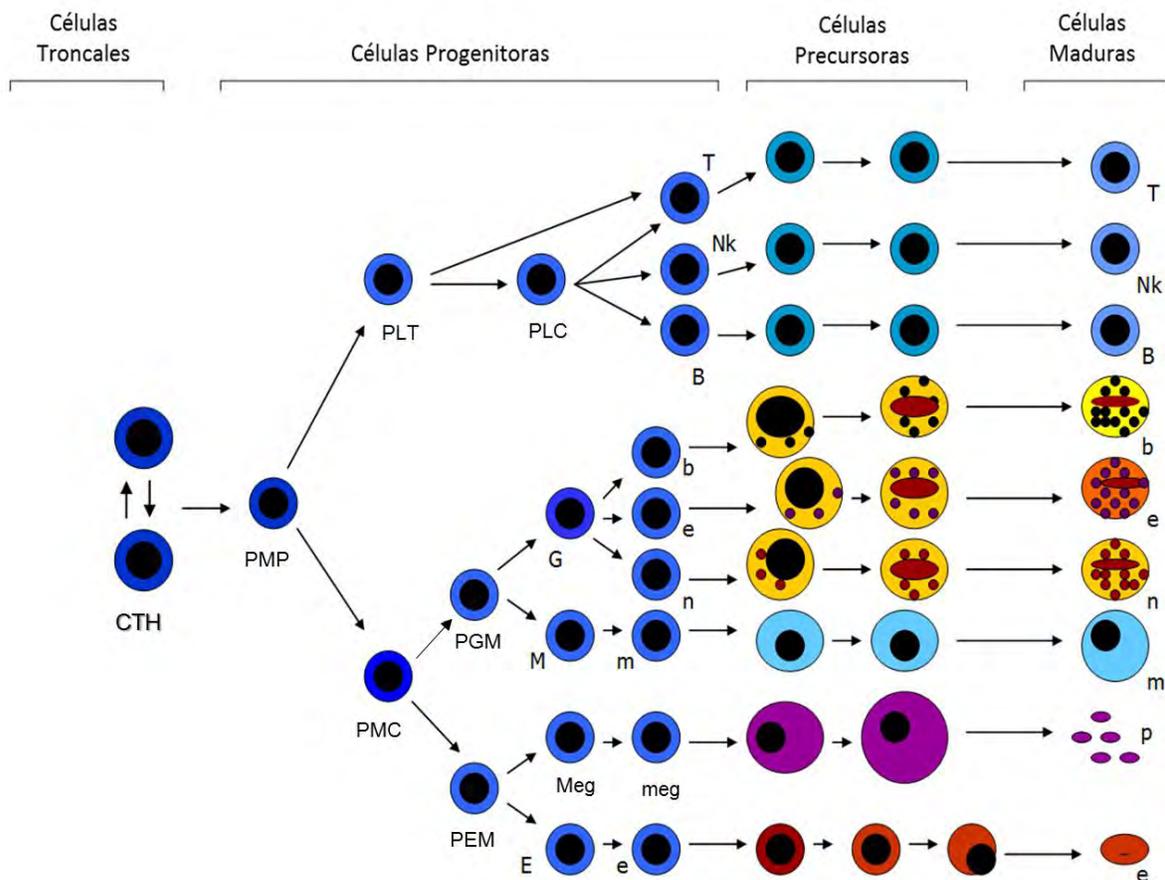


Ilustración 1 Esquema de la hematopoyesis mostrando los cuatro compartimentos. CTH: Células troncales hematopoyéticas. PMP: Progenitor multipotente. PLT: progenitor linfóide temprano. PLC: Progenitor linfóide común. T: Linfocitos T. Nk: Linfocitos NK. B: Linfocitos B. PMC: Progenitor mieloide común. PGM: Progenitor granulomonocítico. G: granulocitos. b: basófilos. e: eosinófilos. n: neutrófilos M: monocitos. m: macrófagos PEM: Progenitor eritroide-megacariocítico. Meg: Megacariocitos tempranos. meg: tardíos. p: plaquetas E: eritrocitos tempranos. e: eritrocitos tardíos Modificado de Mayani 2010.

1.1.1.1 CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS

Desde hace más de cuarenta años, desde los estudios de Till y McCulloch se sabe que en distintos tejidos existen células que son capaces de generar los diferentes tipos celulares que corresponden a ese tejido. A estas células se les dio el nombre de células troncales somáticas (Mayani, 2003).

Se definieron como células inmaduras, no diferenciadas, con capacidad de diferenciación a uno o más tipos celulares dentro del tejido al que pertenecen y de auto-renovación para generar células iguales a sí mismas. No se les puede

reconocer por morfología sino únicamente por ensayos de funcionalidad y por marcadores genéticos e inmunofenotípicos (Pelayo *et al.*, 2011).

Las primeras células troncales somáticas en ser descritas fueron las hematopoyéticas, descubiertas por James Till y Ernest McCulloch en 1961. En sus experimentos radiaron a un grupo de ratones y les trasplantaron un número conocido de células provenientes de médula ósea de ratones sanos. Observaron que en los ratones irradiados se formaban colonias de células en el bazo, el hallazgo fue que número de colonias observado tenía una relación directa con el número de células trasplantadas (por cada 10^4 células trasplantadas, se formó una colonia en el bazo), por lo que intuyeron que cada colonia provenía de una sola célula (Till y McCulloch, 1961).

Así nació el concepto de células troncales hematopoyéticas (CTH), que desde entonces se han estudiado y caracterizado en modelos tanto *in vivo* como *in vitro*. También se han empleado distintos marcadores inmunofenotípicos para aislarlas, sin embargo, estos generalmente son compartidos con otras poblaciones celulares; es decir, no se ha descubierto un marcador único que defina a las CTH. Por lo anterior, es necesario emplear varios marcadores de manera simultánea.

Los marcadores inmunofenotípicos que hasta ahora se han descrito para las CTH en el ratón son: c-kit, presente a una alta concentración, Sca1 y Slamf1, así mismo se ha visto que son células negativas a Flk2, CD34 y a cualquier marcador de células hematopoyéticas maduras, como CD3, CD8, CD19, CD20, CD33, GR1, etcétera, es decir son linaje negativo (Lin^-) (Pelayo *et al.*, 2011). También se ha visto la expresión de genes como scl, lmo2 y GATA-2 (Godin y Cumano, 2006).

En el humano estas células son positivas principalmente a CD34, CD49f, CD90, CD117 y CD133 y son negativas a CD38 y CD45RA y al igual que en el ratón, son Lin^- , ya que no expresan marcadores como CD3, CD8, CD19, CD20, CD56, CD11b, CD14, GlyA, CD38, etcétera (Pelayo *et al.*, 2011).

Por otra parte, los ensayos funcionales que se utilizan para estudiar y medir la frecuencia de células troncales y progenitoras hematopoyéticas se

dividen en dos categorías, los ensayos *in vivo* y los ensayos *in vitro* y se describen a continuación:

- Ensayos *in vivo*
 - Para las células troncales provenientes de ratón, se utilizan ratones irradiados como receptores de las células hematopoyéticas y se mide la capacidad de éstas para repoblar el sistema del ratón (Pelayo *et al.*, 2011).
 - Para las células troncales humanas, se realiza el mismo estudio pero utilizando como receptores ratones inmunodeficientes SCID o NOD-SCID (Pelayo *et al.*, 2011).

- Ensayos *in vitro*
 - Células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC por sus siglas en inglés). También se basa en un cultivo a largo plazo, la principal diferencia con el anterior es que las colonias observadas son grupos de progenitores que en teoría provienen de una sola célula troncal (Bunting, 2008).
 - Ensayo de unidades formadoras de colonias. Las células hematopoyéticas se cultivan en un medio semisólido de metil-celulosa en donde se observa el crecimiento de colonias formadas por progenitores comprometidos. Este ensayo sirve para ver la frecuencia de células progenitoras más que de células troncales, de hecho se puede observar el tipo de progenitor que dio lugar a la colonia al ver el color y la morfología de la misma, siendo que se pueden distinguir colonias que surgieron a partir de una célula progenitora que para este tipo de ensayos, es denominada unidad formadora de colonias (CFU por sus siglas en inglés). Los distintos tipos de colonia que se observan son: eritroides (CFU-E y BFU-E), monocíticas (CFU-M), granulocíticas (CFU-G) y granulocítica-monocítica (CFU-GM) (Bunting, 2008).

La fisiología de las células está regulada por distintos factores que pueden ser:

- Intrínsecos: incluyen diferentes proteínas que se encuentran dentro de la célula como factores de transcripción (como SCL, PU.1, GATA-1, GATA-2, CBF β , NF κ β , etcétera) o proteínas reguladoras del ciclo celular (como p21), la expresión de genes específicos que controlan el destino de diferenciación de la célula y los telómeros, los cuales actúan como relojes mitóticos que se van acortando con cada división celular (Mayani, 2003; Pelayo *et al.*, 2011).
- Extrínsecos: Incluye todos los elementos que se encuentran en el microambiente en donde se desarrolla la célula, formado tanto de células (mesenquimales, adipocitos, osteocitos, etcétera) como de sus productos (fibronectina, laminina, interleucinas, interferones, citocinas, etcétera). Controlan la función de las células troncales causando cambios en la expresión de genes y otros elementos intrínsecos (Mayani, 2003; Pelayo *et al.*, 2011).

1.1.2 FUENTES DE CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS

Podemos obtener a las CTH a partir de tres fuentes principales:

- Médula ósea. Es la primera fuente de CTH que se utilizó. Aunque presenta muchas ventajas en la clínica, la obtención de estas células representa un mecanismo muy invasivo para el donador, pues se hace una punción en la cresta ilíaca y luego la aspiración de la médula (Kolb y Holler, 1997). En condiciones normales, la mayoría de las células troncales hematopoyéticas se encuentran ahí, debido a que dentro de la médula ósea existen distintos tipos de nichos que poseen las características y el microambiente adecuados para el mantenimiento, regulación y desarrollo de las funciones biológicas de estas células (Wang y Wagers, 2011).

- Sangre periférica movilizada. Se empezó a utilizar como alternativa a la médula ósea por ser un método menos invasivo. En los años 60`s se descubrió que la sangre periférica tenía también CTH en menor proporción y más adelante se observó que los pacientes expuestos a quimioterapia tenían mayores cantidades de células troncales que los pacientes no expuestos. Se comenzó a utilizar la quimioterapia para movilizar a estas células, sin embargo mas recientemente se descubrió que distintos factores como el factor estimulador de colonias de fibroblastos (G-CSF), también causaban el mismo efecto sin necesidad de la quimioterapia. Aunque este factor es el más usado, se utilizan otros, como inhibidores de CXCR4 y de VLA4 y el bortezomib, que inhibe proteosomas. Todas estas moléculas tienen un efecto similar, provocando que las uniones de las células primitivas a su nicho dentro de la médula se rompan y así las células salgan a la sangre (Motabi y DiPersio, 2012).
- Sangre de cordón umbilical. Es una fuente rica en células troncales y progenitoras hematopoyéticas. Esto se descubrió en los años 70s, con los trabajos de Knutzon; pero fue hasta los estudios de Hal Broxmeyer –en la segunda mitad de los años 80s- que se comenzó a utilizar en la clínica. Se ha visto que el porcentaje de células primitivas es mayor que en las otras dos fuentes y que tienen mayor capacidad de proliferación y de expansión, como se describe a continuación (Mayani y Lansdorp, 1998; Mayani, 2010).

1.1.2.1 CÉLULAS TRONCALES Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

La proporción de progenitores hematopoyéticos en sangre de cordón umbilical es similar al observado en médula ósea; sin embargo, se ha visto que en la primera son más frecuentes los progenitores más primitivos, como BFU-E, CFU-GM, CFU-MK y CFU-GEMM (Mayani y Lansdorp, 1998).

Esto se puede ver también inmunofenotípicamente, ya que la proporción de células positivas a CD34, que representa a toda la población hematopoyética troncal y progenitora, es similar en médula ósea y en sangre de cordón umbilical;

sin embargo, si se considera a una población más restrictiva, como la positiva a CD34 y a su vez negativa a CD38, que representa a la población hematopoyética troncal y de progenitores muy primitivos, se observa que el porcentaje es mayor en sangre de cordón umbilical que en médula ósea (4% y 1% respectivamente, de la fracción total de células CD34⁺) (Mayani y Lansdorp, 1998). A su vez se ha visto que en la sangre de cordón umbilical, las células positivas a CD34 tienen mayor número de moléculas CD34 que las de médula ósea, sin embargo no se conoce la relevancia de esto (Mayani, 2010).

Como se mencionó anteriormente, las células primitivas provenientes de sangre de cordón umbilical tienen mayor capacidad de proliferación y expansión que las provenientes de las otras dos fuentes. La proliferación la entendemos como el aumento en el número de células, sin importar los tipos celulares resultantes, en cambio la expansión es el aumento en el número de células de un solo tipo, como lo podemos ver en la autorrenovación de las CTH. Cuando se tiene una célula troncal y se obtiene con el tiempo células maduras, se habla de diferenciación (Ilustración 2).

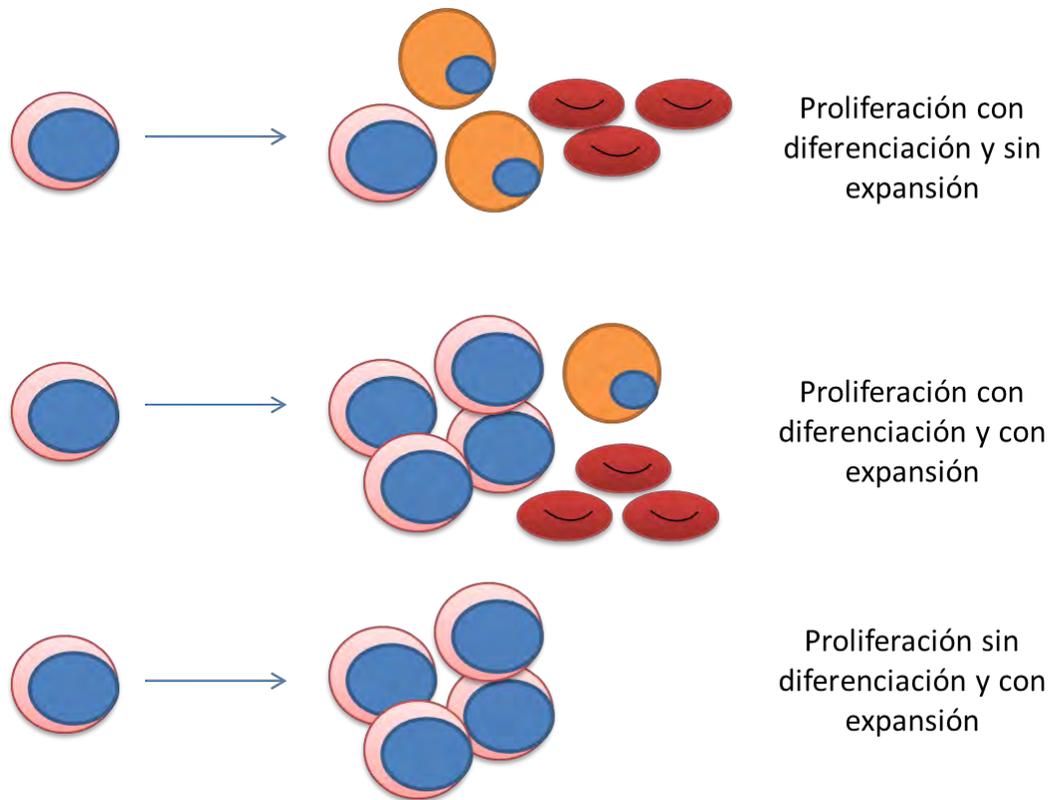


Ilustración 2 Conceptos de proliferación, diferenciación y expansión

Algunas posibles explicaciones de la mayor capacidad proliferativa de las células de la sangre de cordón umbilical, particularmente de la población CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻, es que el tamaño de los telómeros es más largo, permitiendo que cada célula tenga de 20 a 40 divisiones celulares extra, lo que significa que a nivel poblacional puede aumentar 10⁶ veces más el número celular inicial. Además las células troncales de esta fuente tienen la capacidad de salir de su estado quiescente más rápidamente y necesitan menor cantidad de citocinas para su desarrollo porque producen sus propias citocinas en mayor cantidad (Mayani, 2010).

Es evidente que la sangre de cordón umbilical presenta ventajas no solo a nivel clínico sino a nivel de investigación básica. En ambas se busca tener células que tengan mayor capacidad de expansión y proliferación, por lo que se han hecho diversos estudios que buscan explotar esta capacidad, independientemente de la fuente de la que provengan las células.

1.1.3 ESTUDIO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS

Los cultivos para el estudio *in vitro* de las células troncales hematopoyéticas pueden ser de dos tipos, con estroma o sin él. El primero fue descrito inicialmente por Dexter en los años 70's y se logró mantener a las células hematopoyéticas *in vitro* por más tiempo de lo que antes se había logrado (Dexter *et al*, 1978).

Este tipo de cultivo consiste en un estroma adherente formado principalmente por fibroblastos y células mesenquimales que le dan a las células hematopoyéticas presentes en el cultivo los factores necesarios para sobrevivir y desarrollarse (Flores, 2006).

Sin embargo, los factores que el estroma brinda a las células hematopoyéticas no estaban bien caracterizados. Tiempo después, se pudieron desarrollar cultivos celulares en donde el estroma no es necesario y requiere la adición de estos factores o citocinas hematopoyéticas que permiten la supervivencia y proliferación de las células (Flores, 2006).

Con el tiempo se entendió que las distintas citocinas actuaban en diferentes puntos de la maduración de las células. Por ejemplo, el factor de células troncales (SCF por sus siglas en inglés) y el ligando de la tirosina fetal 3 (Flt3-L) actúan en las etapas más tempranas de la hematopoyesis, a nivel de células troncales y progenitoras muy primitivas; los factores estimulantes de colonias (CSF por sus sigla en inglés) actúan en progenitores aún no tan comprometidos y finalmente algunas citocinas como la eritropoyetina (EPO), la trombopoyetina (TPO) y la interleucina 5 (IL-5) actúan en precursores ya comprometidos. Este concepto, aunque es correcto, no expresa la verdadera complejidad que representa la acción de estas citocinas por separado y en conjunto (Metcalf, 2008).

Debido a las características analizadas de estos factores y a su efecto sobre las células se les han utilizado en diferentes protocolos de cultivos *in vitro*. A continuación se describen algunas de estas citocinas y otros factores que pueden alterar la función de las células hematopoyéticas.

