

CELULAS MADRE MESENQUIMALES Y MEDICINA REGENERATIVA

Palabras clave: células madres mesenquimales, médula ósea, plasticidad.
Key words: mesenchymal stem cells, bone marrow, plasticity.

El considerable potencial terapéutico de las células estromales mesenquimales multipotenciales o células madre mesenquimales (MSC) ha generado un creciente interés en el campo de las ciencias biomédicas. Sin embargo, los estudios reportados por muchos de los investigadores acerca de los diferentes métodos de aislamiento y expansión de las mismas, así como los avances en su caracterización, han dado dificultades crecientes a la hora de comparar y contrastar los avances en el área. Para comenzar a unificar esfuerzos, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha propuesto criterios mínimos que definen a las MSC. En primer lugar, las MSC deben ser adherentes al plástico cuando son mantenidas en condiciones estándar de cultivo (medio α con el agregado de suero bovino fetal al 20%). En segundo lugar, las MSC deben expresar CD105, CD73 y CD90, pero a su vez, carecer de la expresión de las siguientes moléculas de superficie: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR. Y, por último, deben ser capaces de diferenciarse *in-vitro* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Las MSC pueden ser aisladas a partir de diferentes tejidos como médula ósea y tejido adiposo. Junto a su capacidad para diferenciarse y transdiferenciarse a células de los distintos linajes, las MSC han generado un gran interés por sus características inmunomoduladoras. De hecho, hubo un antes y un después del descubrimiento de la capacidad de las MSC de inducir tolerancia periférica indicando que podrían ser útiles como herramientas terapéuticas ante patologías que implican desórdenes inmunes. Respecto a esto, a pesar de que no se han reportado efectos adversos importantes hasta la fecha en los ensayos clínicos que se están llevando a cabo, se sabe que toda terapia de intervención acarrea sus riesgos. Por lo tanto, resulta de gran importancia evaluar y contrastar los potenciales riesgos del uso de estas terapias, como la posibilidad de tumorigénesis, respecto a los potenciales beneficios para los pacientes.

■ CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CÉLULAS MADRE

Durante el desarrollo embrionario de animales vertebrados y el ser humano, uno de los eventos iniciales más

importantes, es la formación de tres líneas germinales embrionarias específicas: el ectodermo (que origina al linaje neural y piel), el mesodermo (que origina los linajes sanguíneo, óseo, muscular, condrocítico y

adiposo) y el endodermo (que contribuye a la formación de tejidos del tracto respiratorio y digestivo). Se sabe que la participación de las células embrionarias en la formación de estos tres grupos requiere la ac-

■ **V. Beatriz Fernández Vallone, Vivian Labovsky, Leandro M. Martínez, Norma Alejandra Chassening**

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Vuelta de Obligado 2490, C1428ADN, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

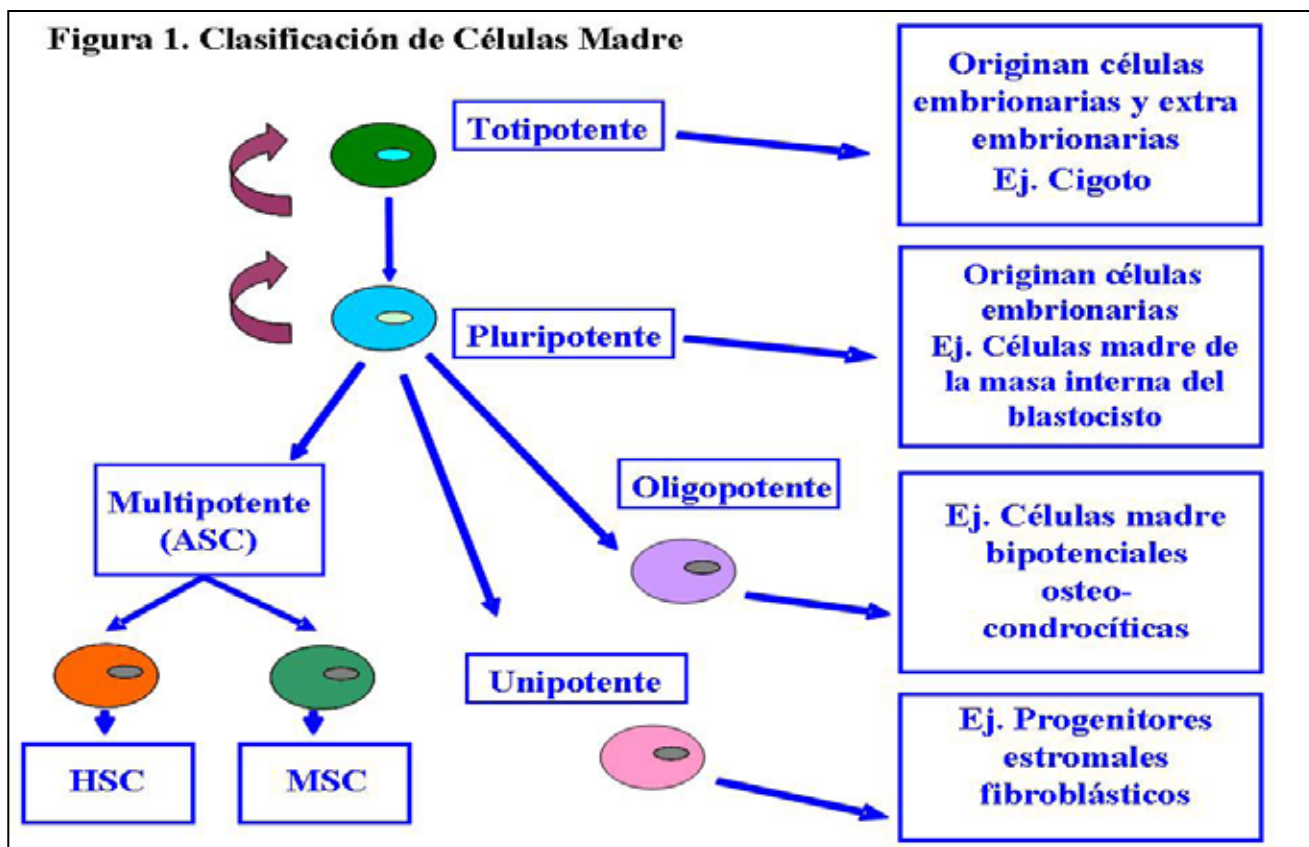
achasseing@ibyme.conicet.gov.ar; alejachasse@gmail.com

ción secuencial de ciertos productos de múltiples genes, pero el preciso momento en el cual las células embrionarias se transforman en un precursor o progenitor comprometido con cada linaje específico aún no está totalmente definido (1). Tiempo atrás, se pensaba que durante la etapa embrionaria las células madre, los precursores, los progenitores comprometidos y las células maduras de un determinado linaje tisular conservaban su especificidad en forma irreversible en la edad adulta, salvo ciertas excepciones como las células de la cresta neural de origen ectodérmico, las cuales podían dar células del linaje neural, muscular y óseo (2). Sin embargo, en los últimos años, evidencias experimentales mostraron que durante la etapa embrionaria y adulta las distintas poblaciones mencionadas poseen una especificidad reversible (2-5). Estas observaciones permiten afirmar que, bajo ciertas circunstancias, las células madre presentes en los

distintos tejidos, así como los precursores, los progenitores comprometidos y ciertas células diferenciadas presentes en los mismos, tienen las propiedades de diferenciarse, desdiferenciarse y transdiferenciarse dando células madres, precursores, progenitores comprometidos y células maduras del mismo o distinto origen (2-4, 6). La *transdiferenciación* se define como la conversión de la célula de un linaje tisular específico en otra célula de un linaje completamente diferente, con la pérdida de la mayoría de sus marcadores específicos y función inicial, adquiriendo así, marcadores y función del nuevo linaje específico. La propiedad de transdiferenciación de la célula madre adulta (ASC) dio lugar al concepto de plasticidad (*Stem Cell Plasticity*), el cual es función del microambiente estromal (factores solubles, componentes de la matriz extracelular, células accesorias y estromales) del tejido que se necesite recuperar (4). Una manifestación de

la plasticidad es la transición epitelial-mesenquimal (EMT/MET) que representa una reorientación de la transcripción de genes que conducen finalmente al pasaje de la célula madre embrionaria (ESC) a una ASC y a la formación de células cancerosas metastásicas (4, 7).