1.1.3.1 EFECTOS DE FACTORES SOLUBLES SOBRE CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS

- Citocinas de acción temprana:
 - Factor de células troncales (SCF): Es el ligando para el receptor c-kit. Estimula la proliferación de distintos tipos celulares, entre ellos, en el linaje hematopoyético las células troncales y progenitores muy primitivos. Trabaja de forma sinérgica con otras citocinas para estimular tanto células primitivas como maduras (Hoffman *et al*, 1993; McNiece y Briddell, 1995)
 - Ligando de la tirosina fetal 3 (Flt3-L): Estimula a las células troncales y progenitores multipotenciales muy primitivas junto con la trombopoyetina. También estimula la proliferación de distintas células leucocitarias y células dendríticas, sobre todo en combinación con GM-CSF (Beutler *et al.*, 2001; Parajuli *et al.*, 2001).
 - Trombopoyetina (TPO): Se sintetiza en el hígado y en menor medida en el riñón, es el producto del proto-oncogén c-mpl. Tiene un papel primordial en la proliferación y diferenciación de megacariocitos, así como en la producción de plaquetas. Estimula la expansión, auto-renovación y supervivencia (inhibe la apoptosis) de las células troncales y progenitoras muy primitivas. (Beutler *et al.*, 2001; Geddis *et al.*, 2002; Kaushansky *et al.*, 2009).
 - Interleucina 6 (IL-6): Estimula la megacariopoyesis y la formación de colonias de granulocitos y monocitos. Actúa junto con otras citocinas para cumplir diversas funciones como la proliferación mieloide. Se conoce por su función de inducir la producción de inmunoglobulinas en células B (Beutler, 2001).

- Citocinas de acción intermedia:
 - Interleucina 3 (IL-3): Es un estimulador multilínea, es decir estimula la producción de eritrocitos, neutrófilos, linfocitos, megacariocitos, granulocitos y monocitos (Beutler E *et al.*, 2001).
 - Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF): Estimula el progenitor granulo-monocítico (CFU-GM) y la producción de neutrófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos. Junto con otras citocinas estimula a las células troncales y diversos tipos celulares. Estimula la proliferación y maduración de progenitores de neutrófilos y macrófagos bipotenciales. También actúa sobre células maduras, por ejemplo, estimulando la producción de nucleoproteínas en granulocitos (Beutler *et al.*, 2001).

- Citocinas de acción tardía o linaje específicas:
 - Eritropoyetina (EPO): Estimula la producción de eritrocitos. En el humano se sintetiza en el riñón y en menor proporción en el hígado. Actúa sobre todo en progenitores más tardíos y en los precursores de proeritroblastos y eritroblastos basófilos, pero no en etapas más tardías, esto es debido a la ausencia del receptor para eritropoyetina (Beutler *et al.*, 2001).
 - Factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF): Actúa sobre los monocitos en la supervivencia, proliferación y diferenciación. En los macrófagos también tiene funciones como la del aumento en la producción proteica (IL-1, productos de la reducción de oxígeno, entre otras) (Beutler *et al.*, 2001).
 - Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF): Actúa sobre los granulocitos aumentando su función y producción. Junto con otras citocinas estimula a los progenitores inmaduros. Actúa también sobre algunas células maduras, por ejemplo, estimula la citotoxicidad en el neutrófilo (Beutler *et al.*, 2001).

Las citocinas hematopoyéticas como se pudo observar en las descripciones anteriores no actúan siempre por sí solas, sino que es muy común que actúen en sinergia con otras citocinas. Un cultivo *in vitro* resulta más eficiente utilizando citocinas en combinación que de forma aislada (Moore, 1991; Hoffman *et al.*, 1993; Flores, Gutiérrez y Mayani, 2002).

Existen otras moléculas a partir de las cuales se ha visto algún efecto sobre células hematopoyéticas, que aunque no son citocinas, se han utilizado de manera experimental para distintos fines. Los que se mencionan a continuación son elementos que generalmente se utilizan *in vitro* en la adipogénesis de células mesenquimales, de lo cual se hablará más adelante.

- Factores adipogénicos:
 - Dexametasona: Es un glicocorticoide que incrementa indirectamente la quiescencia en las CTH actuando en la sobreexpresión de la angiopoyetina-1 (Kim *et al.*, 2008). Los glucocorticoides también ocasionan que los eritroblastos permanezcan inmaduros, ya que estos poseen el receptor para glucocorticoides; y la dexametasona de hecho causa la proliferación sin diferenciación de los mismos (Wessely *et al.*, 1997).
 - Isobutil-metilxantina (IBMX): Es un inhibidor de la actividad fosfodiesterasa. En células hematopoyéticas inhibe al receptor de TNF, lo que provoca el aumento en el número de células primitivas y progenitoras. El TNF también inhibe la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), que como se verá más adelante es producida por los adipocitos; esto significa que el IBMX permite que, de existir, la LPL aumente su actividad a través de la inhibición de TNF (Lindvall *et al.*, 1990)
 - Insulina: Se utiliza en medios libres de suero para el crecimiento de células hematopoyéticas, precisamente por su capacidad de inducir la capacidad de proliferación en éstas y muchas otras células (Chao *et al.*, 2003)

- Indometacina: Es un inhibidor de la producción de prostaglandinas. En las células hematopoyéticas ha demostrado tener un papel radioprotectivo cuando se junta con otros factores (Fedorocko y MacKová, 1996). También aumenta la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. *In vivo* se ha visto un aumento en el número de precursores mieloides en ratones expuestos a indometacina y GM-CSF (Fontagne *et al.*, 1980).

En algunos estudios se plantea que los factores solubles pueden influir en la célula hematopoyética otorgándole distintas capacidades como la plasticidad.

1.1.4 PLASTICIDAD

En los últimos 13 años ha habido diversos estudios en donde se propone que las células en general, podrían ser capaces de diferenciarse a tipos celulares no esperados, a este fenómeno se le dio el nombre de plasticidad (Horwitz, 2003). Por ejemplo: en diversos estudios se ha visto que poblaciones de células hematopoyéticas trasplantadas *in vivo* de un animal a otro llegan e injertan (se alojan) no sólo en médula ósea sino en distintos órganos como hígado (Lagasse *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2006), corazón (Horwitz, 2003) y tejido adiposo (Sera *et al.*, 2009) y aparentemente se diferencian a tipos celulares del tejido al que llegaron.

Teóricamente existen dos mecanismos por los que se ha intentado explicar la plasticidad celular:

- Transdiferenciación: Consiste en que una célula se diferencia a otra de un linaje distinto mediante el apagado y prendido de genes específicos a los dos tipos celulares (Poulsom *et al.*, 2002; Wong, Casper y Rogers, 2010).
- Rediferenciación: Consiste en un paso previo en el cual se prenden genes de pluripotencialidad, permitiendo que la célula primero se desdiferencie para luego diferenciarse hacia otro tipo celular. (Poulsom *et al.*, 2002; Wong, Casper y Rogers, 2010).

Sin embargo, algunos autores explican que existen mecanismos alternativos a la plasticidad que generan una controversia acerca de si el fenómeno observado es una diferenciación real. Estos son principalmente tres:

- **Fusión:** La célula llega a un tejido distinto al propio por señales de quimiotaxis (generalmente por daño agudo al tejido) y se fusiona con alguna de las células ahí presentes, aparentando adquirir características de esa célula (Poulsom et al., 2002)
- **Microvesículas:** El tejido dañado secreta microvesículas que contienen factores de transcripción, RNA mensajeros, entre otras moléculas, y se fusionan con una célula vecina haciendo que esta exprese genes específicos del tejido dañado (Quesenberry, Dooner y Aliotta, 2010)
- **Modificación artificial de la expresión de genes:** Para los estudios *in vitro*, artificialmente se introducen genes por medio de vectores; por ejemplo, mediante la administración ectópica de factores de transcripción Sox-2 y C-myc se inducen células CD133+ provenientes de sangre de cordón umbilical hacia el linaje neural (Giorgetti *et al.*, 2012). Sin embargo, en este caso no se puede hablar de plasticidad puesto que no se está observando una capacidad intrínseca de la célula para diferenciarse a otro linaje sino que se introducen a la célula factores externos (Horwitz, 2003).

Estos son algunos de los mecanismos que se han descrito en la literatura para descartar el fenómeno de plasticidad y que ha contribuido a fortalecer la controversia sobre si existe o lo que se observa se trata de un falso positivo.

1.1.5 CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES

Dentro de la médula ósea existe otros tipos de celulares, no hematopoyéticos, como las células estromales mesenquimales, las cuales poseen una gran capacidad de multipotencialidad, pues pueden diferenciarse hacia tejido óseo, cartilaginoso, adiposo, muscular y endotelial. Se conocen bajo diversos

nombres, como células estromales mesenquimales, células estromales mesenquimales o progenitores mesenquimales. Inmunofenotípicamente se reconocen por distintos marcadores, pero los más reconocidos son CD105, CD73 y CD90. (Payushina, Domaratskaya y Starostin, 2006; Montesinos *et al.*, 2009).

Existen diversas fuentes a partir de las cuales ha sido posible aislar a las células mesenquimales, la más común es la médula ósea, pero también se encuentran en placenta, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, pulpa dental, paredes vasculares, etcétera y en etapas tempranas post-natales se han encontrado en el hígado, pulmón, bazo, piel, corazón y páncreas (Payushina, Domaratskaya y Starostin, 2006; Montesinos *et al.*, 2009).

Desde los años 60's, e incluso desde antes, se conocía que a partir del trasplante de médula ósea había generación *de novo* de tejido óseo, sin embargo fue hasta la década de los 70's que Friedenstein y colaboradores descubrieron que este potencial osteogénico provenía específicamente de una población celular no hematopoyética, la cual fue identificada por su capacidad de adherencia a la placa del cultivo y su morfología fibroblastoide (Friedenstein *et al.*, 1976; Bianco, Gehron y Simmons, 2008).

Estas células, también llamadas estromales, ya se conocían y se empezaban a utilizar para el desarrollo de los cultivos tipo Dexter, sin embargo se conocían por su capacidad de interactuar con las células hematopoyéticas para darles soporte como parte del microambiente hematopoyético, no se sospechaba que dentro de este estroma hubiera otro tipo de célula troncal (Bianco, Gehron y Simmons, 2008).

Lo más relevante del estudio de Friedenstein fue entonces la observación de que estas células una vez en cultivo, después de cierto tiempo formaban colonias de varias células con la misma morfología y provenientes de una sola, sugiriendo la capacidad de auto-renovación. A estas formaciones se les llamó colonias formadoras de fibroblastos (CFU-F) y hoy en día se sigue utilizando para distinguir y aislar a las células mesenquimales. Estas colonias al ser trasplantadas, generaron *in vivo* hueso, cartílago, tejido adiposo y tejido fibroso y

con esto se demostró su multipotencialidad (Bianco P., Gehron R.P y Simmons P.J. 2008). Desde entonces se han hecho muchos estudios sobre la capacidad de diferenciación de estas células tanto *in vivo* como *in vitro* (Pittenger *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2002).

La diferenciación hacia estos linajes a partir de células estromales mesenquimales provenientes de distintas fuentes se ha caracterizado en diversos estudios, en el 2009 el Dr. Juan José Montesinos observó que las células mesenquimales de las tres fuentes (médula ósea, placenta y sangre de cordón umbilical) presentaron capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico y condrogénico; las provenientes del cordón umbilical no presentaron potencial adipogénico (Montesinos *et al.*, 2009).

1.1.5.1 ADIPOCITOS

Los adipocitos son las células que forman la mayor parte del tejido graso o adiposo el cual ocupa del 15-20% del peso corporal en hombres y del 20-25% en mujeres. No pueden dividirse pero si pueden aumentar de tamaño a medida que almacenan lípidos, que es su función principal (Jácome, 2005).

En los mamíferos existen dos tipos: los uniloculares que forman la grasa blanca principalmente en adultos, y los multiloculares, que forman la grasa parda en los neonatos (Jácome, 2005).

Los primeros son células poliédricas de 50 a 150 micrómetros de diámetro, su morfología está caracterizada por una sola vacuola lipídica de gran tamaño que desplaza al núcleo y a los organelos hacia la periferia, dando la impresión de ser un anillo delgado de citoplasma. Los segundos son células más pequeñas que contienen varias vacuolas lipídicas de distinto tamaño y numerosas mitocondrias que son las responsables del color pardo o café (Jácome, 2005).

La principal función de los adipocitos es el almacenaje de triglicéridos como reserva de energía, pero también presenta otras funciones:

- Función Secretora de:
 - Lipoproteínlipasa (LPL) que es producida solo por los adipocitos y es excretada hacia los vasos sanguíneos donde se incorpora para absorber las grasas del intestino que resultan de la digestión, y las lleva a los adipocitos (Ross y Pawlina, 2007).
 - Ácidos grasos y glicerol, que resultan de la degradación de los triglicéridos (Ross y Pawlina, 2007).
 - Hormonas como la leptina y la angiotensina que entran en comunicación con el hipotálamo para dar señales de hambre o de saciedad (Ross y Pawlina, 2007).
- Función Metabólica:
 - Síntesis *de novo* de ácidos grasos (Ross M.H. y Pawlina W. 2007).
 - Degradación de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol (Ross y Pawlina, 2007).

1.1.5.1.1 ADIPOGÉNESIS

Al proceso de formación y maduración de adipocitos, a partir de células estromales mesenquimales, se le conoce como adipogénesis.

Los adipocitos tanto multiloculares como uniloculares se originan en el mesoderma, las células mesenquimales en la médula ósea post-natal (Wu, 2008).

El proceso consiste en cuatro fases principales, (según lo que se ha visto *in vitro*, ya que *in vivo* aún no se ha caracterizado el marcaje preadipocítico para rastrear a la célula): Célula estromal mesenquimal, adipoblasto, preadipocito y adipocito (Ilustración 3) (Ross y Pawlina, 2007). Se ha visto que aún en la etapa de preadipocitos, estas células pueden generar adipocitos tanto uniloculares como multiloculares, aunque generalmente el compromiso se da desde la etapa de adipoblasto (Wu, 2008).

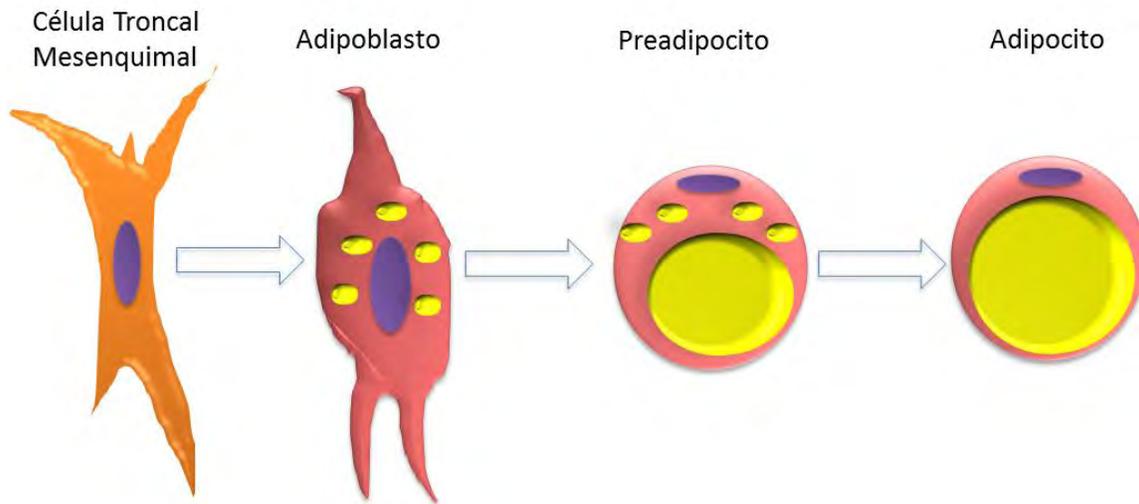


Ilustración 3 Fases de la adipogénesis

El proceso consiste en la producción, activación e inactivación de distintos factores de transcripción, entre ellos está un grupo llamado proteínas de unión al potenciador o enhancer CCAAT (C/EBPs) y de estos existen los subtipos α , β , δ , ϵ y ξ . Estos forman heterodímeros entre ellos durante el proceso.

Otro de los principales factores que participan es el PPAR γ del tipo 1 y 2, el primero se expresa en distintos tejidos mientras que el segundo casi exclusivamente en adipocitos. Además es un receptor nuclear que tiene un papel fundamental en la diferenciación y en la iniciación del metabolismo de los lípidos (Wu, Puigserver y Spiegelman, 1999; Ross y Pawlina, 2007; Wu, 2008)

Aunque es un proceso muy complejo se puede resumir en pocos pasos: Las células *in vitro* alcanzan confluencia, es decir, cubren la placa de cultivo debido a su activa proliferación. En las etapas más tempranas de la diferenciación, se activan por estimulación hormonal C/EBP β y C/EBP δ que suplen su función mutuamente, según lo observado en experimentos hechos con ratones knockout. Posteriormente C/EBP β activa a PPAR γ que a su vez estimula la expresión de C/EBP β . A medida que el proceso de adipogénesis avanza, la expresión de C/EBP β y C/EBP δ disminuye, mientras que la de C/EBP α , que es inducido por PPAR γ cuando este se heterodimeriza al unirse al

receptor de retinoides (RXR), aumenta. (Wu, Puigserver y Spiegelman, 1999; Wu, 2008).

Después hay una expansión clonal de los adipoblastos inducida hormonalmente por la activación del receptor de insulina (IGF-1). Una vez que la célula llega a la etapa de pre-adipocito, ya no hay proliferación, sino que la célula madura hacia la etapa de adipocito; en esta etapa, la insulina sigue siendo primordial (Wu, 2008), C/EBP α induce la diferenciación tardía y permite que los adipocitos sigan siendo responsivos a ella (Wu, Puigserver y Spiegelman, 1999).

Otros factores que potencian a PPAR γ son: el factor de diferenciación y determinación de adipocitos 1 (ADDP1) y la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP1) (Wu, Puigserver y Spiegelman, 1999). El CBP y el SRC-1 son coactivadores que estimulan la actividad de PPAR γ y C/EBP

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 ESTUDIO *IN VITRO* DE LA POBLACIÓN CELULAR HUMANA CD34⁺ CD38⁻ LIN⁻ DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Como se había mencionado anteriormente, el marcador CD34 está presente en las células troncales hematopoyéticas humanas y algunos progenitores primitivos, por ello en una gran parte de los estudios sobre estas células se separa a la población a partir de este marcador (Holyoake y Alcorn, 1994). Sin embargo para una separación más específica de células primitivas es necesario considerar otros marcadores como la ausencia de marcadores de linaje maduro y de CD38, ya que este último aumenta su expresión a medida que la célula se diferencia, por lo que su presencia indica que la célula ya no es troncal (McKenzie *et al.*, 2007).