Las células madre son células indiferenciadas que se caracterizan por su capacidad de auto-renovación, su alto potencial de proliferación y su diferenciación en precursores y progenitores comprometidos no auto-renovables y células efectoras diferenciadas (2, 8). Las células madre han sido clasificadas según su potencial de desarrollo (**Figura 1**) en: *totipotenciales* (capaces de dar todos los tipos de células: embrionarias y extra-embriónicas), *pluripotenciales* (capaces de dar todos los tipos celulares embrionarios), *multipotenciales* (capaces de dar un gran número de linajes celulares), *oligopotenciales* (capaces de dar un número más limitado de linajes celulares) que las multipo-



tenciales) y *unipotenciales* (capaces de contribuir con un sólo linaje celular específico) (2, 9). Como ejemplo de *totipotencial* podemos citar un cigoto; de *pluripotenciales*, las células madre derivadas de la masa interna del blastocistos (*inner cell mass: ICM*) y de *multipotenciales*, las células madre adultas hematopoyéticas (HSC) y mesenquimales (MSC) de organismos post-natales (2).

Por otro lado, aún no se conoce totalmente si las células madre derivadas de la ICM son una población homogénea de células pluripotenciales y, por otro lado, si las ESC obtenidas del cultivo *in vitro* de ICM son funcionalmente y fenotípicamente idénticas a las células pluripotenciales de las cuales derivan (2). Algunos investigadores hacen una clasificación más estricta de las células madre distinguiendo: 1- ESC como células pluripotenciales capaces de dar cualquier tejido de la línea germinal y somática, 2- Células progenitoras adultas multipotenciales (MAPC) capaces de dar células de origen mesodérmico y de otro origen como son las células endoteliales y hepatocitos (estas MAPC fueron aisladas recientemente de médula ósea (MO) humana y animal) (10-12), 3- MSC de MO como ASC con menor potencial de diferenciación que las MAPC de MO. Estos autores observaron que las MSC de MO tenían un potencial de diferenciación restringido a las células de origen mesodérmico como adipocitos, osteocitos, condrocitos y en algunas circunstancias células del músculo esquelético (13). Al respecto, Aranda y colaboradores encontraron que la capacidad de diferenciación está dada por cambios en el perfil epigenético de las células madre, en los cuales intervienen procesos como la metilación del DNA y la modificación de histonas en los genes de diferenciación (5).

Las ASC multipotenciales han sido descritas en distintos tejidos y algunas han sido caracterizadas en los últimos años, como ser: HSC y MSC en MO y sangre periférica;

células madre neurales en sistema nervioso central; células madre hepáticas en los canales de Hering; células madre pancreáticas intra-isletos del páncreas; células madre de piel en la lámina basal de la epidermis y folículo piloso; células madre epiteliales en pulmón; células madre del epitelio intestinal; células madre del músculo esquelético en fibras musculares (14).

Las diferencias más importantes encontradas entre las ASC y las ESC son (2, 14-18):

ESC: células madre pluripotenciales, con alto potencial proliferativo, responsables del desarrollo embriogénico y organogénesis. Estas células madre pueden mantenerse 6 meses sin diferenciarse (auto-renovación) o, si se utilizan medios selectivos, diferenciarse a todas las especies celulares. Su gran desventaja es que pueden inducir teratomas, es por eso entre otras cosas, que su estudio ha originado profundos conflictos éticos. Para su utilización en trasplantes debería ser autóloga para evitar problemas de rechazo en el huésped.

ASC: células madre multipotenciales, con alto y bajo potencial proliferativo, responsables de la reparación de tejidos. La diferenciación en estas células es limitada. En el caso particular de las MSC de MO humana, los estudios han demostrado la presencia de una subpoblación de células mesenquimales multipotenciales en los cultivos tempranos de MSC (cultivadas a baja densidad: 100 células/cm², MSC del pasaje 2-3, en medio α libre de suero y factores de crecimiento) después de un período de 2 a 4 semanas (19). Esta subpoblación de alta capacidad de auto-renovación presenta alta expresión de OCT-4 y otros genes expresados en las células embrionarias. Estudios recientes han demostrado que si se trabaja con cultivos no senescentes de MSC de MO humana, los mismos pueden mantenerse entre 8 y 12 semanas sin que las células se transdiferencien a células tumorales, pero esta observación no impli-

ca que el uso terapéutico de estas MSC no favorezcan con el tiempo el desarrollo de un tumor primario o metastásico (20-22). Por otro lado, dadas las funciones inmunosupresoras de las MSC pueden ser administradas para trasplantes como ASC autólogas o alogénicas.

Las principales cuestiones bioéticas asociadas con las células madre humanas están relacionadas con su uso en investigación y sus derivaciones en los estudios preclínicos (23). En el presente, las consideraciones bioéticas más importantes tienden a inclinarse más a cómo deben ser realizadas las investigaciones sobre células madre, en lugar de si deben llevarse a cabo las mismas o no (23).

Además, a pesar de existir gran interés en establecer las normas bioéticas correspondientes a la recolección y uso de células madre somáticas (adultas) provenientes de fetos abortados y de sangre de cordón umbilical, el más intenso debate está focalizado en la fuente de ESC humana. De aquí que las nuevas normas bioéticas se comienzan a establecer en relación a las derivaciones y uso de células madre semejantes a la embrionaria como son las células madre pluripotenciales inducidas (IPS) a partir, por ejemplo, de fibroblastos de piel genéticamente modificados (23-26). En la tabla 1 se resume la guía básica establecida por La Sociedad Internacional para la Investigación con Células Madre (ISSCR) para el traslado de la investigación básica en células madre a la clínica (23).

■ CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES, EN PARTICULAR DE MÉDULA OSEA

En este trabajo nos interesa hacer especial referencia a la naturaleza, biología y perspectivas del uso terapéutico de la MSC, de MO en particular.

La MO está compuesta por dos compartimentos (Figura 2): el hematopoyético, formado por HSC y progenitores hematopoyéticos

comprometidos con los distintos linajes específicos; y el estromal o microambiente hematopoyético, donde se encuentran las células estromales propiamente dichas, células accesorias, componentes de matriz extracelular y factores solubles (27). Dentro de las células estromales encontramos MSC, precursores estromales, progenitores estromales, fibroblastos, macrófagos, endoteliales y adipocitos (28). Todas las células estromales de MO derivan de la MSC con excepción del macrófago que deriva de la HSC (29).

Las MSC (Figura 3) se conocen

también como células estromales mesenquimales o unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F). Son células quiescentes, *in-vitro* comienzan a proliferar frente a estímulos adecuados como por ejemplo: PDGF, FGF-2, TGF- β , EGF, Dkk-1 y SDF-1, entre otros (30-36).

Hoy se sabe, que las MSC, los precursores y los progenitores estromales mesenquimales son células adherentes al plástico, no fagocíticas, capaces de diferenciarse, *in-vivo* e *in-vitro*, en líneas celulares específicas del mismo origen como osteocitos, condrocitos, adipocitos, tenocitos, células musculares y cé-

lulas estromales (3, 37-40); algunas de las células se muestran en la Figura 4. Es importante aclarar que, además, las MSC son capaces de transdiferenciarse en diferentes tipos celulares de distinto origen como células neuronales, hepáticas, pancreáticas, renales, y mioblastos, entre otras (3, 11, 41, 40).