Existen dos métodos de separación de estas células, uno es por selección positiva que consiste en que las células positivas a ciertos marcadores (por ejemplo, CD34) se adhieren al contenedor que reconoce dichos marcadores por medio de anticuerpos y se obtienen células positivas a ellos; y el

otro es por selección negativa, que consiste en que las células positivas a ciertos marcadores (por ejemplo CD38 y marcadores de linaje) se quedan en el contenedor que las reconoce por anticuerpos y se obtienen las células que son negativas a ellos (Ilustración 4).

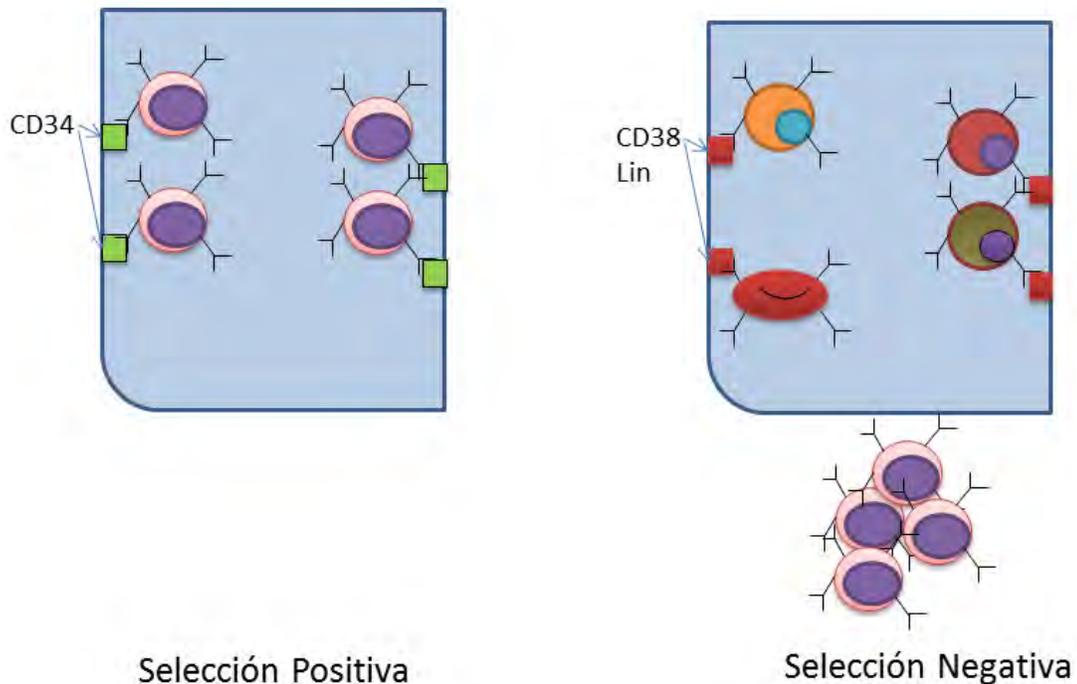


Ilustración 4. Métodos de selección para separar células según sus marcadores

Utilizar la selección negativa para aislar células humanas $CD34^+ CD38^- Lin^-$ o $CD34^+ Lin^-$, provenientes de sangre de cordón umbilical, representa un método satisfactorio de aislamiento. Se demostró que alrededor del 60% de las células obtenidas son $CD34^+$ y un porcentaje pequeño de las células (<10%) son positivas a CD38 y a marcadores de linaje. Además las células presentan una alta capacidad de proliferación y expansión *in vitro* (Flores *et al.*, 2005).

En este mismo estudio se observó que la población de células humanas $CD34^+ CD38^- Lin^-$ tiene un mayor potencial de proliferación y de expansión que la $CD34^+ Lin^-$, debido a que la primera tiene mayor cantidad de células

primitivas. De hecho el porcentaje promedio de células positivas a CD34 en la primera población fue de 72.5% y de la segunda de 49.1% (Flores *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que se utilizaron distintas combinaciones de citocinas para ambas poblaciones, y la que resultó más eficiente fue: SCF, Flt3, TPO, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF y EPO (Flores *et al.*, 2005).

1.2.2 PLASTICIDAD A PARTIR DE CÉLULAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Existen pocos estudios de plasticidad que se hayan realizado a partir de sangre de cordón umbilical, algunos de ellos se describen a continuación:

El estudio del Xiao Peng T y colaboradores en el 2006, habla de una población de células mononucleares que son capaces de diferenciarse a hepatocitos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se observa en ambos casos la positividad en inmunohistoquímica para los marcadores hepáticos humanos alfafetoproteína y albúmina (Xiao *et al.*, 2006). Sin embargo, la población de origen es muy heterogénea, por lo que no queda claro a partir de qué células se lleva a cabo la diferenciación.

Por otro lado, el grupo de Christine J. Wong y colaboradores, en el 2010, utilizaron una población CD45 positiva, es decir necesariamente hematopoyética, y la cultivaron en un medio con FGF4, SCF y Flt3, cuyo efecto fue la expresión de los genes de pluripotencialidad Oct4 y Nanog. Con esto, las células podían bajo diferentes medios de cultivo, diferenciarse a distintos linajes: oligodendrocitos, células de Schwann, hueso, músculo y células endoteliales (Wong, Casper y Rogers, 2010). Es decir, se está induciendo la plasticidad con un paso de desprogramación previa, sin embargo no se sabe si las células pueden diferenciarse aún sin este paso previo, desprogramándose en respuesta al ambiente de inducción a diferenciación.

En nuestro laboratorio, se empezó a trabajar con una población más específica de células troncales y progenitoras hematopoyéticas, la población CD34⁺ CD38⁻ LIN⁻ y se observó *in vitro* - es decir descartando los efectos de las

interacciones celulares que se dan en un sistema *in vivo* y que pudieran enmascarar la plasticidad - la inducción de estas células hacia el linaje neural modificando únicamente el medio de cultivo y utilizando uno que se conoce induce neurogénesis a partir de células troncales neurales (Flores, Mondragón y Mayani, manuscrito en preparación).

Se observó el cambio de estas células hacia la morfología neural y la expresión de marcadores neurales, así como una respuesta electrofisiológica de las células transformadas.

1.2.2.1 PLASTICIDAD DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS HACIA ADIPOCITOS

Así como en la plasticidad en general, hay una gran controversia en si las células hematopoyéticas son capaces de diferenciarse a adipocitos o si por el contrario se trata de monocitos y macrófagos que por sus características aparentan dicha diferenciación.

En el 2006, el grupo de Crossno J.T. realizó un ensayo *in vivo* con ratones GFP⁺ y observa que las células de médula ósea provenientes del donador injertan en el tejido adiposo, y presentan morfología de adipocito, y no sólo eso sino que cuando se alimenta a los ratones receptores con Roziglitazona, que se conoce causa un aumento en la producción de grasas y adipocitos, aumenta la cantidad de células GFP⁺ en el tejido adiposo con morfología adipocítica (Crossno *et al.*, 2006).

Sin embargo, un año más tarde, en la misma revista, Koh Y.J. y colaboradores, publican un artículo que contradice el estudio anterior, utilizando el mismo modelo, observan que las células GFP⁺ en el tejido adiposo son en realidad macrófagos, aún después de alimentar a los ratones con Roziglitazona y que la morfología adipocítica observada es debida a la acumulación de macrófagos en un solo sitio, haciendo que pareciera un solo adipocito unilocular (Koh *et al.*, 2007).

En ambos estudios se utilizó una población muy heterogénea, así que el grupo de Makio Ogawa, retoma esta historia en el 2009 y utiliza una población más homogénea de células hematopoyéticas, descartando todas las células mesenquimales y propone que lo observado por estos autores es producto de la diferenciación de células hematopoyéticas a adipocitos (Sera *et al.*, 2009).

Ellos utilizaron la población celular Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺ CD34⁻, que son las células troncales y progenitoras hematopoyéticas equivalentes en ratón, y llevaron a cabo el mismo modelo de trasplante que en los estudios anteriores. Observaron que en el tejido adiposo las células GFP⁺ son también positivas a marcadores de adipocitos como leptina y perilipina y algunas a F4/80 indicando la presencia de macrófagos (Sera *et al.*, 2009).

Posteriormente extraen la médula ósea del ratón receptor, descartan la fracción adherente (correspondiente a células estromales y macrófagos) y permanecen con la otra fracción de células GFP⁺ (hematopoyéticas). Estas las cultivaron en medio adipogénico y tuvieron como resultado células adherentes, positivas a rojo oleoso (tinción para lípidos que se utiliza regularmente para distinguir adipocitos) y a la expresión de genes adipogénicos (Sera *et al.*, 2009).

Hicieron un tercer experimento en el que células sin transplantar fueron cultivadas *in vitro* en condiciones adipogénicas y fueron positivas a rojo oleoso y a negro sudán, ambas tinciones para lípidos. Incluso se separa la fracción de monocitos-macrófagos y se observa que son específicamente éstas las células positivas para presencia de lípidos (Sera *et al.*, 2009), pero no se midió ningún otro marcador más específico en esta parte.

Propone al final que las células adipocíticas provienen de progenitores monocíticos, pues al aislarlos y cultivarlos bajo las condiciones descritas anteriormente, resultan positivos a rojo oleoso (Sera *et al.*, 2009).

En la primera parte del estudio, al ser un modelo *in vivo*, no se descartó la posibilidad de que hubiera un fenómeno de fusión o de microvesículas, modelos previamente descritos.

En esta segunda parte del trabajo, en el estudio *in vitro*, se observan características aparentemente adipogénicas pero no se miden estas mismas

características en células hematopoyéticas sin inducción a adipogénesis. Esto es importante debido a que existen células dentro de la fracción hematopoyética, como los macrófagos, que son las células que parecen jugar un papel importante en los tres estudios descritos anteriormente, y que presentan lípidos internos bajo ciertas condiciones (Hernández y Sastre, 1999; Li *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2013) y que incluso expresan genes que generalmente se aceptan como marcadores adipogénicos (Hutter *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2013).

Con todo lo anterior se observa que la controversia acerca de si las células hematopoyéticas se diferencian o no a adipocitos, queda sin resolver y más aún, no se conoce lo que sucede con una población de células humanas en estas mismas condiciones.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La plasticidad de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas es todavía un tema controvertido, el cual ha sido estudiado principalmente en modelos animales. La plasticidad de estas células provenientes de fuentes humanas, por su parte, es un fenómeno poco estudiado y que ha despertado gran interés por su potencial de aplicación en la clínica.

En el laboratorio de Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del IMSS, estudios *in vitro* han demostrado que una población celular proveniente de sangre de cordón umbilical humana y enriquecida en troncales y progenitoras hematopoyéticas, puede diferenciarse, bajo ciertas condiciones de cultivo, hacia el linaje neural (Flores, Mondragón y Mayani, manuscrito en preparación).

El uso de sangre de cordón umbilical para la obtención de dichas células, presenta una ventaja por la accesibilidad a la misma y porque las células responden de manera más eficiente en su proliferación y expansión de progenitores que otras fuentes.

En 2009, el grupo del Dr. Makio Ogawa, utilizando un modelo murino y basándose en la tinción con rojo oleoso y en la expresión de ciertos genes, propuso que el origen de los adipocitos es a partir de progenitores monocíticos, (Sera *et al.*, 2009). Sin embargo, dichos estudios dejan algunas dudas, pues al ser un modelo *in vivo*, no se puede descartar la posibilidad de que el linaje de monocitos y macrófagos presente características similares a adipocitos (presencia de lípidos) sin que realmente haya una estimulación adipogénica, como sucede en enfermedades como la aterosclerosis en donde los macrófagos presentan vacuolas de lípidos intracelulares.

Este grupo junto con los estudios de Koh y Crossno dejan ver que la interrogante acerca de la plasticidad de CTH hacia adipocitos no está resuelta, pues

los resultados observados pueden tratarse de observaciones en células monocíticas-macrofágicas. Por otra parte, tampoco se conoce si en un modelo *in vitro* de células troncales hematopoyéticas humanas se observaría el mismo fenómeno.

Por lo tanto, un aspecto relevante que debe ser analizado es el comportamiento biológico de las CTH y CPH bajo condiciones adipogénicas. De acuerdo a lo anterior, a través del presente estudio pretendemos responder las siguientes dos preguntas: ¿Qué efecto tendrá el cultivar a CTH y CPH humanas en condiciones adipogénicas sobre la proliferación y expansión de dichas células? y ¿es posible que en tales condiciones, las CTH puedan diferenciarse hacia adipocitos?

3. HIPÓTESIS

Bajo condiciones adipogénicas de cultivo *in vitro*, las células troncales y progenitoras hematopoyéticas humanas de sangre de cordón umbilical se desarrollarán hacia células que serán capaces de presentar la adquisición de lípidos y la expresión de genes adipogénicos.

4. OBJETIVOS

General

Determinar si una población enriquecida en células troncales hematopoyéticas humanas puede desarrollarse en cultivo bajo condiciones adipogénicas y generar células adipocíticas.

Particulares

- Obtener una fracción celular enriquecida en células troncales hematopoyéticas humanas (células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻).
- Observar la presencia o ausencia de células mesenquimales en la fracción de células mononucleares y en la de células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ de sangre de cordón umbilical.
- Evaluar la viabilidad de las células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ bajo condiciones adipogénicas y determinar el cambio en el número celular a lo largo del cultivo.
- Evaluar el potencial de expansión de las células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ bajo condiciones adipogénicas.
- Evaluar el potencial adipogénico de las células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ mediante la tinción de rojo oleoso y la expresión de genes representativos expresados por células adipocíticas.
- Observar la presencia de lípidos internos en la población de macrófagos mediante la tinción de rojo oleoso.

5. METODOLOGÍA

5.1 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Y OBTENCIÓN DE LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Las muestras se obtuvieron del área de Tococirugía del Hospital General de zona No.2-A Troncoso bajo el siguiente criterio de inclusión según el artículo previamente publicado (Novelo et al., 2008):

- Que el embarazo haya durado más de 36 semanas
- Qué las pacientes se encuentren sanas
- Que se encuentre entre la primera y segunda gesta
- Que el embarazo haya sido libre de incidentes
- Que las donadores se encuentren entre los 18 y 40 años de edad

Y bajo el siguiente criterio de exclusión según el mismo artículo:

- Complicaciones relacionadas al embarazo, desórdenes hematológicos incluyendo neoplasias y síndrome de insuficiencia de la médula ósea, desórdenes inmunológicos y metabólicos y en general antecedentes de enfermedades congénitas o hereditarias.
- Historia de los padres que incluya abuso de drogas o actividades sexuales de alto riesgo
- Tatuajes, perforaciones o transfusión sanguínea en un tiempo menor a un año antes del nacimiento.
- Presencia del virus de la hepatitis B o C en la madre
- Temperatura mayor a 37°C durante las 12 horas previas al nacimiento
- Infección
- Que se trate de un embarazo múltiple

Las muestras se tomaron con una bolsa para recolección de sangre (Industrias Plásticas Médicas S.A. de C.V.), con anticoagulante de citrato, fosfato y dextrosa (CPD), y se pinchó con la aguja en la vena del cordón dejando que la bolsa se llenara.

5.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Cada muestra se procesó de la siguiente manera, de acuerdo a lo previamente publicado en la tesis de doctorado de la Biol. Patricia Flores Guzmán en el 2006:

- Se colocaron en tubos de centrifugación 3 volúmenes de Ficoll-Paque® Plus (Pharmacia Biotech Uppsala, Suiza) y 4 volúmenes de sangre. Se centrifugaron los tubos durante 30 minutos a una velocidad de 1500 rpm.
- Se desechó el suero que se concentra en la parte superior del tubo, luego con una pipeta se tomó la fracción blanca en donde se encuentran las células mononucleares (CMN).
- Esa fracción se puso en un nuevo tubo de centrifugación con 2 a 3 volúmenes de PBS (Invitrogen™, Auckland NZ.) y se volvió a centrifugar 8 minutos a 1100 rpm.
- Se descartó el sobrenadante y se contaron las células que se concentraron en el botón de centrifugado con Diluyente de Turk (preparado con ácido acético al 1% de Productos Químicos Monterrey S.A. DE C.V. Y azul de metileno de Merck, Millipore, México). También se midió la viabilidad de las células con Azul de Tripano (Gibco® by Life Technologies, NY, EU.). Todo esto en una cámara de Neubauer.
- Se cultivaron las CMN en medio RPMI advance (Gibco® by Life Technologies, NY, EU.) con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco® by Life Technologies, NY, EU.), a una concentración de 10,000 células por mililitro en cajas Petri de 10 cm. de diámetro con un máximo de 10mL.

5.3 OBTENCIÓN DE LA POBLACIÓN CD34⁺ CD38⁻ LIN⁻

Se obtuvo la población celular basado en el procedimiento previamente publicado en la tesis de doctorado de la Biol. Patricia Flores Guzmán en el 2006:

- Se extrajeron las células mononucleares en cultivo del día anterior y se lavó la caja con PBS suavemente para sacar el mayor número de células sin despegar la capa de bacterias.
- La placa se procesó para el ensayo de colonias de fibroblastos que se describe más adelante.
- Se centrifugó la muestra extraída del cultivo 8 minutos a 1100 rpm.
- Se contaron las células y se midió su viabilidad como se describió anteriormente.
- Se realizó la selección negativa de las células con la columna magnética del sistema Stem SepTM (Stem Cell TechnologiesTM, Vancouver, Canadá).
- Se purgó con 3mL de PBS con la jeringa que viene junto con las columnas
- Se lavó con PBS con 10% de SFB hasta llenar 8mL de un tubo de centrifuga de 15mL
- Se dejaron las células en un mililitro de RPMI con 5% de SFB y se incubó 15 minutos con 100 μ L del coctel de anticuerpos (Stem SepTM de Stem Cell TechnologiesTM, Vancouver, Canadá) contra los antígenos CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD36, CD38, CD45RA, CD56 y CD66B de células hematopoyéticas humanas. Estos anticuerpos están conjugados y reconocen a su vez las partículas de hierro dextrano.
- Se incubaron 15 minutos más con 60 μ L del coloide magnético (Stem SepTM de Stem Cell TechnologiesTM, Vancouver, Canadá) de partículas de hierro dextrano.
- Se pasó la muestra por la columna magnética con un máximo de 130×10^6 de CMN y se recibieron las células en un tubo de centrifugación de 15mL.
- Se lavó la columna con PBS al 10% de SFB hasta llenar 8 mL del tubo.

- Se centrifugó la muestra obtenida 8 minutos a 1100 rpm.
- Se contó y se midió su viabilidad como se describió anteriormente.
- Se cultivaron las células según los protocolos de cultivo que se describen más adelante.
- Se obtuvo una pureza aproximada del 70% de células CD34⁺

5.4 ENSAYOS DE COLONIA DE FIBROBLASTOS

La metodología está basada en el artículo previamente reportado por el Dr. Juan José Montesinos (Montesinos JJ, *et al.* 2009):

- Se tomó la placa de CMN cultivadas un día antes, para tomar en cuenta sólo las células de la fracción adherente ya que las células mesenquimales pertenecen a esa fracción
- Se le puso medio DMEM bajo en glucosa (Gibco® by Life technologies, Invitrogen™, Auckland NZ) con 15% de SFB hasta 10 mL.
- Se le hizo un cambio de medio cada 3 ó 4 días, resuspendiendo muy suavemente con la pipeta para evitar que cualquier célula se despegara.
- Al día 14 se retiró todo el medio, se dejó secar la placa y se tiñó con Wright-Giemsa (Golden Bell^{MR} Reactivos, México) para hacer evidente la formación de colonias de fibroblastos.
- Se hizo lo mismo con la fracción adherente de las células después de la selección negativa (post-columna).

5.5 PROTOCOLOS DE CULTIVO

Las condiciones de cultivo utilizadas fueron:

- Medio hematopoyético: Medio StemSpan (Stem Cell Technologies™, Vancouver Canadá) y siete citocinas hematopoyéticas recombinantes humanas con la característica de ser libres de componentes animales (Xenofree) (TPO, Flt3, SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF y G-CSF) (Preprotech,

E.U.) a una concentración de 10 ng/mL cada una. Las células se cultivaron a una concentración de 100,000 células / mL.

- Medio adipogénico: Medio DMEM bajo en glucosa con tres antibióticos, 15% SFB y los factores dexametasona, isobutylmetilxantina, indometacina (Gibco ® by Life Technologies) e insulina (Millipore). Las células se cultivaron a una concentración de 190,000 células / mL.
- Medio con suero: RPMI con 15% SFB con un cambio de medio al cuarto día a RPMI con 10% SFB. Se cultivaron a una concentración de 100,000 células / mL.

Las células se dividieron para ser cultivadas en uno de los cuatro protocolos de cultivo descritos a continuación, según el manuscrito en preparación de Flores-Guzmán, Mondragón-García y Mayani H, con la modificación de haber aumentado el protocolo de 2 fases que se explica más adelante.

- Protocolo de una fase: consistió en cultivar a las células recién obtenidas en condiciones adipogénicas, para ver el efecto de este medio en estas células desde el principio del cultivo.
- Protocolo de dos fases: Consistió en cultivar a las células recién obtenidas durante siete días en medio hematopoyético, para permitir un previo desarrollo de las mismas antes de la inducción adipogénica. Durante 28 días más las células se cultivan en medio adipogénico. Para el análisis de la fracción adherente, la primera fase se extendió a 14 días y durante siete días más se mantuvo el cultivo en condiciones adipogénicas.
- Protocolo de tres fases: Consistió en una primera fase de siete días en medio hematopoyético, la segunda fase, también de siete días, en medio con SFB, y la tercera fase en condiciones adipogénicas durante 28 días más para la fase no adherente y durante 7 días para la fase adherente. Se utiliza un protocolo con suero porque se ha visto que favorece la adherencia, sobrevivencia, proliferación y diferenciación celular. (Habich A, *et al.* 2006; Pedraza C, *et al.* 2008).

- Control: Células que durante todo el tiempo estuvieron cultivadas en medio hematopoyético.

La fracción no adherente se cultivó en base a los cuatro protocolos, para la fracción adherente, en cambio, no se tomó en cuenta el protocolo de una fase debido a la baja supervivencia de las células como se muestra en los resultados.

La fracción adherente se separó de la no adherente a partir del día 14, ya que es el tiempo en que hay mayor número de células adheridas en cualquiera de los protocolos.

Para todos los protocolos, se hizo un cambio de medio cada siete días, ya sea que se cultivara en el mismo tipo de medio o en un medio distinto, dependiendo del protocolo. En cada uno de estos puntos se contó el número de células, se midió la viabilidad y se sembró un ensayo de colonias de progenitores hematopoyéticos.

5.6 ENSAYOS DE COLONIAS DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Los ensayos fueron realizados de acuerdo al procedimiento previamente publicado en la tesis de doctorado de la Biol. Patricia Flores Guzmán en el 2006.

- Se sembró un número determinado de células (ver tabla 1) en 1mL de metil-celulosa (Stem Cell Technologies™, Vancouver, Canadá) en un tubo eppendorf de 1.5mL.
- Se pasó el tubo por el vortex (VWR Scientific Products Mini Vortexer, E.U.) para permitir que las células se distribuyeran en la metil-celulosa.
- Se sembró en un pozo de una placa de 24 pozos.
- Se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 14 días
- Se observó y contó en el microscopio las colonias resultantes.

Tabla 1 Número de células sembradas para el ensayo de colonias de progenitores hematopoyéticos.

Día	Número de células sembradas
CMN (antes de la inmunoselección)	10,000
0	1,000
7	1,000
14	2,000
21	2,300
28	2,500
35	2,700
42	3,000

Se aumenta el número de células sembradas con el tiempo debido a que el número de progenitores va disminuyendo a lo largo del cultivo.

5.7 TINCIÓN CON ROJO OLEOSO

En todos los protocolos de cultivo, cada siete días durante las resiembras de las células, se hicieron laminillas de la fracción celular no adherente en el Cytospin (Cytopro™ Wescor, E.U.) con aproximadamente 40,000 células cada laminilla. Posterior a la tinción, se contó en el microscopio óptico el número de células positivas a rojo oleoso con respecto a las negativas para obtener el porcentaje.

Para la fracción adherente se utilizó la placa de cultivo después de los siete, catorce, veintiún y veintiocho días de exposición a medio adipogénico, en el protocolo de tres fases descrito anteriormente, con el fin de observar si había diferencia en el porcentaje de células teñidas con rojo oleoso.

Se contó el número de células adheridas en los mismos días de exposición a medio adipogénico y a partir de ello los cultivos fueron acortados a veintiún días, con siete días de exposición a medio adipogénico en el caso del protocolo de dos fases y de tres fases. El protocolo de una fase no se hizo con células adherentes.

La técnica de tinción de rojo oleoso ha sido publicada previamente en distintos artículos, un ejemplo es el de Yu G, et al. 2011, y la técnica descrita a continuación es similar a la reportada en este artículo, con algunas modificaciones resultantes de la estandarización.

- Para ambas fracciones (adherente y no adherente) se puso paraformaldehído (JT BAKER®) al 10% hasta cubrir la superficie y se dejó por 10 minutos para fijar a las células, luego se retiró el exceso.
- En los días posteriores se procedió a hacer la tinción colocando propelin glicol (JT BAKER®) absoluto durante 5 minutos.
- Se observó al microscopio para ver si los cristales formados por el paraformaldehído se diluían, si no, se dejó más tiempo el propelin glicol absoluto.
- Se retiró el propelin glicol absoluto y se colocó la solución preparada de rojo oleoso recién filtrada en la placa o en un vaso Koplín para colocar ahí las laminillas.
- Se incubó durante 30 minutos a 60°C
- Se lavó con propelin glicol al 85%
- Se contó el porcentaje de células positivas a rojo oleoso

5.8 PCR EN TIEMPO REAL

5.8.1. EXTRACCIÓN DEL RNA

Se realizó la extracción del RNA de las células CD34⁺ CD38⁻ LIN⁻ antes de cultivar (D0), de las cultivadas al día 21, adherentes (Adh) y no adherentes (NA) tanto de la condición control (CT) como del protocolo de tres fases (3F). También se hizo la extracción de RNA de adipocitos diferenciados a partir de células mesenquimales con el mismo medio adipogénico que se utiliza para todos los demás ensayos.

Esto se hizo con los kits de extracción Quiagen RNeasy® PLUS Mini Kit (Hilden, Alemania) (para 500,000 células o más) y RNeasy® PLUS Micro Kit

(Hilden, Alemania) (para 499,999 células o menos) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor:

Para 500,000 células o más:

- Se centrifugaron las células en un tubo eppendorf de 1.5mL a 1100rpm durante 9 minutos para obtener el botón celular.
- Se retiró dentro de lo posible, la mayor parte del sobrenadante, se agregaron 350µl de Buffer RLT Plus y se disolvió el contenido con ayuda del Vortex durante un minuto.
- Se transfirió el lisado a una columna eliminadora de DNA y se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm.
- Se le agregaron 350µl de etanol al 70%, se transfirieron los 700 µL de la muestra a una columna de extracción RNeasy y se centrifugó 15 segundos a 10,000rpm.
- Se descartó el líquido que sale de la columna o flujo y se agregaron 700 µL del buffer RW1. Se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm.
- Se descartó el flujo, se agregaron 500 µL del Buffer RPE y se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm. Se repitió este paso centrifugando durante 2 minutos.
- Se puso la columna en un tubo colector de 1.5mL, se agregaron 50 µL de agua libre de RNasas y se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm.
- Se guardó el RNA a -20°C disuelto en el agua

Para menos de 500,000 células:

- Las células adheridas se despegaron de las placas de cultivo utilizando Tripsina (Gibco® by Life Technologies, NY, EU.) al 10% quitando previamente el medio y lavando la placa suavemente con PBS.
- Tanto las células adherentes como las no adherentes se centrifugaron en un tubo eppendorf de 1.5mL a 1100rpm durante 9 minutos para obtener el botón celular.

- Se retiró dentro de lo posible, la mayor parte del sobrenadante, se agregaron 350µl de Buffer RLT Plus y se disolvió el contenido con ayuda del Vortex durante un minuto.
- Se transfirió el lisado a una columna eliminadora de DNA y se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm.
- Se le agregaron 350µl de etanol al 70%, se transfirieron los 700 µL de la muestra a una columna de extracción RNeasy y se centrifugó 15 segundos a 10,000rpm.
- Se descartó el líquido que sale de la columna o flujo y se agregaron 700 µL del buffer RW1. Se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm.
- Se descartó el flujo, se agregaron 500 µL del Buffer RPE y se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm.
- Se descartó el flujo, se agregaron 500 µL de etanol al 80% y se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm.
- Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm para descartar cualquier residuo aún presente en la columna.
- Se puso la columna en un tubo colector de 1.5mL, se agregaron 15 µL de agua libre de RNasas y se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm.
- Se guardó el RNA a -20°C disuelto en el agua

Posterior a la extracción se midió la cantidad de RNA utilizando un sistema espectrofotométrico de microvolúmenes (Epoch BioTek®).

Para ver la integridad del RNA se realizó un gel de agarosa (Invitrogen™, Auckland NZ.) al 2% y se corrió el RNA marcado con SybrGold (Invitrogen™, Auckland NZ.). Se aprobó la muestra como íntegra si se observaba en el gel las bandas 18S y 28S del RNA.

5.8.2. PRODUCCIÓN DE cDNA

Para obtener el cDNA a partir del RNA de las muestras, se utilizó un kit de retrotranscripción (High Capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems, Foster City CA. E.U) y se prepararon las reacciones según las instrucciones proporcionadas por el proveedor, de la siguiente manera:

- Para cada reacción se utilizaron los siguientes reactivos:
 - 2 μ L del Buffer RT
 - 0.8 μ L de dNTP Mix
 - 2 μ L de Random Primers RT
 - 1 μ L de Multiscribe Reverse Transcriptase
 - 4.2 μ L de Agua libre de nucleasas
- Se programó la reacción en el termociclador (Bio-Rad C1000 Thermal Cycler) con los siguientes pasos:
 - 10 minutos a 25°C
 - 120 minutos a 37°C
 - 5 minutos a 85°C
 - Enfriar hasta alcanzar los 4°C
- Se almacenó el cDNA a 4°C hasta su uso.

5.8.3. qRT-PCR

Se realizó un ensayo a diferentes diluciones para ver la sensibilidad del equipo y ya que se tenía un número pequeño de células en algunas condiciones, se calculó 3.7 ng como concentración estándar de RNA para utilizar en todas las reacciones, en base a la cantidad mínima disponible en las muestras.

Las reacciones para la PCR en tiempo real fueron preparadas en placas especiales de 96 pozos para ser leídas y procesadas en el termociclador LightCycler® 480 II de Roche Applied Science. El procedimiento fue realizado según las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

Se utilizaron los siguientes primers y sondas que fueron adquiridos por Roche Applied Science (Amplibio S.A. de C.V.):

Tabla 2. Primers y sondas utilizados para la reacción de PCR en tiempo real

NOMBRE	SONDA*	Secuencia 5'---->3'
LPL	25	atgtggcccggtttatca
		ctgtatcccaagagatggacatt
PPAR γ 2	14	tccatgctgttatgggtgaa
		tgtgtcaaccaatggtcatttc
GAPDH	60	agccacatcgctcagacac
		gcccaatacgaccaaatcc

Los genes LPL y PPAR γ 2 fueron utilizados como indicios de adipogénesis y el gen GAPDH se utilizó como gen de referencia. *Número según el catálogo de Roche.

Se utilizaron los primers mostrados que son para genes que funcionan como marcadores de la diferenciación adipogénica (Schutze N, *et al.* 2005)

- Para cada reacción se utilizaron los siguientes reactivos:
 - 5.2 μ L de Light Cyclor 480 Probes Master Mix
 - 0.2 μ L de la sonda
 - 0.2 μ L de los dos primers.
 - 3.7ng de la muestra de RNA (se calculó el volumen para cada reacción)
 - Se aforó a 10 μ L con agua grado PCR
- Se programó la reacción en el termociclador con los siguientes pasos:

Tabla 3. Programa de ciclos y temperaturas

Nombre	Ciclos	Tiempo	Temperatura(°C)
Pre-incubación	1	5 minutos	95
Amplificación	1	10 segundos	95
	65*	30 segundos	60
	1	1 segundo	72
Enfriamiento	1	10 segundos	40

Se describe el número de ciclos, el tiempo de duración de los mismos y la temperatura en cada fase de la PCR. *El programa normalmente sugiere 45 ciclos pero en este caso se aumentó este número por baja concentración de RNA.

5.9. SEPARACIÓN POR EL MARCADOR CD163

El CD163 es un receptor del grupo B de la superfamilia de receptores barredores o scavenger ricos en cisteínas (SRCR por sus siglas en inglés), los cuales son receptores exclusivos de células del sistema inmunológico, debido a su función de reconocer y depurar agentes extraños. Este marcador se encuentra presente en macrófagos maduros o residentes de tejidos como el pulmón o el bazo (Van den Heuvel *et al.*, 1999). Se utilizó este anticuerpo para este estudio debido a que es considerado un buen marcador de separación de macrófagos, enfocándose en la fracción más madura, y descartando la mayor parte de los progenitores monocíticos más tempranos.

Se procesó la muestra de sangre de cordón umbilical como se describe anteriormente. Se utilizó el anticuerpo CD163 (BD Pharmigen™ E.U), de ratón anti-humano, conjugado con ficoeritrina, para sortear por citometría de flujo en base a las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

- Se separó un millón de células mononucleares las cuales se diluyeron en PBS con 2-3% de SFB con 1mM de EDTA y se incubaron con 4 μ l del anticuerpo CD163 durante 30 minutos en oscuridad y a 4°C.
- Se centrifugó a 2500rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante, se agregó 1mL de PBS a cada tubo
- Se utilizó el citómetro Facs Aria de BD con el software de Facs Diva v6.1 para separar la población CD163⁺ representando a una población enriquecida en monocitos y macrófagos. La población CD163⁻ también se obtuvo.
- Se cultivaron ambas poblaciones bajo el protocolo de tres fases y bajo el protocolo de control.
- Se realizó la tinción con Rojo Oleoso

5.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las gráficas de viabilidad, número de células y número relativo de progenitores, se realizó la regresión lineal de cada protocolo para ver si había diferencias significativas con la prueba de ANOVA y posteriormente observar la tendencia de cada línea calculando el valor de su pendiente.

Se realizó la prueba de ANOVA con la subsiguiente prueba Tukey para todos los datos, considerando significativo el valor de $p < 0.05$.

Para las poblaciones CD163⁺ y CD163⁻ se realizó una t de student por ser una comparación uno a uno, considerando significativa el valor de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE FIBROBLASTOS

Con el fin de asegurarnos de que ninguno de los resultados observados fuera producto de la presencia de células mesenquimales, se realizaron los ensayos de colonias de fibroblastos en varias muestras de sangre de cordón umbilical como se describe a continuación.

Se analizaron once muestras de células mononucleares de sangre de cordón umbilical para el ensayo de colonias formadoras de fibroblastos (UFC-F). No se observaron UFC-F en ninguna de las muestras, descartando la presencia de células mesenquimales y corroborando la baja frecuencia de muestras de sangre de cordón umbilical que contienen CTMs (Fig. 1a). Así mismo se evaluó, mediante el mismo ensayo, a la población CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ de ocho muestras, igual que en el caso anterior, no se observó ninguna UFC-F (Fig. 1b). Como control positivo empleamos células mononucleares provenientes de médula ósea; como era de esperarse, se observó la presencia de números significativos de UFC-F (7 UFC-F/10⁶ CMN; Fig. 1c). Las fotografías se tomaron a simple vista directamente de los pozos y placas teñidas con Wright Giemsa ya que las colonias de fibroblastos pueden verse sin necesidad del microscopio. Se observaron todas las placas al microscopio óptico para confirmar la ausencia de células fibroblastoides.

En estudios previos del Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI, se reportó la frecuencia de células estromales mesenquimales en médula ósea, placenta y sangre de cordón umbilical. Se observó que el 100% de las muestras de médula ósea y placenta tienen células mesenquimales, a una frecuencia de 1 / 0.031 x 10⁶ y 1 / 8 x 10⁶ respectivamente, mientras que en sangre de cordón umbilical solo en 11 de 104 muestras se encontraron estas células y a una muy baja frecuencia (1 en 200.5 x 10⁶ células mononucleares; Montesinos J.J., *et al.* 2009). Otros estudios reportan resultados similares, encontrando células

mesenquimales en 1 de 15 muestras de sangre de cordón umbilical; es probable que en los casos en que se han encontrado células mesenquimales en esta fuente, dichas células provengan no de la sangre sino de la matriz del cordón, de donde se obtienen células mesenquimales a una frecuencia mucho más alta (8 de 8) (Zeddou M, *et al.* 2010) Estos datos apoyan lo observado en este experimento.