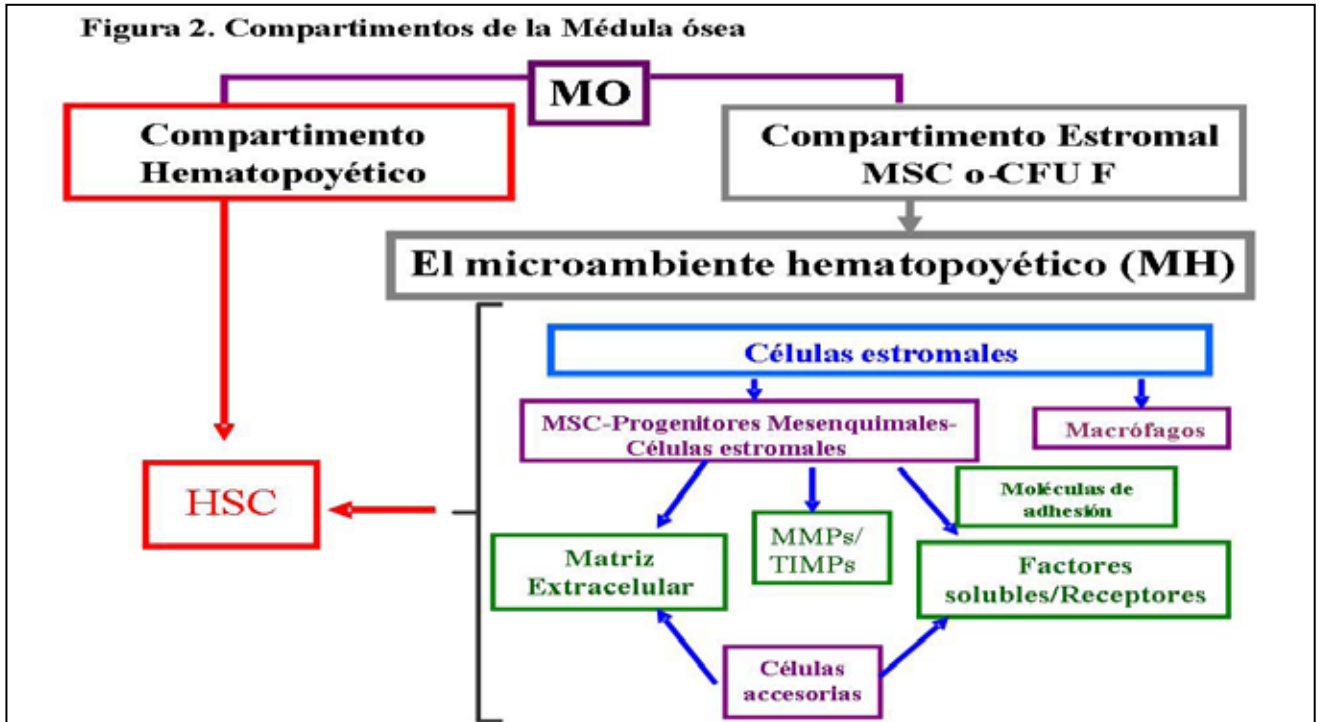
Las MSC son capaces de originar CFU-F *in-vitro* (Figura 5), con lo cual se deduce que cada CFU-F se origina de una MSC (42). Por lo tanto, el ensayo de CFU-F nos informa del número y potencialidad de las MSC *in-vivo*, al observarse que a mayor tamaño de la CFU-F mayor

Tabla 1. Guía básica de la ISSCR a tener en cuenta para el traslado de la investigación básica en Células Madre a la Clínica.

(Extraído de: Insoo Hyun. "The Bioethics of Stem Cell Research and Therapy". *The Journal of Clinical Investigation* 120 (1): 71-75, 2010.)

Los investigadores que llevan a cabo investigaciones preclínicas o clínicas que involucran el uso de células madre o derivados directos de las mismas, deben actuar dentro del marco de las guías de la ISSCR y de cualquier otra norma regulatoria relevante.
Las investigaciones clínicas que involucren células madre o sus derivados directos deben ser revisadas y aprobadas por Comités <i>ad-hoc</i> con la participación de expertos en el área científica de las células madre.
Tanto los donantes como los pacientes deben ser debidamente informados y firmar consentimiento informado, luego de demostrar que comprenden los riesgos involucrados.
Tanto científicos como agentes regulatorios deben trabajar en conjunto en el desarrollo de estándares comunes de referencia.
Es sumamente necesario el desarrollo de sistemas y estándares de calidad para el aislamiento y manipulación de las células madre.
Es necesario el desarrollo de suficientes estudios preclínicos en animales.
Las células que serán usadas en ensayos clínicos deben ser testeadas en forma exhaustiva para minimizar su potencial toxicidad, incluyendo estudios de tumorigénesis tanto <i>in-vitro</i> como <i>in-vivo</i> .
Los pacientes deben ser monitorizados a largo plazo para el registro de efectos sobre su salud y reporte de eventos adversos de ser observados.

Figura 2. Compartimentos de la Médula ósea



es la capacidad de regulación de la hematopoyesis y diferenciación de la MSC (43, 44). Cabe recordar que entre 1960 y 1970, Friedenstein y colaboradores fueron los primeros en demostrar que las células estromales derivadas de MO eran capaces, al ser transplantadas, de favorecer la formación de una MO ectópica; y describieron, también, sus características adherencia al plástico y capacidad de favorecer la osteogénesis *in-vivo* (45-47).

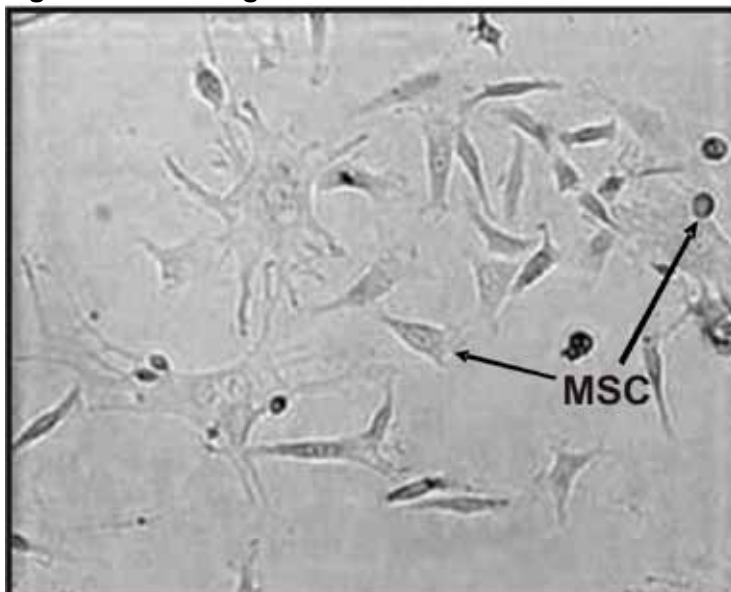
La frecuencia de CFU-F es muy

baja, 1/10⁴ o 1/10⁵ células mononucleares (CMN) de MO humana normal, siendo esta frecuencia mucho menor que la de HSC y células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺, las cuales constituyen el 1% de las CMN (42). Estas observaciones, sugieren que el estudio *in-vivo* e *in-vitro* de las MSC de MO humana constituye un gran desafío en la práctica clínica (48).

En cultivos de MO realizados en medio α con 20% de suero bovino fetal (SBF), la forma celular estro-

mal que predomina dentro de cada CFU-F es la fusiforme, característica de células estromales de naturaleza fibroblástica (proliferación 4 hidroxilasa, CD44, stro-1, CD105 positivas) (42, 49, 50). Cada CFU-F está compuesta por células estromales diferenciadas, precursores, progenitores y células madre de distinto potencial de diferenciación (multi, cuatri, tri, bi, unipotencial) y proliferación, de ahí la importancia de aislarlas, caracterizarlas y estudiar su funcionalidad antes de ser utilizadas para la reparación de tejidos o terapia génica (40). La heterogeneidad dentro de la colonia fibroblástica se determinó al subcultivar células de una misma CFU-F a baja densidad celular (50-100 células/cm²) y como resultado observar nuevas colonias de tamaño distinto y diferente potencial de diferenciación o plasticidad (43). Por lo tanto, la alteración en la capacidad de clonado de la MSC para dar CFU-F podría representar un mecanismo previo, no caracterizado, a una falla en la plasticidad de la MSC y de los progenitores estromales mesenquimales para diferenciarse y transdiferenciarse a células de distintos linajes tales como el endodérmico, el mesodérmico y el ectodérmico (51).

Figura 3: Morfologías de MSC de MO humana normal



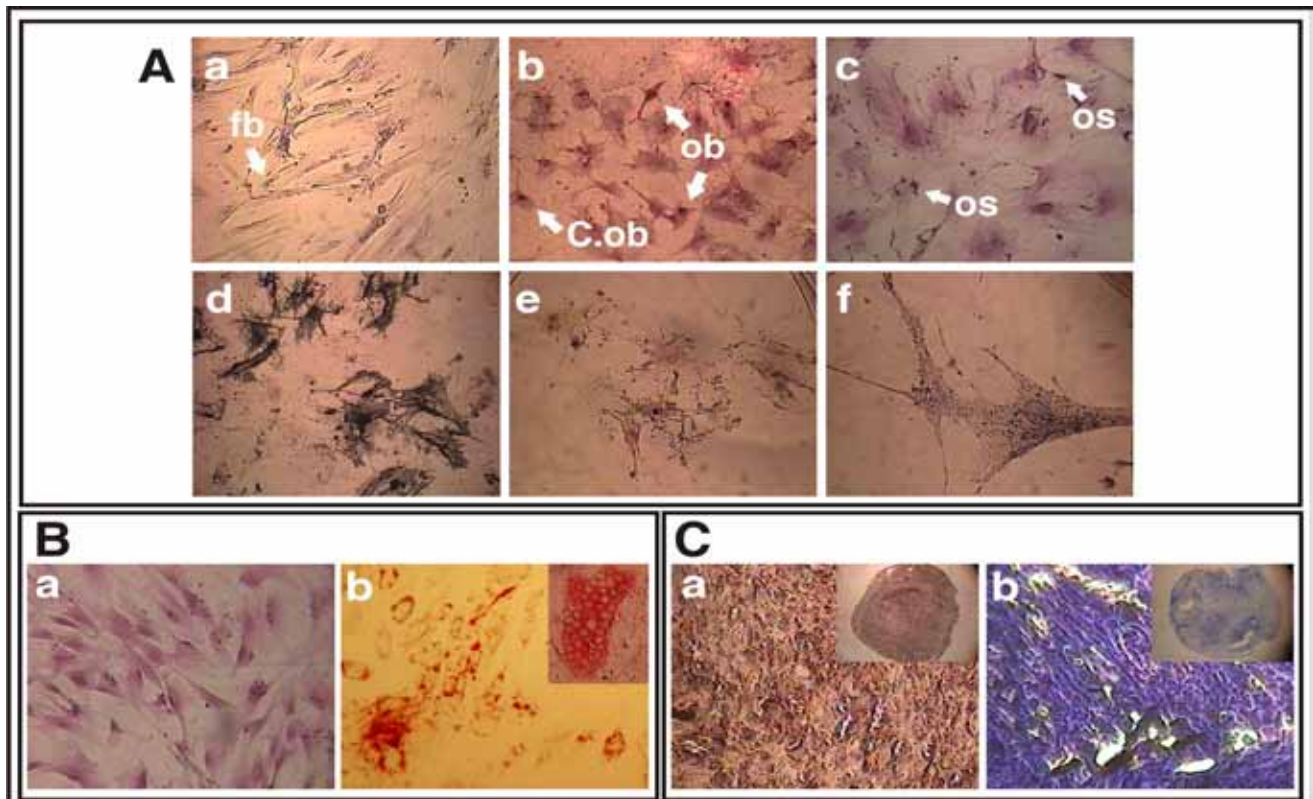


FIGURA 4: Plasticidad y diferenciación de MSC. Se muestran MSC cultivadas en medios de diferenciación específicos: osteogénico (A), adipogénico (B) y condrogénico (C). La diferenciación a los respectivos linajes se determina utilizando tinciones específicas y técnicas de inmunocitoquímica. A) MSC cultivadas en medio α + 20% SBF presentan una morfología semejante a las células fibroblásticas (fb) y resultan negativas para la tinción Von Kossa-Giemsa (a). MSC cultivadas en medio de diferenciación osteogénico presentan distintos estadios: células en camino a osteoblastos (C.ob) y osteoblastos (ob) (b) y osteocitos (os) (c). Los cultivos osteogénicos resultan positivos para la tinción de Von Kossa-Giemsa (X400) (d), Alizarin Red-S (X400) (e) y Osteocalcina (X600) (f). Estos resultados son acompañados por cambios morfológicos: desde la típica forma fusiforme del fibroblasto estromal a células con forma cuboideas y poligonales. B) MSC cultivadas en medio α + 20% SBF, muestran una tinción negativa para Giemsa y Oil Red-O (X400) (a); sin embargo las MSC en medio de diferenciación adipogénico muestran una tinción positiva para Oil Red-O (X400) evidenciada por la presencia de numerosas vacuolas teñidas en el citoplasma, como se observa en la esquina superior derecha de la figura (X600) (b); C) La diferenciación condrogénica de las MSC se demuestra por la tinción positiva para Colágeno II (X400) (a) y azul de Toluidina (X400) (b). Esta diferenciación se puede observar solo cuando las MSC se cultivan en medio de diferenciación condrogénico. Además, esta reacción evidencia la producción de matriz. Este resultado no se observa en las MSC cultivadas en medio α suplementado con 20% de suero bovino fetal.

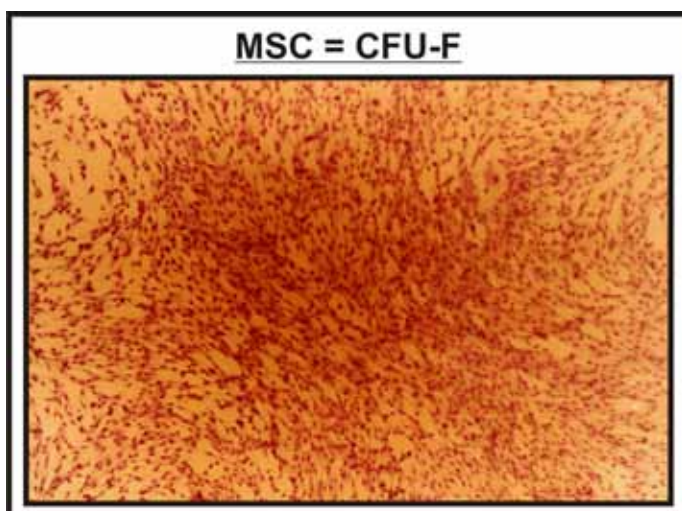


FIGURA 5: Desarrollo de una unidad formadora de colonia fibroblástica (CFV-F) a partir de una célula madre mesenquival (msc) *in vitro*.