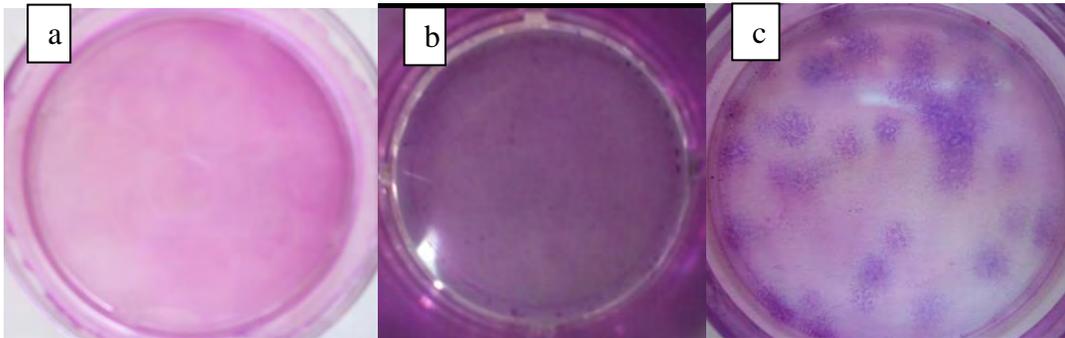


Figura 1. Ensayos de colonias de fibroblastos (UFC-F). a) CMN de sangre de cordón umbilical; no se observó la presencia de UFC-F en ninguna de las placas. b) Población enriquecida $CD34^+ CD38^- Lin^-$; no se observó la presencia de UFC-F en ninguno de los pozos. C) Control positivo de células mononucleares provenientes de médula ósea; se observan UFC-F a simple vista.

6.2 OBTENCIÓN DE LA POBLACIÓN CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻

Se obtuvo la población CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻, y se midió el porcentaje de recuperación, es decir cuántas células se obtuvieron en relación con la cantidad de células que pasaron por la inmunoselección; así como de enriquecimiento en veces, es decir, cuántas veces aumentó la frecuencia de unidades formadoras de colonias (progenitores) después de la inmunoselección.

Se observó un porcentaje de recuperación que va conforme a la frecuencia de células troncales presentes en sangre de cordón umbilical (Flores Guzmán P. 2006). También se observó que después de la inmunoselección, la frecuencia de progenitores aumenta por lo que hay un enriquecimiento en células primitivas a partir de células mononucleares. Los datos coinciden con los previamente publicados por Flores P. *et al.* 2005 para la misma población celular. (Tabla 4 y 5). Con esto se determinó que se trabajó con la misma población previamente caracterizada.

Tabla 4. Recuperación celular y enriquecimiento en células primitivas después de la inmunoselección de células de sangre de cordón umbilical

	Este estudio		Flores P. <i>et al.</i> 2005	
	CMN	Seleccionadas	CMN	Seleccionadas
Células totales (% del número inicial)	100	0.36 ± 0.14	100	0.4 ± 0.5
UFC (% de células totales)	0.47±0.29	6.25 ± 4.03	0.4 ± 0.5	4.2 ± 3.2
UFC (veces de enriquecimiento)	1	15.09 ± 8.08	1	17.98 ± 13.37

Las células seleccionadas corresponden a la población enriquecida en células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ obtenida después de la selección inmunomagnética a partir de células mononucleares (CMN) de sangre de cordón umbilical. UFC: Unidades formadoras de colonias.

6.3 CINÉTICA DE CAMBIOS EN EL NÚMERO CELULAR, VIABILIDAD Y EXPANSIÓN EN CONDICIONES ADIPOGÉNICAS

Se observó el comportamiento de las células a lo largo de los cultivos a partir de sus cambios en viabilidad, número celular y expansión de progenitores hematopoyéticos para comparar las células desarrolladas en el efecto del medio adipogénico con respecto a las desarrolladas en medio hematopoyético y ver si es o no favorable el cambio de medio en cualquiera de estos aspectos.

Se analizaron nueve muestras mediante los cuatro protocolos descritos previamente en la metodología. En la Figura 2 se observaron los cambios en la viabilidad celular a lo largo del cultivo y en la Figura 3 los cambios en el número de células viables en cada uno de los distintos protocolos.

En cuanto a la viabilidad, se observó en los cuatro protocolos de cultivo que todas las pendientes (m) fueron negativas, lo cual quiere decir que la viabilidad de las células disminuyó con el tiempo de cultivo, independientemente del medio en el que se encontraran.

En el protocolo control se observó que la viabilidad fue disminuyendo paulatinamente; en el protocolo de una fase se observó que disminuye la viabilidad drásticamente desde los primeros días, como podemos ver en el valor de su pendiente, el cual es el menor de los cuatro protocolos. Asimismo se observa que estos dos protocolos son significativamente diferentes a los demás y entre sí.

Esto nos indica que las células hematopoyéticas muy primitivas no sobreviven en un medio adipogénico. En el protocolo de dos fases, se observó que la viabilidad disminuye con menor velocidad por lo que podemos ver que una vez que estas células fueron cultivadas en medio hematopoyético durante los primeros siete días, adquirieron una mayor capacidad de sobrevivencia, aún a pesar de que el medio adipogénico no parecía favorecerla. Sin embargo, sólo en el caso de una muestra de las nueve analizadas, las células sobrevivieron hasta el día 28 de cultivo adipogénico.

En el protocolo de tres fases se observó algo muy similar al de dos fases, con la diferencia de que en este protocolo las células tuvieron mayores posibilidades de llegar hasta el día 28 de cultivo adipogénico, lo que nos dice que la fase intermedia (el medio enriquecido en SFB) permite a las células sobrevivir por más tiempo.

En cuanto al número celular, fue significativo el aumento de las mismas en el protocolo control desde el día 7 y a lo largo de los días de cultivo, el valor de su pendiente siempre fue positivo. En cambio en el protocolo de una fase, el número celular disminuyó drásticamente desde los primeros días, lo cual junto con lo observado en la viabilidad, nos indica que el medio adipogénico no favoreció a las células primitivas. En el protocolo de dos fases observamos un valor positivo en la pendiente de los primeros días que es el tiempo en que las células se encontraban estimuladas por el medio hematopoyético, en cambio se volvió ligeramente negativa a partir de siete días que las células estuvieron en medio adipogénico. En el protocolo de tres fases se observó el mismo fenómeno.

Aparentemente la fase intermedia del medio enriquecido en SFB en el protocolo de tres fases, no determinó un cambio importante en el cultivo, al menos en la fracción no adherente, pues se observó la misma viabilidad y proliferación en ambos protocolos. En general se observó que la inducción a la fase de diferenciación afecta directamente a las células disminuyendo su viabilidad y el número de células en todos los casos. Por otro lado se observó también que fue necesaria una primera fase de inducción con medio hematopoyético para permitir que las células sobrevivieran por mayor tiempo, lo cual nos sugirió que son las células progenitoras y maduras las que tienen mayores posibilidades de sobrevivir al efecto del medio adipogénico y no las troncales.

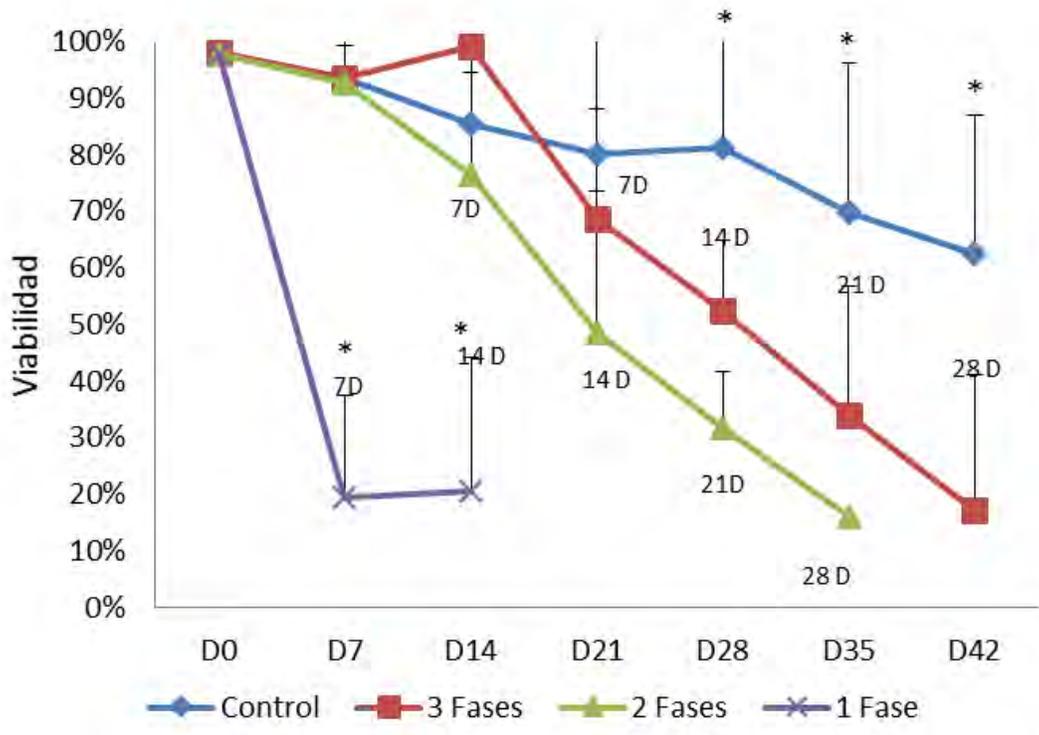


Figura 2. Viabilidad. Se mide la viabilidad en los cuatro protocolos de cultivo de células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻. La viabilidad en general disminuye dependientemente del tiempo de cultivo. Se ve mayormente afectada cuando se induce la diferenciación adipogénica en los tres protocolos. Existe diferencia significativa del protocolo de una fase y del protocolo control con respecto a los demás ($p < 0.05$ ANOVA, (Tukey)) y la tendencia de esta diferencia se observa en el valor de sus pendientes (m) según el cálculo de la regresión lineal. Control: $m = -0.81 \pm 0.08$; 1 Fase: $m = -5.53 \pm 3.29$; 2 Fases: $m = -2.53 \pm 0.21$; 3 Fases: $m = -2.08 \pm 0.28$. D: tiempo en días de inducción a diferenciación adipogénica (n=9).

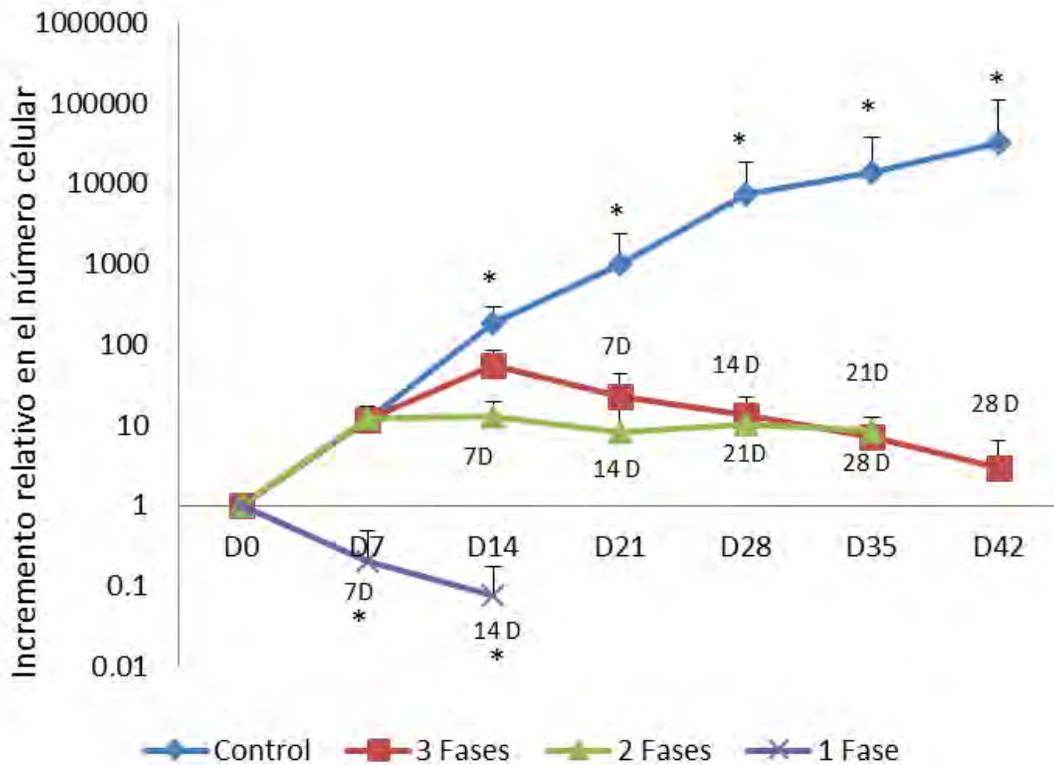


Figura 3. Cambios en el número celular. El número celular aumenta a lo largo del cultivo en el grupo control. En cambio en el protocolo de una fase las células disminuyen con respecto a los demás protocolos desde el día 7. El de dos fases, a partir del día siete no hay aumento y hay una ligera disminución. En el protocolo de 3 fases disminuye ligeramente desde la exposición a la fase de suero (D14) y disminuye drásticamente a partir del cambio a medio adipogénico (D21). Existe diferencia significativa en el protocolo control y el de 1 fase con respecto a los otros tres ($p < 0.05$ ANOVA, (Tukey)) y la tendencia de esta diferencia se observa en el valor de sus pendientes (m) según el cálculo de la regresión lineal. Control: $m = 672.5 \pm 1e^{6.2}$; 1 Fase: $m = -0.063 \pm 0.03$; 2 Fases: $m = 1.62$ (Día 0 al 14) y $m = -0.131 \pm 0.12$ (Día 14 al 42); 3 Fases: $m = 3.81 \pm 1.33$ (Día 0 al 14) $m = -0.942 \pm 0.13$ (Día 21 al 42); D: tiempo en días de inducción a diferenciación adipogénica; (n=9).

Se analizaron nueve muestras para cuantificar la cantidad de unidades formadoras de colonias (progenitores funcionales) en cada fase de cada protocolo. Se hizo la relación entre ese número y el número total de células en cultivo para obtener el número relativo de progenitores presentes en total (Figura 4).

El protocolo control mantuvo una pendiente positiva como lo muestra su valor (m) y fue significativamente mayor a los demás protocolos desde el día 7. A su vez, el protocolo de una fase, como se esperaba por lo observado en las gráficas anteriores, desde el principio decae. El protocolo de dos fases mantuvo una pendiente positiva hasta el día siete y después de eso, tuvo una pendiente negativa, denotando que el número de progenitores disminuye con la exposición al medio adipogénico.

El protocolo de tres fases tuvo un comportamiento similar, de hecho la fase intermedia enriquecida en SFB parece que también repercutió directamente sobre el número de progenitores, a pesar de que el número celular en esta fase, aumentó, sin embargo en este caso el número relativo de progenitores es significativamente mayor en el día 21 con respecto al de dos fases. Sin embargo, comparando el tiempo que llevan las células en medio adipogénico, el número de progenitores es el mismo.

En general, en los primeros siete días, en los casos en que las células se encontraban en medio hematopoyético, hubo una expansión en el número de progenitores, sin embargo, cuando el medio en el que se encontraban las células era adipogénico, aún si es desde el día cero o después de la fase hematopoyética, el número de progenitores disminuyó drásticamente.

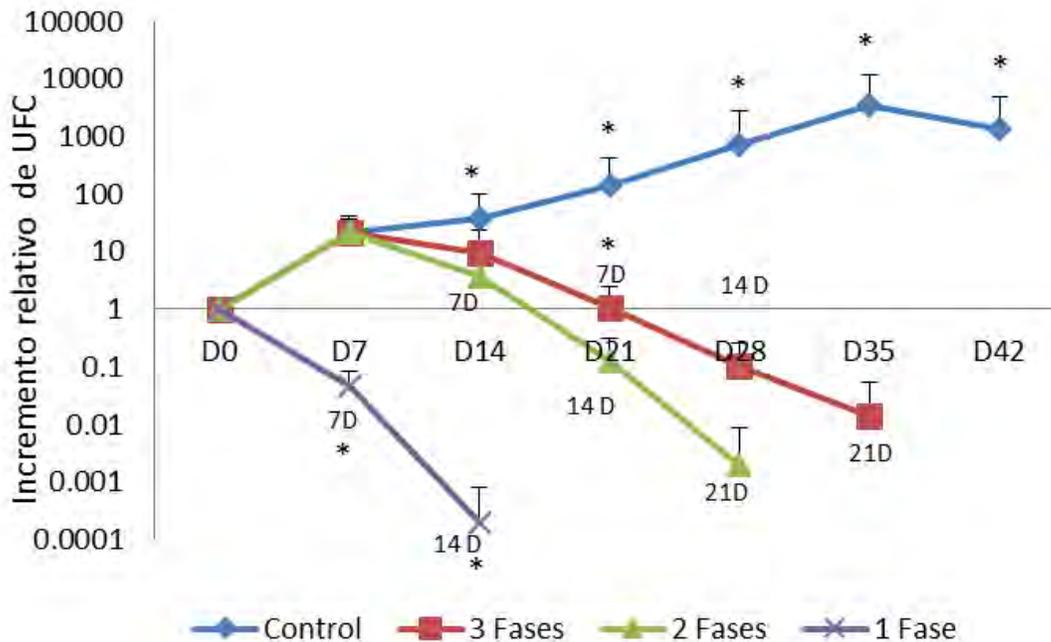


Figura 4. Incremento y disminución de progenitores a lo largo del tiempo de cultivo. Se observa un aumento en el número de progenitores a los 7 días de cultivo. A los 14 días se observa una drástica disminución en los tres grupos, el control en ese punto se conserva por arriba de los otros grupos, el protocolo de una fase disminuye significativamente con respecto a los demás protocolos desde el día 7, los protocolos de dos y de tres fases tienen una disminución en el número de progenitores desde el día 14. Existe diferencia significativa entre los cuatro protocolos ($p < 0.05$ ANOVA, (Tukey)) y la tendencia de esta diferencia se observa en el valor de sus pendientes (m) según el cálculo de su regresión lineal. Control: $m = 58.69 \pm 26.27$; 1 Fase: $m = -0.071 \pm 0.03$; 2 Fases: $m = 2.991$ (Día 0 al 7) y $m = -0.161 \pm 0.09$; 3 Fases: $m = 3.06$ (Día 0 al 7) y $m = -0.282 \pm 0.137$ (Día 14 al 42). D: tiempo en días de inducción a diferenciación adipogénica ($n=9$).

6.4 ANÁLISIS CON LA TINCIÓN DE ROJO OLEOSO

6.4.1 FRACCIÓN NO ADHERENTE

El rojo oleoso es una tinción para ver lípidos internos y es una de las tinciones predilectas para la identificación de adipocitos. Se realizó esta tinción con el fin de determinar si había células con lípidos internos en estos protocolos de cultivo.

Se contabilizó el porcentaje de células positivas a rojo oleoso. Se utilizó como control positivo células mesenquimales provenientes de médula ósea, cultivadas durante 14 días en el medio de diferenciación adipogénica. Las células adiposas positivas a rojo oleoso se muestran en la Figura 5A. El grupo de células hematopoyéticas en condiciones hematopoyéticas (grupo control) tuvo un mínimo porcentaje de células positivas a rojo oleoso y en los protocolos de diferenciación se observó un incremento de dicho porcentaje significativamente mayor a los 7 días con el protocolo de una fase, a los 14, 21 y 28 días con el de dos fases y a los 28 días con el de tres fases (Figura 6). Aparentemente el medio adipogénico tiene un ligero efecto en la presencia o ausencia de lípidos en las células de la fracción no adherente de los cultivos, sin embargo el mayor porcentaje que se alcanza no rebasa el 3%, a diferencia del 100% de células positivas en el control positivo.

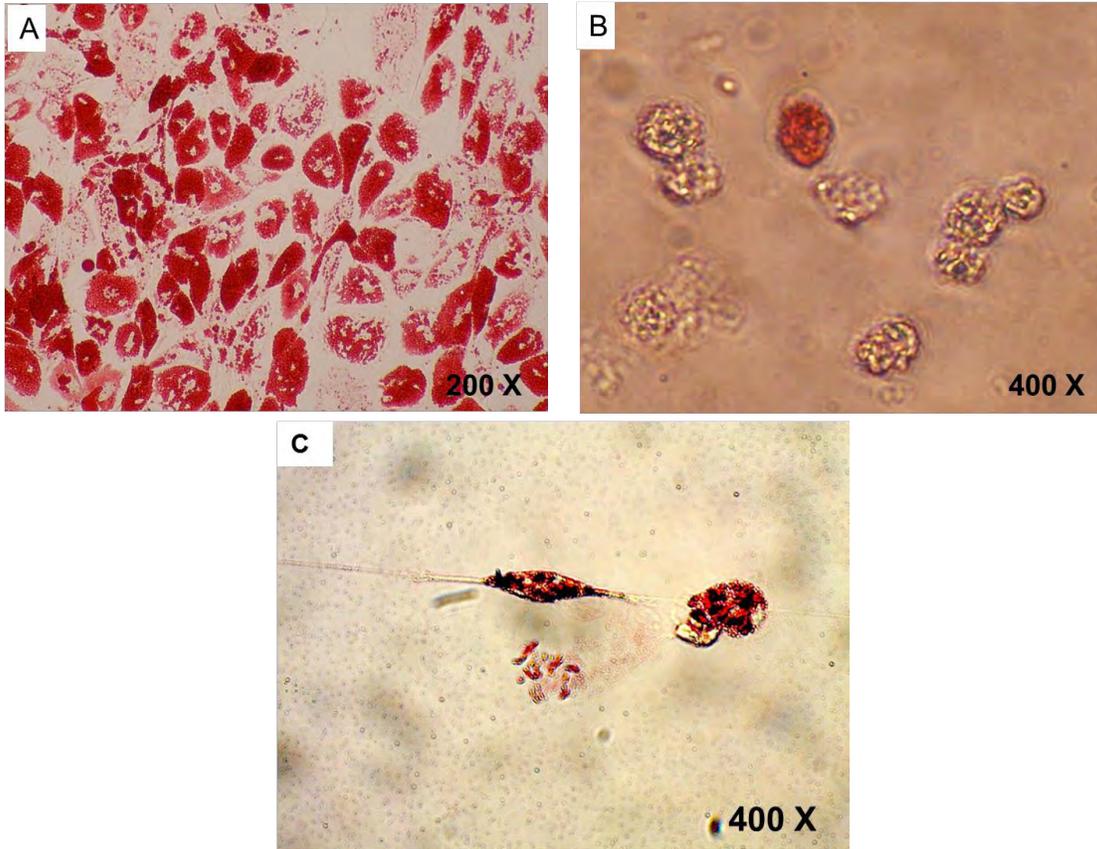


Figura 5. Tinción con rojo oleoso. A) CTM's diferenciadas a adipocitos teñidas con rojo oleoso. B) imagen representativa de las células hematopoyéticas en la fracción no adherente en cualquier fase y en cualquiera de los cuatro protocolos, la célula de color rojo es considerada positiva. C) Imagen representativa de las células hematopoyéticas en la fracción adherente en cualquiera de los cuatro protocolos, incluyendo el control.

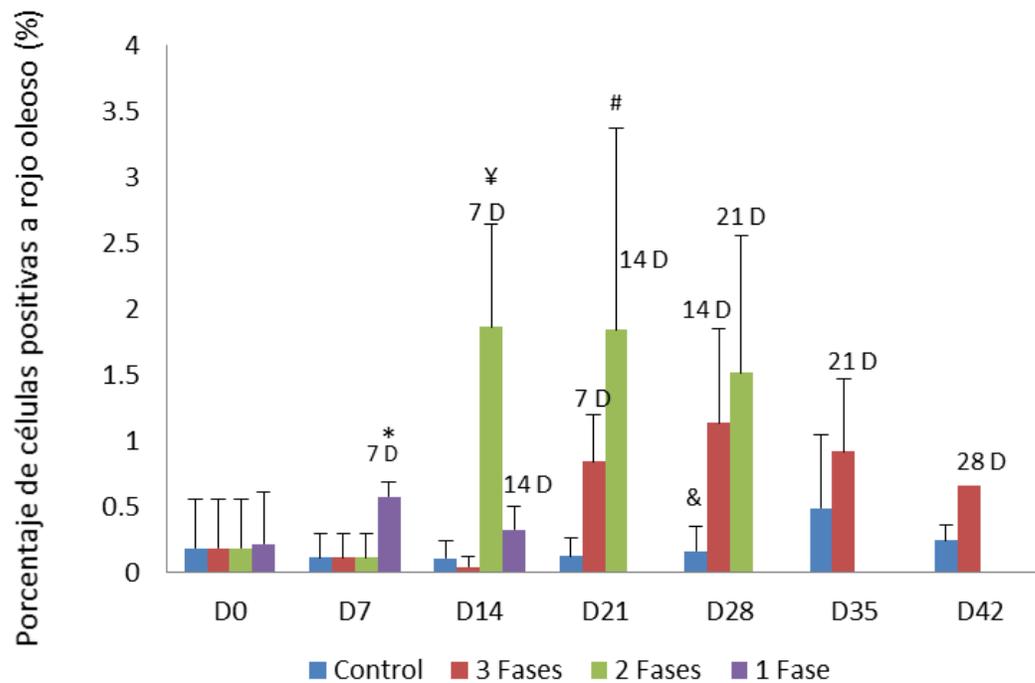


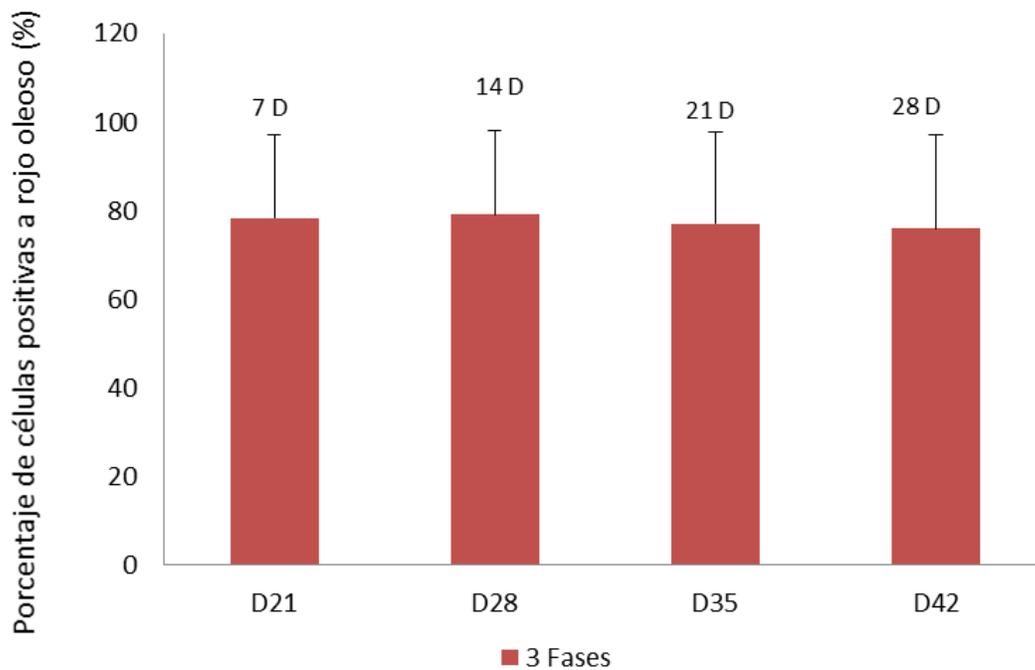
Figura 6. Porcentaje de células positivas a rojo oleoso en la fracción no adherente. El grupo control presenta una positividad basal de rojo oleoso. La frecuencia de positividad aumenta en los protocolos de diferenciación a partir del cambio a medio adipogénico. * = En el día 7 el protocolo de una fase es significativamente mayor a los demás. † = En el Día 14, el protocolo de dos fases es significativamente mayor a los demás en ese día. # = En el Día 21 hay una diferencia significativa entre el protocolo de dos fases y el control pero no contra el de tres fases. & = En el Día 28 el control presenta una diferencia significativa en el porcentaje de células positivas a rojo oleoso que en los otros dos protocolos; $p < 0.05$ ANOVA, (Tukey) D: días de diferenciación (n=9).

6.4.2 FRACCIÓN ADHERENTE

Se analizaron las células adheridas a partir del día 14 del cultivo en el protocolo de tres fases en tres muestras. Se observó que en este caso, la fase intermedia enriquecida en SFB, en la fracción adherente, a diferencia de la no adherente, si presentó un efecto, ya que aumentó el número de células que se adhirieron a la placa como se había reportado en artículos previos (Pedraza C, *et al.* 2008).

El porcentaje de células adheridas que resultan positivas a rojo oleoso fue mucho mayor con respecto a las células no adherentes desde el día 7 de cultivo en condiciones adipogénicas. En la Figura 7 podemos observar que además no hubo diferencia significativa en el porcentaje de células positivas a rojo oleoso entre diferentes tiempos de exposición de las células al medio adipogénico. También se observó que el número de células adheridas disminuye con el tiempo de cultivo en medio adipogénico como se muestra en la Figura 8. Aunque solo se cuantificó una sola muestra, la rápida disminución en la cantidad de células adheridas se observó en todas las muestras. Por lo anterior, se toma para los siguientes ensayos a las células hasta el día 21 de cultivo para estudiar la fracción adherente (con 7 días de la fase de medio adipogénico).

Con estos resultados es evidente que el medio adipogénico contrarresta los efectos de adherencia que el SFB les confiere a las células, y que las células comienzan a despegarse. También existe la posibilidad de que el pequeño porcentaje de células teñidas con rojo oleoso en la fracción no adherente haya sido resultado del desprendimiento de estas células de la fracción adherente, por ello habría una mayor tendencia de células positivas a rojo oleoso en la fracción no adherente de las células expuestas a medio adipogénico.



- **Figura 7: Porcentaje de células positivas a rojo oleoso en la fracción adherente durante la exposición a medio adipogénico en el cultivo de 3 fases.** Medido al día 7, 14, 21 y 28 de exposición a medio adipogénico posteriores a las dos primeras fases del protocolo de 3 fases. No hay diferencias significativas ($p > 0.05$ ANOVA (Tukey)) (n=3)

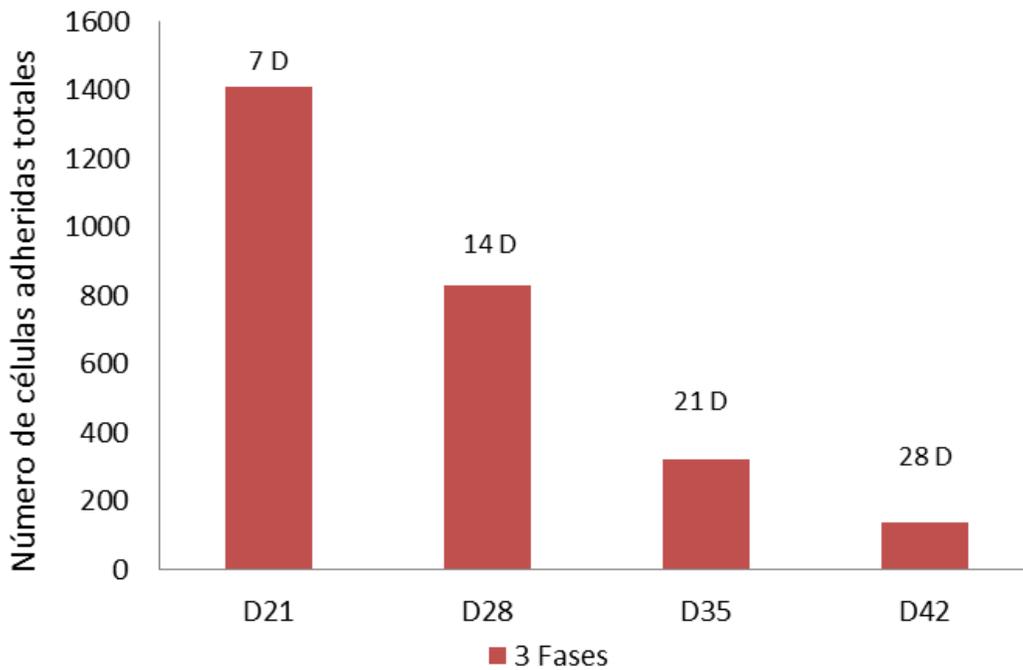


Figura 8: Número de células adheridas. Se observa que disminuye el número de células adheridas a la placa a partir de 190,000 células iniciales. Esto fue observado en el protocolo de 3 fases (n=1)

De manera interesante, se puede observar también que hay un alto porcentaje de tinción con rojo oleoso en las células del grupo control (Figura 9), sin embargo no hubo diferencia significativa en el porcentaje de células teñidas con respecto a los grupos con fases de diferenciación adipogénica, por el contrario, fue significativamente mayor el número absoluto de células teñidas con rojo oleoso en el grupo control (Figura 10).

Esto sugiere que el medio adipogénico estuvo despegando a las células de la placa, invariablemente si presentaban lípidos o no, pero existió una tendencia a que las células que quedaron adheridas, fueran positivas a rojo oleoso, y por ello el porcentaje fue mayor. En cambio en presencia de medio hematopoyético se observó que no se despegan tan frecuentemente las células, por lo que la tendencia marca que las células negativas a rojo oleoso permanecieron adheridas y el porcentaje de células positivas disminuyó pero la cantidad de células teñidas fue mucho mayor que en cualquiera de los otros protocolos.

Que el porcentaje no varíe significativamente pero si haya mayor número de células teñidas en el grupo control nos dice que el medio adipogénico no está favoreciendo la presencia de células con lípidos internos, este es un primer indicio de que en la fase adherente, a pesar del alto porcentaje de células positivas a rojo oleoso, no hay adipogénesis.

Por otro lado, las células con mayor capacidad de adherencia en una población de células hematopoyéticas son primordialmente los macrófagos (en muchos protocolos se separa a estas células por su adherencia, (Freeman B.E. 2008)), de hecho las células observadas, positivas a rojo oleoso, tienen una morfología macrofágica.

Esto nos dice que es probable que las células observadas positivas a rojo oleoso sean macrófagos que fagocitaron lípidos que pudieron haber obtenido de las células muertas presentes en el cultivo, como se muestra posteriormente.

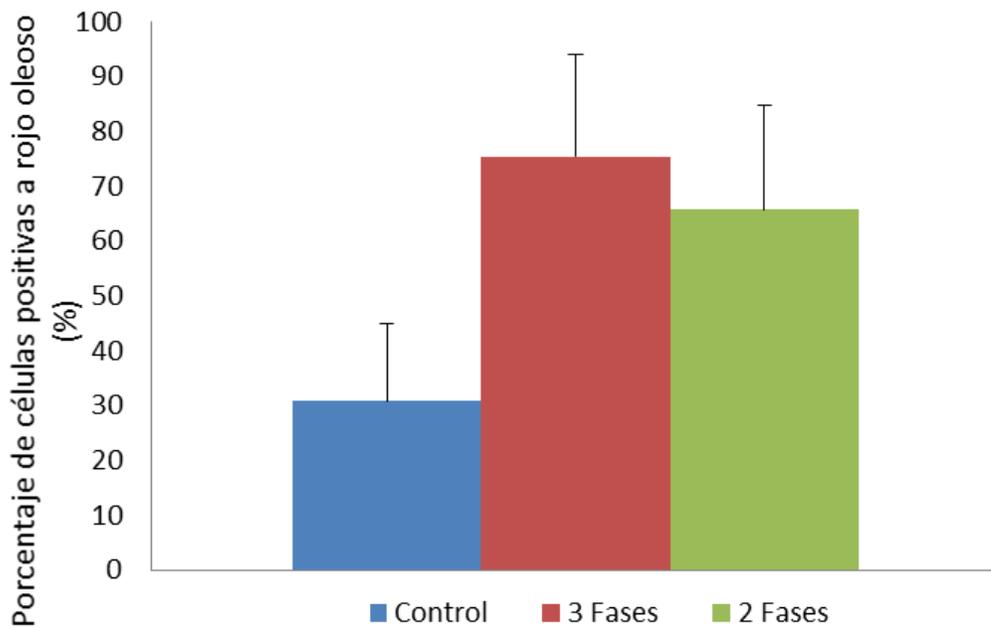


Figura 9. Porcentaje de células positivas a rojo oleoso en la fracción adherente en los tres protocolos. Día 21 de cultivo en los tres casos. se observa un menor porcentaje de células rojas en el grupo control que en el de dos y tres fases. No hay diferencia significativa entre los tres grupos ($p > 0.05$ ANOVA (Tukey)) (n=4).