Las MSC de MO son células madre que no se renuevan permanentemente, sino que se forman durante ciertos períodos, crecen *in-vitro* en fase sólida, presentan vida media larga, forman parte de una estructura compleja como es el microambiente hematopoyético de MO y su fenotipo y el de las células derivadas de ellas (fibroblastos, adipocitos, osteocitos, condrocitos y endoteliales) presentan, como se comentó anteriormente, plasticidad, es decir fenotipo reversible (44, 52-54). Por el contrario, las HSC son células que se renuevan permanentemente y en forma continua, crecen en cultivo en fase líquida y tienen vida media corta. El sistema hematopoyético es una estructura simple y las HSC presentan, una vez diferenciadas a los distintos linajes sanguíneos, un fenotipo irreversible (52).

La mayor evidencia de la existencia de MSC, se deriva de los experimentos de cultivo largo de MO, donde el rol de estas células estromales es crear un microambiente hematopoyético apropiado para favorecer la auto-renovación, proliferación y diferenciación de HSC y los progenitores hematopoyéticos a través de la liberación de citoquinas (IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-7, IL-15, etc.), factores de crecimiento (LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Flt-3, SCF, PDGF, trombopoyetina, etc.), metaloproteinasas (MMP2, MMP9, MMP13, MMP3, etc.), inhibidores de MMPs (TIMP1, 2, etc.), quimoquinas (SDF1, RANKL, CCL2, etc.), componentes de matriz extracelular (fibronectina, colágeno I, III y IV, laminina, proteoglicanos de heparán sulfato, de dermatán sulfato, de condroitin sulfato y ácido hialurónico). Es decir, crear un microambiente adecuado para mantener la homeostasis de la hematopoyesis (55-58). Además, todos estos factores pueden actuar en distintas etapas del proceso hematopoyético actuando como activadores o como inhibidores del mismo (TGF- β , MIP-1 α , etc.) lo cual depende de la célula blanco; pudiendo, también, ejercer su acción sobre la población de

células estromales mesenquimales de MO y otros tejidos, regulando su proliferación y función (59-62). Sin embargo, los mecanismos implicados en estos procesos no han sido totalmente caracterizados. Van Overstraeten Schlogel y colaboradores (63) sugirieron que la MSC de MO humana favorece la hematopoyesis en los cultivos clásicos desarrollados por la metodología de Dexter, a través de la activación del eje SDF-1-CXCR4 [receptor (R) de SDF-1=CXCL12], al interactuar las MSC con las HSC o los progenitores hematopoyéticos, respectivamente. Este último trabajo indica que la quimoquina SDF-1 permitiría la retención de las HSC y los progenitores hematopoyéticos en el nicho vascular, favoreciendo la exposición de las células hematopoyéticas a la acción de factores estimulantes e inhibidores de la proliferación y diferenciación en forma parácrina.

■ CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIÓN DE LAS MSC

Respecto a la caracterización fenotípica y aislamiento de las MSC de MO, grandes progresos han sido realizados utilizando la metodología de separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y la técnica de separación magnética. Los estudios de marcadores de superficie de MSC de MO humana en cultivo primario mostraron: Stro-1⁺, CD773⁺, CD49a⁺, CD49b^{bajo}, CD49c⁺, CD49d^{bajo}, CD49f⁺, CD44⁺, CD105⁺, CD106^{bajo}, CD166⁺, CD29⁺, CD90⁺, PODXL⁺, CD13⁺, HLA-ABC⁺, CD146⁺, CD147⁺, CD271^{-bajo}, CD117(c-kit)^{-bajo} y negatividad para CD34, CD31, CD45, CD14, CD133, CD11b, CD113, HLA-DR, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40, CD40L, CD36, CD19, CD3, CD79, CD184 (CXCR4, positivo en MSC no expandidas) y c-met (R de HGF, positivo en MSC no expandidas) (40, 64-68).

Por otro lado, en trabajos de caracterización fenotípica realizados con células mesenquimales no

expandidas de MO humana adulta fresca, se han podido identificar dos fracciones celulares, una CD45⁻CD14/CD73⁺ y otra CD45⁺CD14⁻/CD49a⁺ (59). La expresión antigénica temprana de CD73 y CD49a es una característica que define a las MSC pero que, hasta el momento, no se conoce su significado funcional. El CD73, por ser una molécula de adhesión, podría ser un activador de transducción de señales durante las interacciones entre las MSC y el resto de los componentes del microambiente estromal, favoreciendo así la proliferación y los procesos de diferenciación (69). Y la expresión de CD49a (cadena a de VLA-1) permitiría posiblemente que las MSC interactúen con componentes de la matriz extracelular como colágeno IV y laminina, lo cual favorecería la migración. Además, la unión de CD49a al colágeno induciría en la MSC (quiescente) la progresión del ciclo celular y su sobrevivencia (59, 70).

En los últimos años, ha sido descrito el antígeno SSEA-1 (antígeno glicolipídico embriogénico temprano) marcador de ESC pluripotentes no diferenciadas, que también se halla presente en las MSC de MO adulta (71).

Por otra parte, los que trabajan con MAPC de MO humana encontraron que las mismas eran CD90⁺, CD13⁺, CD44^{bajo} y negativas para CD34, CD45, CD36, HLA de clase I y II (5).

Otro dato reciente e interesante, es que la expresión de CD146⁺ indica procedencia de la MSC del nicho vascular de MO, y que la mayor intensidad de fluorescencia relativa de CD146/MSc fue encontrada en las MSC que presentan triple plasticidad y mayor capacidad de auto-renovación, así como mayor capacidad de regular la hematopoyesis en comparación a las que expresan menor intensidad de fluorescencia relativa, que corresponderían a las MSC unipotenciales de baja eficiencia de clonado (72, 73).

En el año 2006, la ISCT propuso los criterios mínimos para definir una MSC a saber: ser adheren-

te al plástico, presentar capacidad de clonado para dar CFU-F, ser CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD14⁻, CD11b⁻, CD79α⁻, CD19⁻ y HLA-DR⁻ y diferenciarse *in-vitro* a osteocito, condrocito y adipocito (74). Esta última propuesta de la ISCT surgió como consecuencia de la gran diversidad de resultados sobre la caracterización de las MSC de MO presentados por los investigadores de todo el mundo. La heterogeneidad de datos era consecuencia directa de la utilización de distintas metodologías a la hora del aislamiento, expansión y diferenciación de la MSC.

De todo lo comentado hasta el momento, surge que la población de MSC de MO presenta un fenotipo heterogéneo. Con este pensamiento en mente, algunos autores han buscado el mejor marcador para identificar MSC de MO *in-vivo* y han postulado al CD271 (receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad) como el mejor (67, 68). Otra observación interesante, es que las MSC con CD271⁺ y CD106 (VCAM-1)⁺ definen a una subpoblación de MSC multipotenciales con propiedades inmunosupresoras importantes, las cuales disminuyen o anulan la reacción injerto contra huésped (75, 76).

La presencia de MSC se ha encontrado en MO tanto en el período postnatal como en el adulto y su frecuencia declina con la edad (77). En el nacimiento, la frecuencia es de 1 MSC/10⁴ CMN de MO, disminuyendo esta relación a 1 MSC/2x10⁶ CMN en los individuos de 80 años (78).

Es importante entonces, tener en cuenta que si bien hasta el momento la MO es la fuente principal de MSC para los estudios clínicos y experimentales, su número y capacidad de diferenciación disminuye con la edad (78, 79). Por lo tanto, debería considerarse otra fuente de esta clase de ASC como, por ejemplo, la sangre de cordón umbilical o los lipoaspirados (80). Algunos resultados indicaron que *in-vitro*, independientemente de la fuente, las MSC guardan similares caracte-

rísticas fenotípicas y de plasticidad (80). Sin embargo, algunos autores como Bieback K y colaboradores encuentran diferencias en la eficacia de aislamiento de las MSC de estas tres fuentes, así como en la frecuencia, plasticidad y potencial de expansión de las mismas. Al respecto, estos autores encuentran: 1)- una frecuencia decreciente de MSC/10⁶ CMN en tejido adiposo, MO y sangre de cordón umbilical, respectivamente; 2)- 100% de eficacia en el aislamiento de las MSC al trabajar con MO y tejido adiposo, y entre 30-60% cuando la fuente es sangre de cordón umbilical; 3)- una mayor capacidad proliferativa y menor tamaño celular en las MSC de sangre de cordón respecto a las de tejido adiposo y MO, presentando las MSC de esta última la menor expansión; y 4)- las MSC de origen medular y adiposo presentaron triple plasticidad en comparación a la osteo-condro-diferenciación de las MSC de sangre de cordón (81). Otra fuente de MSC humanas es la sangre fetal del primer trimestre, así como el hígado y MO de este período de vida, en estos sitios las MSC fetales serían más primitivas y con mayor plasticidad que sus correspondientes compartimentos en el adulto (82). Por su parte, Zhou y colaboradores (66) encontraron que las MSC de sangre de cordón umbilical, MO adulta y fetal presentaban semejante fenotipo de membrana, morfología y mantenían la multipotencialidad y la auto-renovación entre los pasajes 3-10. La única diferencia que observaron es que al llegar a confluencia el cultivo de CFU-F de origen de MO fetal y de sangre de cordón umbilical, las células mantienen su capacidad proliferativa mientras que las de MO adulta se arrestan (66). Respecto a las células madre fetales (FSC) se ha encontrado otras fuentes como son el líquido amniótico y la placenta durante la gestación (82). Las FSC podrían representar un tipo de SC intermedia entre las ESC y las MSC adulta desde el punto de vista terapéutico.

Continuando con las caracterís-

ticas funcionales de las MSC adultas, existen distintos factores intrínsecos y extrínsecos que afectan el número y la capacidad de clonado de la MSC de MO para dar CFU-F *in-vitro*, entre ellos se encuentra el régimen pre-transplante de MO, el cual induce una disminución reversible del número de CFU-F en los niños e irreversible en el adulto (83). Este factor también produce, por ejemplo, alteración en la capacidad de diferenciación de la MSC de MO, especialmente a osteoblasto-osteocito (83, 84). Las MSC y los progenitores estromales de MO cumplen un papel fundamental en la formación del hueso como consecuencia de su multipotencialidad para dar células del linaje osteocítico (osteoblasto/osteocito), entre otros (85-87). Además estas MSC liberan factores solubles como IL-1b, IL-6, IL-11, TGF-b, FGF-2, PDGF, PGE2, Dkk-1, proteínas Wnt (Wnt 2, 4, 5, 11, 16), RANKL, LIF, OPG, M-CSF, MIP-1α y ácido hialurónico, capaces de regular tanto la formación y función del linaje osteoblástico, así como osteoclasto (88-90).

Por otro lado, los osteoblastos/osteocitos liberan factores solubles que actúan en forma autócrina como: TGF-b, FGF-2, IGF- I y II, y BMP (91). Además, los *preosteoblastos/osteoblastos* liberan factores activadores (RANKL, M-CSF; IL-1, IL-6, TGF-b, LIF, IL-11, ácido hialurónico) e inhibidores (OPG) de la osteoclastogénesis (92-94). Por su parte el *osteoclasto*, el cual deriva de los progenitores mielo-monocíticos de MO, libera de la matriz de mineralización factores reguladores de la proliferación, diferenciación y activación de los osteoblastos como TGF-b, BMP-2, 3 y 7, FGF, IGF- I y II; a través de la liberación de metaloproteinasas (MMP-1, 2, 8, 7 y 9) y catepsina K (95). La MMP7 además de ayudar a la degradación de la matriz ósea liberando factores solubles como las otras MMPs libera RANKL de la membrana celular, principal factor osteoclastogénico (96).

Los osteoblastos, así como las

células estromales de MO, también liberan múltiples factores solubles que regulan la hematopoyesis (IL-11, IL-6, GM-CSF y M-CSF), en particular la mielopoyesis (97). De lo expuesto anteriormente surge el concepto de que no solo el hueso y la MO son órganos anatómicamente contiguos sino que también exhiben una interdependencia funcional marcada (98). Es decir, que muchos desórdenes de la MO afectan en forma significativa la composición y función del hueso, involucrando interacciones entre las células normales y modificadas de MO y aquellas que existen en el compartimiento óseo.

A pesar de los grandes avances que se han realizado en el tema de la diferenciación de la MSC a osteoblasto/osteocito, así como en la influencia de esta MSC en la osteoclastogénesis, mucho queda por estudiar acerca de los mecanismos por los cuales la MO y el hueso actúan en forma sinérgica para regular la remodelación ósea normal y patológica.

En referencia al aislamiento de MSC de MO, se puede realizar por distintas metodologías pero la más comúnmente usada y con alto rendimiento es el aislamiento inicial de las CMN a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque ($d=1.075 \text{ g/cm}^3$) y posterior adherencia al plástico durante 24 horas, utilizando medio de cultivo α suplementado con 20% de SBF. Luego de este período, se descartan las células hematopoyéticas no adherentes, y se vuelven a incubar las células estromales con el mismo medio hasta alcanzar confluencia. Las células estromales se aíslan por tratamiento con solución de Tripsina-EDTA (0,05-0,02% en PBS, respectivamente) (42). De otra forma, Horn P y colaboradores (99) han observado que las MSC de MO pueden ser aisladas eficientemente luego de una lisis de glóbulos rojos con solución de cloruro de amonio. Esta última metodología respecto al fraccionamiento por densidad favorece la capacidad de clonado de la MSC *in-vitro*, dando un número y tamaño de CFU-F mayor, resulta-

dos que podrían ser consecuencia de la presencia de plaquetas en los aspirados de MO sometidos a la lisis de glóbulos rojos (99, 100), sin embargo la técnica usada de rutina continua siendo el aislamiento por gradiente de densidad.

La plasticidad de las células mesenquimales estromales (MSC y progenitores estromales) de MO no se modifica hasta el subcultivo número 40 (101). Sin embargo, con los subcultivos sucesivos las MSC y progenitores estromales comprometidos pueden transdiferenciarse y llegar a un estadio de SC intermedio llamado de transición entre la célula de naturaleza epitelial y mesenquimal (EMT/ MET) que favorecería la diferenciación a SC epiteliales, las cuales podrían dar origen al desarrollo de tumores, como se comentó al inicio de este trabajo, con lo cual es importante evitar el envejecimiento celular especialmente cuando se planea utilizar las células posteriormente para terapia clínica (21, 102). Estudios *in-vitro* realizados con MSC de tejido adiposo subcultivadas durante 4-5 meses han mostrado la aparición espontánea de ASC transformadas, con características de células neoplásicas como el incremento del porcentaje de células en fase S, la inestabilidad cromosómica, la disminución de los marcadores de las MSC como CD90 y CD105, la pérdida de la inhibición crecimiento por contacto en cultivos en medio de agar semi-sólido y cambios de la morfología típica elongada fusiforme a la pequeña y compacta (103). Más aún, SC neoplásicas han sido aisladas, caracterizadas y definidas en varios tipos de tumores como en el carcinoma mamario, el glioblastoma y las leucemias mieloides, proponiendo los autores de estos trabajos que dichas SC derivan de la ASC normal (104).