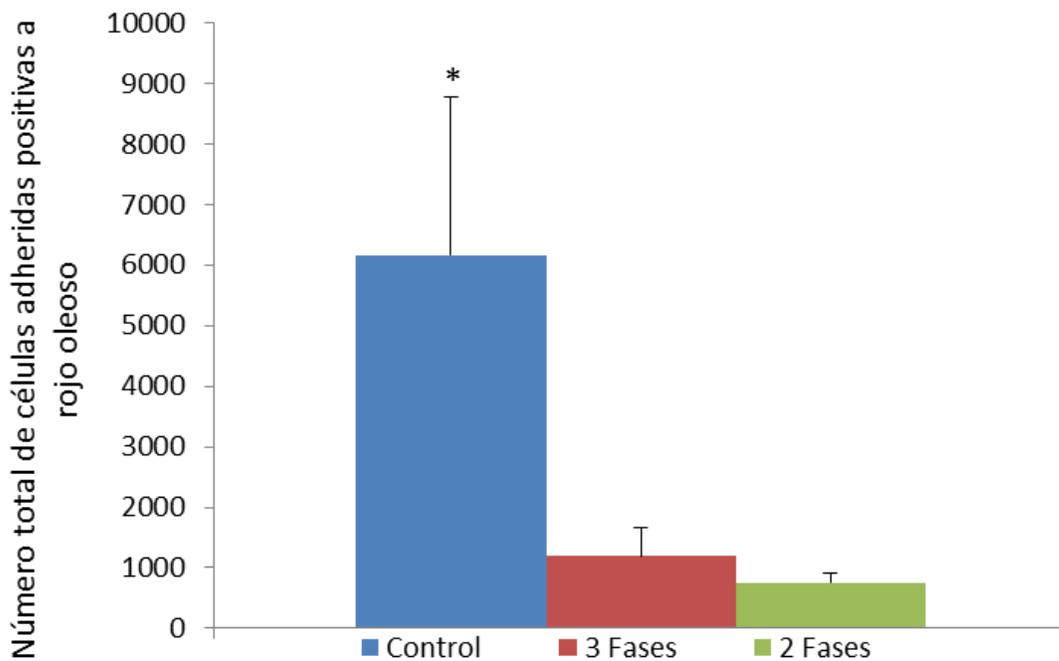


Figura 10. Número absoluto de células teñidas con rojo oleoso en la fracción adherente. Día 21 de cultivo en los tres casos. Se observa que el grupo control presenta significativamente un mayor número de células teñidas * = $p < 0.05$ ANOVA (Tukey) (n=4).

6.5 PCR EN TIEMPO REAL

Se realizó esta técnica con el fin de corroborar lo que se observó anteriormente con la tinción de rojo oleoso y ver si hay diferencias en la expresión de genes entre las células adipocíticas y hematopoyéticas y entre las que se cultivaron con el protocolo control y el de tres fases y finalmente descartar o confirmar la adipogénesis a partir de células hematopoyéticas.

Se midieron los genes PPAR γ 2 y LPL como referencia de genes altamente expresados en adipocitos (Schutze N, *et al.* 2005; Wang J., *et al.* 2013). El primero se seleccionó por ser un gen de expresión temprana y el segundo por ser un gen de expresión tardía.

Al tener pocas células adheridas al final del cultivo de tres fases (21 días), también se obtuvo poca cantidad de RNA, por lo que se estandarizó la concentración de RNA utilizada para la PCR en 3.7 ng (aunque la sensibilidad del equipo es mayor pero se utilizó la máxima concentración posible con base en la muestra de la que se obtuvo menor cantidad de RNA).

Los resultados se normalizaron con base en la expresión del gen de referencia (GAPDH). Como se observa en la Figura 11, las células al día cero (D0), es decir células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ sin cultivar, sólo expresaron el gen de referencia. A diferencia de esto, los demás grupos expresaron ambos genes PPAR γ 2 y LPL. Esto indica que la expresión de estos dos genes no se presenta en células primitivas, sino que se adquiere con la madurez de las mismas en el desarrollo del cultivo.

En el caso del gen LPL, presentó mayor expresión en todos los grupos que PPAR γ 2, y la expresión en el control positivo (adipocitos generados a partir de células mesenquimales) fue significativamente mayor que cualquiera de los otros grupos, sin embargo cabe destacar que sin importar si las células estuvieron bajo el protocolo control o el de tres fases, la expresión de LPL estuvo presente, y hay una mayor tendencia en la fracción adherente, en donde sabemos hay una población de macrófagos, los cuales se ha visto que expresan el gen LPL (Takahashi M., *et al.* 2013).

El gen PPAR γ 2, por su parte, también se expresó menos en los grupos de células hematopoyéticas que en el de adipocitos, pero cabe mencionar que se tuvo que ajustar el análisis, ya que en ningún caso, excepto en el control positivo, se observó una amplificación del gen en los tres pozos (cada muestra se corrió por triplicado) y esto es debido a que la cantidad de moléculas de RNA es tan pequeña que no alcanza a estar en todos los pozos, por lo que la expresión de PPAR γ 2 es casi nula en los grupos hematopoyéticos. Por dicho ajuste en el análisis, la estadística no muestra diferencia significativa de los grupos de células hematopoyéticas contra el control. Además la tendencia de la expresión de dicho gen es mayor en células que estuvieron durante todo el cultivo en condiciones hematopoyéticas, por lo que tampoco se puede hablar de que el medio adipogénico induzca la expresión de PPAR γ 2.

Algunas células hematopoyéticas expresan grupos de genes PPAR γ , aunque no estrictamente del subtipo 2, pero ésta puede ser la razón por la que se observa una baja expresión (Hutter S., *et al.* 2013). En conjunto, estos resultados sugieren que las células adherentes que se generan en el cultivo de tres fases, si bien, tiñen con rojo oleoso y expresan niveles significativos de los genes LPL y PPAR γ 2, no corresponden a adipocitos.

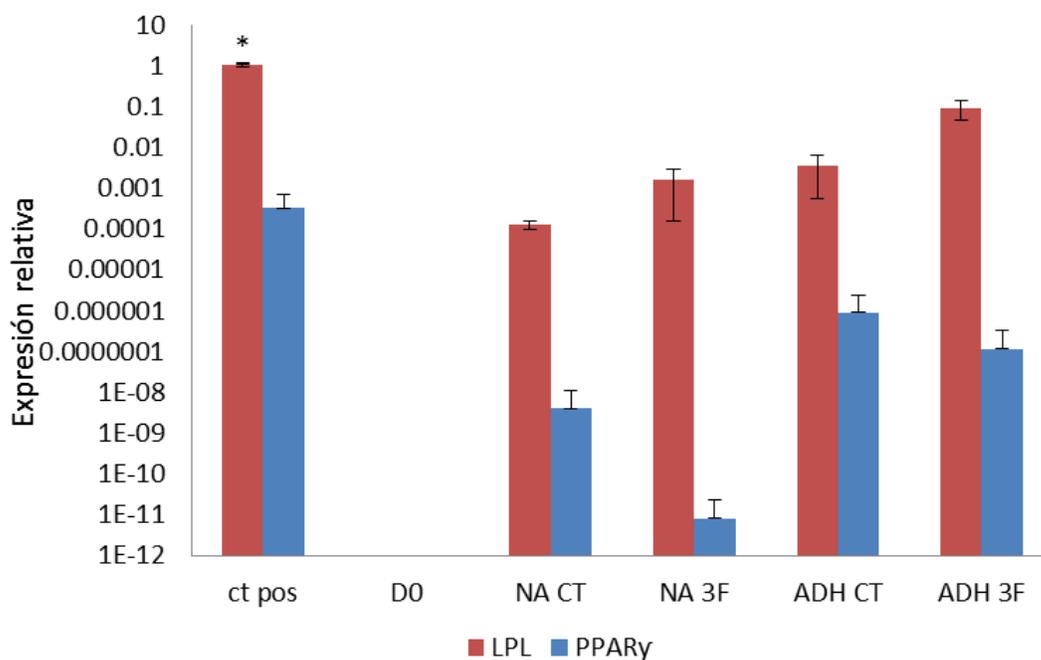


Figura 11. Expresión relativa de los genes LPL y PPAR γ 2. Se observa la expresión de ambos genes en el control positivo de células mesenquimales diferenciadas a adipocitos (ct pos), en las células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ antes de cultivar (D0), en las células no adherentes que estuvieron 21 días en condiciones hematopoyéticas (NA CT), en las células no adherentes que pasaron por el protocolo de tres fases (NA 3F), en las células adherentes en condiciones hematopoyéticas (ADH CT) y en las adherentes en protocolo de tres fases (ADH 3F) * = p<0.05 ANOVA (Tukey) (n=3).

6.6 CULTIVO DE CÉLULAS SEPARADAS EN BASE AL MARCADOR CD163

El marcador CD163 como se mencionó anteriormente, es una molécula específica de macrófagos que descarta de manera más estricta a progenitores monocíticos a diferencia de otros marcadores, permitiendo así observar si la tinción de rolo oleoso está directamente relacionada con la población de macrófagos o no.

Se separó por citometría de flujo a las células CD163⁺ y CD163⁻. Como se observa en las Figuras 16 y 17, las células positivas de la fracción adherente (macrófagos) fueron uniformes en su positividad a rojo oleoso, es decir no hubo diferencia significativa entre las células del protocolo control (cultivo en condiciones hematopoyéticas) y las del protocolo de tres fases. Las células adherentes en la fracción CD163⁻ parecen ser resultado de la diferenciación hacia monocitos-macrófagos a partir de las CTH y CPH presentes en dicha fracción al inicio del cultivo. Dicha población parece ser más heterogénea, presentando mayores variaciones en su comportamiento *in vitro*, lo que se puede ver en el tamaño de la desviación estándar.

Sólo hubo una diferencia significativa en el protocolo control entre ambas poblaciones, siendo que los macrófagos presentan un porcentaje mayor de células positivas a rojo oleoso.

En la fracción no adherente hubo menos células positivas a rojo oleoso, probablemente las células positivas se deban al desprendimiento de las mismas de la fracción adherente, fenómeno que se observó más en el protocolo de tres fases como se planteó anteriormente. Se volvió a observar un comportamiento similar en la fracción positiva por ser una población más homogénea.

Estos resultados apoyan la idea de que el fenómeno observado con el medio de inducción adipogénica se debe a macrófagos que adquieren lípidos durante el cultivo y no a células hematopoyéticas que se diferencian a adipocitos.

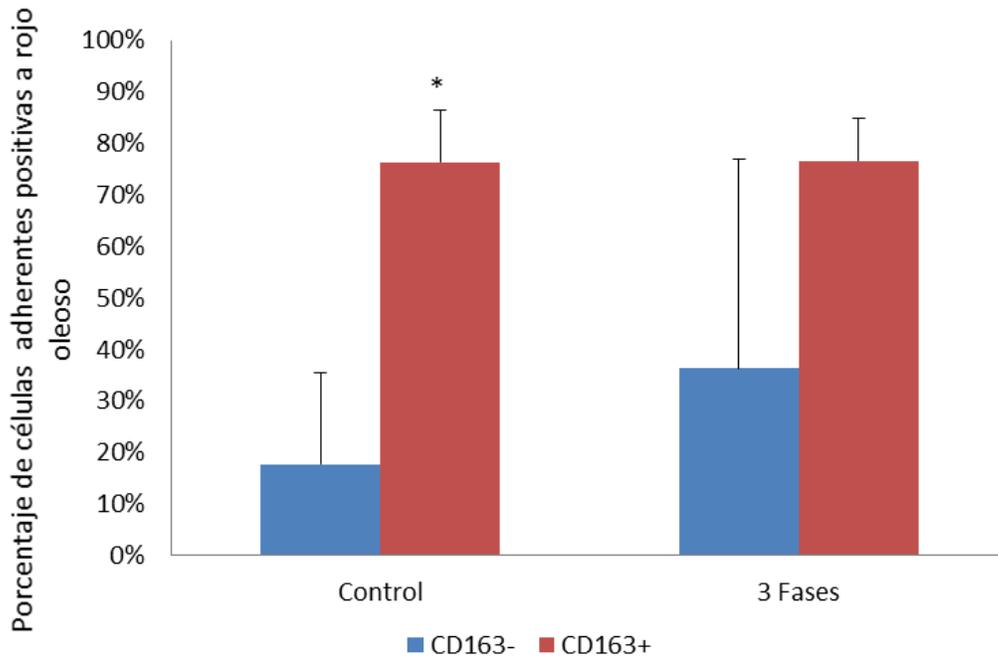


Figura 12. Porcentaje de células positivas a rojo oleoso de la fracción adherente de las células separadas por CD163. (n=3) Solo en el protocolo de control hay una diferencia significativa entre ambas poblaciones ($t(4) = 4.96; p < 0.05$).

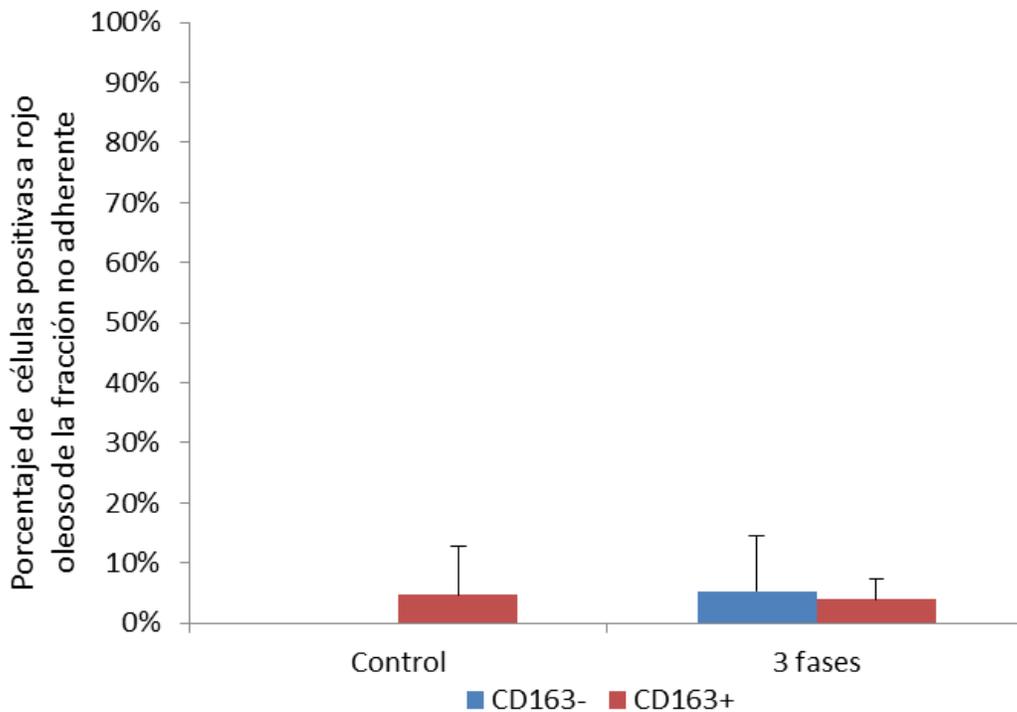


Figura 13. Porcentaje de células positivas a rojo oleoso de la fracción no adherente de las células separadas por CD163. (n=3). No hay diferencias significativas entre ningún grupo (ANOVA (Tukey) $p > 0.05$)

7. DISCUSIÓN

La existencia de la plasticidad, definida por Horwitz como la capacidad de una célula de diferenciarse a un tipo celular no esperado (es decir, distinto al que pertenece) (Horwitz, 2003), ha generado mucha controversia en los últimos 13 años, ya que, como se mencionó anteriormente en la introducción de este trabajo, existen diversos mecanismos alternativos a la misma (fusión celular, producción e intercambio de microvesículas y modificación artificial de la expresión de genes) (Poulsom et al., 2002; Horwitz, 2003; Quesenberry, Dooner y Aliotta, 2010). Dichos mecanismos alternativos parecen ocurrir de manera más común en condiciones *in vivo*, dada la complejidad estructural y funcional del sistema experimental.

En los estudios *in vivo* de plasticidad, generalmente se utilizan modelos de daño tisular, ya sea por radiación, por fármacos u otros mecanismos, para permitir el trasplante de las células hematopoyéticas, sin embargo esto genera la existencia de nuevas variables que no se pueden controlar y de las que se sabe poco, como en el caso del modelo de microvesículas propuesto por Quesenberry. Por ello es necesario utilizar un modelo sin que exista este tipo de daño para observar si el daño previo es necesario para que la célula presente plasticidad, como lo propusieron Almeida y Zanjani en el 2004.

Otro de los puntos principales que causan controversia en el tema de la plasticidad es el tipo celular que se utiliza. En diversos estudios se han empleado poblaciones heterogéneas, como por ejemplo células mononucleares de médula ósea o de sangre de cordón umbilical y esto no permite discernir si el fenómeno observado es consecuencia de una población hematopoyética o de otro tipo -como la población de células estromales mesenquimales- tampoco si sucede a partir de una población de células primitivas o maduras (Graf, 2002).

Con todos estos puntos en mente, decidimos llevar a cabo este estudio en el que empleamos un modelo *in vitro*, el cual está basado en un modelo desarrollado previamente en nuestro laboratorio para analizar la diferenciación de CTH hacia el linaje neural. Para este estudio nos enfocamos en determinar

de qué manera se modifican los patrones de diferenciación de las CTH hacia linajes no hematopoyéticos (en particular el adipocítico) al cambiar el medio de cultivo en el que se desarrollan dichas células. Por lo tanto, solo realizamos cambios en el medio de cultivo y no llevamos a cabo ningún tipo de manipulación directa de las células hematopoyéticas.

En este trabajo utilizamos una población enriquecida en células CTH y carente de células estromales mesenquimales. Todo esto nos permite descartar muchas de las variables que pueden generar confusión al momento de definir si lo que se está observando es consecuencia de la plasticidad.

El trabajo de Crossno y colaboradores (2006), muestra que a partir de un trasplante de células de médula ósea de ratón se generan adipocitos nuevos en el ratón receptor. Este trabajo no establece la población responsable del resultado observado y tampoco habla de plasticidad como tal. Dentro de la población celular de la médula ósea existe una gran proporción de células mesenquimales, por lo que no es de extrañarse que la diferenciación adipocítica observada se deba precisamente a esas células. La controversia se generó cuando Koh, al año siguiente, publica que lo que Crossno observa no es una diferenciación, sino la presencia de macrófagos provenientes del donador que se alojan en el tejido adiposo (Koh *et al.* 2007).