La regulación de los procesos de auto-renovación y diferenciación de la ASC, MSC y HSC, son muy complejos y dependen de múltiples factores tanto intrínsecos (genéticos) como extrínsecos (microambiente del tejido específi-

co). La pérdida del equilibrio entre auto-renovación y diferenciación da lugar a un crecimiento celular descontrolado y/o a un incremento en la maduración de los distintos progenitores comprometidos, lo que da como resultado la aparición de tumores malignos y benignos, así como defectos tisulares. La posibilidad de expandir las MSC y su multipotencialidad, aumentó el interés clínico de utilizarlas en condiciones muy estrictas de cultivo para la reparación de tejidos y terapia génica (41, 105).

La diferenciación de la MSC a osteocito, condrocito, adipocito y células estromales es función de un número limitado de factores de crecimiento y nutrientes, mientras que la transdiferenciación por ejemplo a cardiomiocito, neurona y hepatocito es sumamente compleja, está compuesta de múltiples pasos y requiere la presencia de factores de crecimiento pre-condicionantes específicos y características precisas muy bien definidas (106).

El trasplante de MSC, así como su aceptación y diferenciación a células de los múltiples órganos dañados, ha sido demostrado en muchos modelos de animales y ensayos clínicos en humanos (11, 105, 107). Estos estudios indican que la MSC está preparada funcionalmente para reconocer el sitio de injuria y transformarlo en un tejido apropiado funcionalmente. Sin embargo, no se conoce hasta el momento en forma concluyente el mecanismo que induce el "homing" de la MSC en el tejido específico dañado y la diferenciación y/o la reparación del tejido dañado por la liberación de distintas quimoquinas y factores solubles (tales como FGF, EGF, PDGF, VEGF, SDF-1, IL-6, TGF β), componentes de matriz (tales como fibronectina y ácido hialurónico), MMPs (tales como MMP2 y MMP9), etc. (108-112). Por lo tanto, un mejor y más profundo entendimiento de la biología de la MSC y el resto de las SC (ESC, FSC, IPS, MSC y progenitores endoteliales) es necesario para establecer un criterio eficiente para su potencial uso clínico (108).

Respecto a la diferenciación *in vitro* de la MSC en adipocitos, osteocitos y condrocitos, se han realizado grandes avances en los últimos años (35, 107). La presencia de factores solubles en los medios de cultivo es esencial, por ejemplo: TGF- β y BMP son necesarios para la formación del cartílago, fuente de fosfato orgánico es necesario para la osteogénesis y estímulos hormonales para la adipogénesis (106). Sin embargo, un medio adecuado no es suficiente para alcanzar la diferenciación pues, como señalamos anteriormente, dentro de un clon de MSC pueden existir células hijas de diferente potencialidad: multi, oligo o unipotenciales. Por lo tanto, algunas podrían dar *in vitro* osteocitos, condrocitos y adipocitos y otras sólo 2 tipos celulares o quizás una MSC hija dar un sólo tipo celular. Además, el número de subcultivo en el que se encuentre la MSC también influye sobre el potencial de diferenciación (113). Esta última observación, posiblemente sea función de la densidad celular, de la distribución espacial de la MSC y de los componentes de la matriz extracelular presentes en el cultivo. Por ejemplo, la distribución tridimensional de la MSC en el cultivo es crítica para el desarrollo de cartílago, donde una suspensión de 100.000-200.000 MSC es centrifugada y el precipitado (cultivo en micromasa), es expuesto a TGF- β y BMP (114, 115). La presencia de ambos factores y la proximidad celular en la micromasa, inicia la cascada condrogénica integrada por moléculas extracelulares que desencadenan señales cortas como la unión a membrana de las glicoproteínas Wnt o señales inducidas por moléculas de adhesión como N-caderina y conexina (106).

El compromiso y diferenciación de la MSC a un tipo celular maduro específico es un proceso complejo y controlado temporalmente que involucra la actividad de varios factores transcripcionales, citoquinas, factores de crecimiento y componentes de matriz extracelular (35, 116-118). Durante la diferenciación

aumenta la expresión de genes, y al analizar la expresión génica del osteocito, adipocito y condrocito, se encontró un incremento en la expresión de 914, 947 y 52 genes en cada uno de los procesos de diferenciación respectivamente (106). Ocho genes son comunes a los tres linajes, 235 genes son comunes entre los procesos de adipogénesis y osteogénesis, 10 genes son comunes entre la adipogénesis y condrogénesis y sólo 3 genes son comunes entre condrogénesis y osteogénesis (106). El hecho que el osteoblasto y el adipocito compartan este amplio número de genes durante la adquisición de su fenotipo hizo pensar que ambas progenies podrían derivar de un precursor común (106). Sin embargo, hay otros autores que avalan la teoría de un precursor común osteo-condrogénico (119).

En relación a la capacidad migratoria de la MSC de MO, si bien hay diferentes experimentos que muestran su migración a distintos órganos dañados, pocos son los estudios que observan el "engraftment" de las MSC transplantadas de una MO alogénica en la MO del huésped. Estudios de cariotipo realizados en cultivos largos de MO del aceptor, post-aceptación del trasplante, simultáneo con CD34+ y MSC, muestran que las células estromales son del cariotipo del aceptor. Estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que las MSC son células mitóticamente quiescentes con un período de vida larga, y al ser infundidas podrían sobrevivir por un período largo antes de instalarse en MO (120, 121). El establecimiento ("homing") de las MSC endógenas o exógenas (vía local o sistémica-vascular) en un nicho específico es un proceso que implica la migración e incorporación de las MSC como componente del microambiente del tejido dañado o sitio de inflamación (17). En este proceso intervienen factores de migración de las MSC como SDF-1, TRAIL, RANKL, PDGF, IL-17, FGF básico, IFN- γ , IGF, TGF- β , EGF y EPO, los cuales son liberados en el sitio de injuria

por distintas células (células endoteliales, células tumorales, células del tejido afectado, etc.) y para los cuales es fundamental la presencia de receptores específicos para estos factores en las MSC como CXCR4, R de TRAIL (DR5 y DcR2), RANK, R de PDGF de tipo α y β , R de IL-17, FGF básico, IFN- γ , IGF, TGF- β , EGF y EPO respectivamente, entre otros (17, 122-128). Además, se sabe que las integrinas juegan un papel fundamental en la adhesión de la MSC circulante al endotelio vascular, migración y quimiotaxis de la misma al sitio comprometido; en especial las integrinas β -1 y α -4, así como la molécula de adhesión VCAM-1 y la MMP2. Es conocido el hecho de que la expresión de las mismas disminuye con los sucesivos subcultivos (17, 129-131). Algunos autores han demostrado que las integrinas α 4/ β 1 (VLA-4) serían importantes para la captura inicial, rodamiento sobre la superficie endotelial ("rolling") y transmigración de la MSC transplantada a MO (17, 132).

Finalmente, las MSC son útiles para ser trasplantadas cuando se cumplen ciertos criterios como son: diferenciarse a un linaje específico, sobrevivir en el hospedante luego del trasplante, integrarse al microambiente del tejido específico a formar, cumplir una función adecuada en el huésped durante su vida, evitar la reacción del injerto contra el huésped (GVHD), tener alto poder proliferativo y generar una suficiente cantidad del tejido dañado.

■ LAS FUNCIONES Y CARACTERÍSTICAS DE LAS MSC DE MO PUEDEN RESUMIRSE COMO:

1- *Regulación de la hematopoyesis*: las MSC favorecen la auto-renovación, proliferación y diferenciación de las HSC y de los progenitores hematopoyéticos comprometidos a través de la formación de un estroma medular verdadero. Son importantes en la recuperación hematopoyética post-quimio y/o radioterapia a altas dosis, fundamentalmente por acelerar la formación

de plaquetas (110, 133-136).