En 2009 Sera y colaboradores intentan resolver esta controversia y utilizan una población celular homogénea de CTH de ratón. Con sus observaciones llegaron a la conclusión de que los progenitores de macrófagos pueden diferenciarse en adipocitos.

El presente trabajo es, hasta donde nosotros sabemos, el primer estudio con células humanas en el que se explora la posible diferenciación de CTH hacia el linaje adipocítico. Este es un estudio comparativo entre células hematopoyéticas expuestas, bajo distintos protocolos, a un medio de diferenciación adipogénica, y el mismo tipo celular en condiciones hematopoyéticas. Nuestros resultados demuestran que no hay una diferencia

real en cuanto a las características que generalmente se utilizan para definir a una célula adipocítica, como la adquisición de lípidos, que se observa principalmente en la fracción adherente donde encontramos principalmente a los macrófagos, y la expresión de genes que se utilizan en muy diversos estudios para definir a los adipocitos.

El que los macrófagos presenten lípidos internos no es un concepto nuevo, este fenómeno se ha observado en ciertos sistemas o enfermedades, como la aterosclerosis, en la cual se acumulan gran cantidad de lípidos en la íntima (pared interna, de componente endotelial) de las arterias de mediano y grande calibre, principalmente lipoproteínas de muy baja densidad (LDL por sus siglas en inglés) causando una lesión (Hernández Rodríguez y Sastre Gallego, 1999).

Los macrófagos juegan un papel importante en esta enfermedad; cuando las partículas de LDL son oxidadas, aumenta la quimiotaxis y la adherencia de monocitos y linfocitos T, los primeros se activan y fagocitan los lípidos excesivos y forman lo que se conoce como células esponjosas. Además, secretan más citocinas quimioatrayentes que hacen que lleguen más macrófagos al sitio y haya más cantidad de células esponjosas. Cuando hay un número alto de estas células, forman una placa que obstruye el flujo sanguíneo, causando la enfermedad (Gropper, Smith y Groff, 2009).

Estudios *in vitro*, empleando un cultivo de macrófagos, han demostrado que éstos son capaces de fagocitar lípidos, por lo que presentan una tinción positiva para rojo oleoso (Takahashi *et al.*, 2013). De hecho la fagocitosis parece no ser el único mecanismo mediante el cual los macrófagos adquieren lípidos; en un cultivo en presencia de glucosa, en condiciones de hipoxia y en ausencia de lípidos externos, los macrófagos también resultan positivos a rojo oleoso, ya que aumenta la concentración del transportador de glucosa GLUT-3, por lo tanto aumenta la entrada de glucosa y en consecuencia la biosíntesis de triglicéridos internos. Cabe destacar que en este mismo estudio, la hipoxia exacerbó la cantidad de macrófagos teñidos con rojo oleoso, pero aún en condiciones de normoxia, se observan algunos macrófagos positivos (Li *et al.*, 2012). Aunque lo

anterior no muestra las mismas condiciones utilizadas en este estudio, sugiere posibles mecanismos a través de los cuales los macrófagos adquieren lípidos.

Con esto entonces, no se descarta la posibilidad de que los macrófagos observados en este estudio hayan sido capaces de generar sus propios lípidos internos, sin embargo es más probable que sea consecuencia de la fagocitosis ya que los cultivos tuvieron una baja concentración de glucosa, además de tener una fuente abundante de lípidos externos en las células muertas durante el cultivo.

De hecho, como se observa en el estudio de Takahashi *et al* de 2013, la expresión de LPL juega un papel importante en la fagocitosis de lípidos por parte de los macrófagos.

La LPL en macrófagos funciona como un puente entre los proteoglicanos y los receptores de lipoproteínas y permite la entrada de las mismas a las células. Además ayuda a digerir los lípidos de gran tamaño, permitiendo más fácilmente su fagocitosis (Takahashi *et al.*, 2013).

Este grupo desarrolló un ratón knockout de LPL que se expresa específicamente en macrófagos, y observó que en presencia de lípidos externos, las células no son positivas a rojo oleoso a diferencia del ratón que si presenta LPL. Además en el knockout se observó la disminución de genes de fagocitosis como CPT-1, lo que implica que la presencia de LPL está relacionada con la capacidad de fagocitar los lípidos presentes en el cultivo (Takahashi *et al.*, 2013).

En este estudio se muestra que hay expresión del gen LPL en las células que se desarrollaron en el cultivo pero no en las células troncales iniciales, aunque la expresión no se compara con la de los adipocitos, se puede inferir que durante el cultivo, dado que en la primera fase de los protocolos de diferenciación se utilizaron citocinas hematopoyéticas como GM-CSF, a partir de las células troncales hematopoyéticas se desarrollaron algunos macrófagos y estos pudieron comenzar a expresar LPL. De ser así, esto permitiría que fagocitaran los lípidos que tuvieron al alcance en el cultivo y explicaría lo observado con la tinción de rojo oleoso.

En cuanto a PPAR γ 2, se conoce muy poco acerca de su expresión en células hematopoyéticas. En este estudio, la expresión de dicho gen resultó tan baja que nunca se encontró en las tres repeticiones de una misma muestra. Sin embargo se sabe que los macrófagos, a través de la influencia de ciertas citocinas, como IL-4, se diferencian a través de PPAR γ a macrófagos M2 (subtipo con propiedades anti-inflamatorias). Esto también sucede durante la aterosclerosis (Hutter *et al.*, 2013). Una vez más parecen ser los macrófagos los responsables de lo observado en este estudio.

Por todo lo anterior, es importante que cuando se planeen estudios sobre plasticidad celular *in vitro*, se utilicen células que no presenten naturalmente propiedades que van a ser estudiadas y que son propias del linaje al que se van a diferenciar; por otro lado, hay que asegurarse que dentro de la población celular que se está estudiando, no existan células que de manera natural se diferencien al linaje al que se les está induciendo.

8. CONCLUSIONES

- En este sistema no se observa adipogénesis a partir de células troncales hematopoyéticas humanas provenientes de sangre de cordón umbilical. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que bajo otro sistema se compruebe la plasticidad de células hematopoyéticas hacia adipocitos.
- En este estudio se muestra que las formas en que generalmente se identifican a los adipocitos no son lo suficientemente específicas ya que las células cultivadas en condiciones adipogénicas presentan características similares a adipocitos y eso puede causar confusión en el tipo celular observado.
- No se descarta la posibilidad de que dentro del cultivo, además de los macrófagos, exista otro tipo celular que presente lípidos internos, pero son principalmente las células CD163⁺ las que se tiñen de rojo oleoso en el mismo porcentaje que las células hematopoyéticas adheridas totales, por lo que es probable que desde el principio se tuviera esta población en la fracción adherente.

9. PERSPECTIVAS

- Se requiere definir marcadores adipogénicos más específicos como estudios funcionales para estudios en los que se pretende ver adipocitos para así tener una mayor especificidad en cuanto al tipo celular que se está observando y no exista el riesgo de confundirlo con otro tipo celular como los macrófagos. Algunos otros marcadores sugeridos que se pueden utilizar para probar si son más específicos para adipocitos, son ADD1 (Factor 1 de diferenciación y diferenciación adipocítica), ERR α y leptina
- Observar si este fenómeno es exclusivo del sistema con células humanas o si se observaría también que en el modelo en ratones las células macrofágicas inducidas *in vitro* con un medio adipogénico que las no inducidas para así resolver la controversia iniciada en el modelo murino y comparar con los resultados observados en este trabajo, con células humanas.
- Estudiar la población de macrófagos más a fondo para ver si son capaces de presentar características de otros linajes mesenquimales o de otro tipo, por ejemplo ver si son positivos a tinciones como von Kossa para ver osteocitos o azul de alciano para condrocitos y de esa manera estudiar su flexibilidad para presentar características de distintos linajes.
- Probar diferentes medios con factores adipogénicos para observar si el efecto es el mismo que el aquí observado y así reforzar o refutar lo propuesto en este trabajo.
- Observar si el comportamiento de CTH adultas, provenientes de médula ósea o de sangre periférica movilizada, presentan el mismo comportamiento que las de sangre de cordón umbilical.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida-Porada G. y Zanjani E.D. 2004. A large animal noninjury model for study of human stem cell plasticity. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. Vol. 32. 77-81 pp.
- Beutler E., Williams J *et al.* 2001. *Hematología*. McGraw Hill. 1040 pp.
- Bianco P., Gehron R.P y Simmons P.J. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2. 313-319.
- Bunting K.D. 2008. *Hematopoietic Stem Cells Protocols*. Springer. 312 pp.
- Chao-Ling Yao. *et al.* 2003. Factorial designs combined with steepest ascent method to optimize serum-free media for ex vivo expansión of human hematopoietic progenitor cells. The 8th Symposium of young Asian Biochemical Engineers' Community. 343-352.
- Ching-Hon Pui. 2006. *Childhood leukemias*. Cambridge University Press. 976 pp.
- Crossno J.T. *et al*, 2006. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol 116. 3220-3228.
- Dexter TM *et al*, 1978. Stimulation of differentiation and proliferation of haemopoietic cells *in vitro*. *Jornal of Cell Physiology*. Vol 82. 461-470.
- Fedorocko P. y MacKová N. 1996. Combined modality radioprotection: enhancement of survival and hematopoietic recovery in gamma-irradiated mice by the joint use of liposomal muramyl tripeptide

- phosphatidylethanolamine (mtp-pe) and indomethacin. International Journal of immunopharmacology. Vol. 18. 329-337.
- Flores Guzmán P., Gutiérrez Rodríguez M., y Mayani H. 2002. *In vitro* proliferation, expansion, and differentiation of CD34⁺ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. Archives of medical research. Vol 33. 107-114.
 - Flores Guzmán P. *et al.* 2005. *In vitro* characterization of two lineage-negative CD34⁺ cell-enriched hematopoietic cell populations from human UC blood. Cytotherapy. Vol 7. 334-344.
 - Flores Guzmán P. 2006. Proliferación y expansión *in vitro* de células progenitoras hematopoyéticas humanas presentes en la sangre de cordón umbilical. Tesis para obtener el grado de Doctora en ciencias Biomédicas. 141 pp.
 - Fontagne J., *et al.* 1980. Effect of *in vivo* treatment with indomethacin on mouse granulocyte-macrophage colony-forming cells in culture (CFU (C)). Possible role of prostaglandins. Experimental Hematology. Vol. 8 1157-1164.
 - Freeman B.E. 2008. Modulation of macrophage cytokine responses and antigen presentation during african tripanosomiasis. ProQuest. 201 pp.
 - Firenstein *et al*, 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Experimental Hematology. Vol 4. 267-274.
 - Geddis A., Linden H.M., Kaushansky K . 2002. Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. Cytokine & Growth Factor reviews. 61-73.

- Giorgetti A., *et al.* 2012. Cord blood-derived neuronal cells by ectopic expression of Sox2 and c-Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 109. 12556-12561.
- Godin I. y Cumano A. 2006. *Hematopoietic stem cell development*. Springer. 178 pp.
- Graf T. 2002. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood*. Vol 99. 3098-3101 pp.
- Gropper S, Smith J, Groff J. 2009. *Advanced nutrition and human metabolism*. 5a edición. Cengage Learning. 624 pp.
- Habich A, *et al.* 2006. Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured *in vitro*. *Experimental Hematology*. Vol 34. 914-925 pp.
- Hernández Rodríguez y Sastre Gallego. 1999. *Tratado de nutrición*. Ediciones Díaz de Santos. 1496pp.
- Hoffman R., *et al.* 1993. The *in vitro* and *in vivo* effects of stem cell factor on human hematopoiesis. *Stem Cells*. Vol: 2. 76-82.
- Holyoake T.L. y Alcorn M.J. 1994. CD34+ positive haemopoietic cells: Biology and clinical applications. *Blood Reviews*. Vol. 8 113-124.
- Horwitz E.M. 2003. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Archives of Medical Research*. Vol. 34. 600-606.
- Hutter S. *et al.* 2013. The role of PPARs in placental immunology: a systematic review of the literatura. Hindawi Publishing Corporation. *PPAR Research*. Vol 2013. 1-8 pp.

- Jácome R.A. 2005. Fisiología endocrina. Academia Nacional de Medicina. 3a edición. 199 pp.
- Jiang Y., et al. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. Vol 418. 41-49.
- Kaushansky K. y Ranney H.M. 2009. Thrombopoietin in normal and neoplastic stem cell development. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. Vol 22. 495-499.
- Kim H. *et al.* 2008. Dexamethasone increases angiopoietin-1 and quiescent hematopoietic stem cells: a novel mechanism of dexamethasone-induced hematoprotection. *FEBS Letters*. Vol. 582. 3509-3514.
- Koh Y.J. *et al.* 2007. Bone marrow-derived circulating progenitor cells fail to transdifferentiate into adipocytes in adult adipose tissue in mice. *Journal of Clinical Investigation*. Vol. 117. 3684-3695.
- Kolb H-J, Holler E. 1997. Hematopoietic transplantation: State of art. *Hematopoietic Stem Cells*. *Stem Cells*. Vol 15 (suppl 1) 151-158.
- Krause *et al.* 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell Press*. Vol. 105. 369-377.
- Lagasse *et al.* 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hematocytes *in vivo*. *Nature Medicine*. Vol. 6. 1229-1234.
- Li L. *et al.* 2012. The importance of GLUT3 for de novo lipogenesis in hypoxia-induced lipid loading of human macrophages. *Plos one*. Vol 7. 1-7 pp.

- Lindvall L. *et al.* 1990. Modulation of the constitutive gene expression of the 55 kd tumor necrosis factor receptor in hematopoietic cells. *Biochemical and Biophysical Research communications*. Vol. 172. 557-563.
- Mayani H., Lansdorp P.M. 1998. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*. Vol. 16. 153-165.
- Mayani H. 2003. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Archives of Medical Research*. Vol 34. 3-15.
- Mayani H., Flores-Figueroa E., Montesinos J.J., Flores-Guzmán P., Chávez-González A. 2007. Hematopoiesis. *Cancerología* 2: 95-107.
- Mayani H. 2010. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem cells and development*. Vol. 19. 285-298.
- McKenzie J.L. *et al.* 2007. Reversible cell surface expression of CD38 on CD34-positive human hematopoietic repopulating cells. *Experimental Hematology*. Vol. 35 1429-1436.
- McNiece I.K. y Briddell R.A. 1995. Stem cell factor. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol 57. 14-22.
- Metcalf D. 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood*. Vol 111. 485-491.
- Montesinos J.J., *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*. Vol. 11. 163-176.

- Moore M.A.S. 1991. The use of colony stimulating factors in combination. *Current opinion in Biotechnology*. Vol 2: 854-862.
- Motabi I.H., DiPersio J.F. 2012. Advances in stem cell mobilization. *Blood Reviews*. Vol 26. 267-278.
- Novelo-Garza B, *et al.* 2008. Establishing a cord blood banking and transplantation program in Mexico: a single institution experience. *Transplantation and cellular engineering*. Vol 48. 228-236 pp.
- Parajuli P. *et al.* 2001. Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor preferentially expand and stimulate different dendritic and T-cell subsets. *Experimental Hematology*. Vol. 29. 1185-1193.
- Payushina O.V., Domaratskaya E.I., y Starostin V.I. 2006. Mesenchymal stem cells: Sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell Biology*. Vol. 33. 2-18.
- Pedraza C, *et al.* 2008. Calcium oxalate crystals in fetal bovine serum: implications for cell culture, phagocytosis and biomineralization studies *in vitro*. *Journal of Cellular Biochemistry*. Vol 103. 1379-1393 pp.
- Pelayo R., Santa-Olalla J., Velasco I. 2011. *Células Troncales y Medicina Regenerativa*. Universidad Nacional Autónoma de México. 355 pp.
- Pittenger M.F., *et al.* 1999. Multilineag potential adult human mesenchymal stem cells. *Science*. Vol. 284. 143-147.
- Poulosom R. *et al.* 2002. Adult stem cell plasticity. *Journal of Pathology*. Vol. 197. 441-456.

- Quesenberry P.J., Dooner M.S. y Aliotta J.M. 2010. Stem cell plasticity revisited: the continuum marrow model and phenotypic changes mediated by microvesicles. *Experimental Hematology*. Vol. 38. 581-592.
- Rodak B.F. 2005. *Hematología. Fundamentos y Aplicaciones clínicas*. 2ª edición. Ed. Médica Panamericana. 838 pp.
- Ross M.H. y Pawlina W. 2007. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana. 5ª edición. 992 pp.
- Sera Y. *et al.* 2009. Hematopoietic stem cell origin of adipocytes. *Experimental Hematology*. Vol. 37. 1108-1120.
- Schutze N, *et al.* 2005. Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Communication and Signaling*. Vol. 3. 1-12 pp.
- Takahashi M., *et al.* 2013. Macrophage lipoprotein lipase modulates the development of atherosclerosis but not adiposity. *Journal of lipid research*. Vol 54. 1124-1134 pp.
- Till J.E. y McCulloch E.A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*. Vol 14. 213-222.
- Van den Heuvel MM., *et al.* 1999. Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol 66. 858-866 pp.
- Wang J., *et al.* 2013. The environmental obesogen bisphenol A promotes adipogenesis by increasing the amount of 11 β -hydroxysteroid

- dehydrogenase type 1 in the adipose tissue of children. *International Journal of Obesity*. Vol 37. 999-1005 pp.
- Wang L.D y Wagers A.J. 2011. Dynamic niches in the origination and differentiation of hematopoietic stem cells. *Nature Reviews*. Vol 12. 643-656.
 - Wessely O., *et al.* 1997. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *The EMBO Journal*. Vol 16. 267-280.
 - Wong C.J., Casper R.F. y 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*. Vol. 316. 927-939.
 - Wu Yu. 2008. Identification and characterization of adipogenesis related genes. ProQuest. 353 pp.
 - Wu Z., Puigserver P., y Spiegelman B.M. 1999. Transcriptional activation of adipogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*. Vol. 11. 689-694.
 - Xiao *et al.* 2006. Differentiation of human umbilical cord blood stem cells into hepatocytes *in vivo* and *in vitro*. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 12. 4014-4019.
 - Yu G, *et al.* 2011. Isolation of murine adipose-derived stem cells. *Methods of Molecular Biology*. Vol 702. Chapter 3. 29-36pp.
 - Zeddou M, *et al.* 2010. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biology International*. Vol 34. 693-701 pp.