2- *Plasticidad o multipotencialidad y activación del nicho microambiental del tejido injuriado*: las MSC de MO poseen capacidad de auto-renovación, diferenciación y transdiferenciación dando origen a células de origen endodérmico, mesodérmico y neuroectodérmico siendo, por lo tanto, importante su uso en la terapéutica celular para la reparación de tejidos. Sin embargo, como se describió anteriormente los mecanismos de reparación no están totalmente definidos, existiendo diferentes posibilidades: una es la plasticidad y la otra mejorar el microambiente del tejido u órgano injuriado a través de la liberación de componentes de matriz, factores de crecimiento, citoquinas, MMPs y TIMPs que favorezcan finalmente los procesos, por ejemplo, de vascularización y estimulación de las ASC y progenitores específicos del nicho injuriado (108-110, 112, 137). Numerosos reportes experimentales pre-clínicos y en humanos indicaron que tanto la administración local como sistémica de MSC, favoreció en un alto porcentaje de casos al menos en forma transitoria la mejoría en patologías como osteogénesis imperfecta, infarto, lesión de médula espinal u otros desórdenes neurológicos como Parkinson, injuria pulmonar y renal aguda, diabetes y desórdenes gastrointestinales como la enfermedad de Crohn (18, 108, 110, 138-150).

Recientes estudios mostraron que el beneficio de la terapia celular con MSC en las patologías antes descritas no sólo se limita a los mecanismos de diferenciación y transdiferenciación, ni a la liberación de factores parácrinos, sino que se suma a esto el efecto anti-inflamatorio de estas células sobre los nichos tisulares injuriados (151, 152).

El único riesgo que no puede ser olvidado cuando se utiliza este tipo de terapia celular, es que las MSC, como se indicó anteriormente, pueden favorecer *in-vivo* el crecimiento tumoral (153).

3- *Inmunogenicidad*: las MSC

presentan baja inmunogenicidad pues tienen mínima expresión constitutiva de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y los antígenos HLA de clase II son expresados solamente en un número muy reducido de MSC (154). La expresión de HLA de clase II se modifica en función del grado del proceso inflamatorio. A bajas concentraciones de IFN- γ , la expresión de HLA de clase II se mantiene en las MSC y a altas concentraciones disminuye (155). Se encontró también ausencia de moléculas co-estimuladoras como CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), CD40 y CD40L (156, 157).

4- *Inmunosupresión*: las MSC favorecen la aceptación de diferentes trasplantes de órganos, disminuyendo la reacción de injerto contra huésped y la sintomatología de las enfermedades autoinmunes como la encefalitis autoinmune, diabetes tipo I, etc. (17, 158-163). Las MSC disminuyen en la célula dendrítica (DC1) la producción de TNF- α y estimulan en la DC2 la liberación de IL-10 (164). A su vez, las MSC disminuyen la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD40 y CD86 en DC maduras (165) e inhiben la diferenciación dendrítica de los monocitos a través de la liberación de IL-6, M-CSF GM-CSF y PGE2 (166-169). Además, inhiben en los linfocitos (L) T colaboradores de tipo Th1 y en las NK la liberación de IFN- γ , así como también disminuyen en los LTh1 la producción de TNF- α e inducen en los linfocitos Th2 la liberación de IL-4 (164). Hay muchas evidencias que muestran que la inhibición de la funcionalidad de las NK es mediada por IDO, PGE2 y TGF β liberada por las MSC (17, 164). La IL-6 y el VEGF liberados por las MSC median el efecto inhibitorio de la proliferación del LT (CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$), así como otros mediadores solubles tales como la galectina-1, semaforina-3A, IDO, PGE2, TGF- β , IL-10, MMP-2/9 y moléculas de membrana como VCAM-1 (76, 161, 165, 170-173).

Por otro lado, se ha evaluado

que las MSC pueden promover *in-vitro* e *in-vivo* la generación de LT regulatorios CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$, los cuales presentan actividad supresora (161, 174), así como favorecer la proporción de LT CD4 $^{+}$ /CD25 $^{+}$ /CTLA4 $^{+}$ y LT CD4 $^{+}$ /CTLA4 $^{+}$ en presencia de IL-2 o en un cultivo mixto de linfocitos (164, 174). Más aún, las MSC pueden producir BMP-2, la cual media la inmunosupresión por inducir la generación de LT regulatorios CD8 $^{+}$ (175). Sin embargo, algunos autores encontraron datos contradictorios respecto a la inducción de LT regulatorios por acción de las MSC *in-vivo* (176, 177).

Otros autores han encontrado que las MSC de MO inhiben *in-vitro* la proliferación de los LB de sangre periférica a través del arresto de los mismos en la fase G0/G1 del ciclo celular (178). Más aún, se observó que las MSC disminuyen la expresión de receptores de quimoquinas en los LB, lo que sugiere una disminución de la capacidad de migración de estas células al sitio de inflamación (178).

Todas las propiedades descritas en el apartado 1, 2 y 3 de las MSC pueden ser favorecidas por modificaciones genéticas de estas ASC, combinando lo mejor de ambas terapias (celular y génica) para el tratamiento de desórdenes multi o monogénicos (179).

5- *Inmunoestimulación*: existen evidencias de que un bajo número de MSC induce la respuesta inmune, mientras que un exceso de MSC tienen efecto inhibitorio (180). Por ejemplo su efecto estimulante se evidenció en el aumento de producción de IgG y de IFN- γ (181).

En relación a todas las observaciones anteriores, Waterman RS y colaboradores (152) han descrito recientemente que las MSC humanas pueden ser polarizadas en base a las señales "*downstream Toll-like receptors (TLR) signaling*" en dos tipos de subpoblaciones homogéneas con distinto fenotipo activo que clasificaron como MSC1 y MSC2. Las MSC1 liberan mediadores pro-inflamatorios (IL-6, IL-8, etc.) y las MSC2 liberan más mediadores con

efecto inmunosupresor (IL-10, IDO, TSG6, etc.) a través de la acción de TLR4 y TLR3, respectivamente. Esta diferencia entre MSC1 y MSC2 no solo se limita a los mediadores solubles (citoquinas) sino también a los componentes de matriz extracelular pues TLR4 favorece en MSC1 los depósitos de colágeno y TLR3 en MSC2 los depósitos de fibronectina, así mismo la activación de TLR3 inhibe la triple diferenciación de las MSC (osteogénica, adipogénica, condrogénica) y la activación de TLR4 inhibe la diferenciación adipogénica, estimula la osteogénica y no modifica la condrogénica. Por último, ambos TLR al activarse favorecen la migración y capacidad invasiva de las MSC1 y 2 pero se reportó que la mayor liberación de quimoquinas (CCL5 o RANTES y CCL10 o IP-10) es post-activación de TLR3. Por lo tanto, a partir de todos estos resultados relacionados con TLR3 y 4 surge que se los debería considerar muy seriamente al momento de seleccionar una subpoblación de MSC humanas para ser utilizada en la terapia regenerativa e inmunosupresora con este tipo de ASC.

Por último, en relación al futuro de la terapia regenerativa con MSC, Helmy K.Y. y colaboradores reportan el uso de MSC para transplantes en humanos, en 105 casos de "clinical trials" registrados por la FDA [US Food and Drug Administration, www.clinicaltrials.gov] (18). Como los estudios clínicos de Fase I y II están siendo aún llevados a cabo y abarcan un número reducido de pacientes, los resultados disponibles hasta el momento son satisfactorios y no sugieren mayores riesgos, pero se debe esperar más tiempo para obtener conclusiones definitivas. Las MSC usadas para transplante en este estudio fueron: 51% de MO, 7% de tejido adiposo, 5% de sangre de cordón umbilical, y 3% de otras fuentes como son sangre periférica e hígado. El 48% de estos transplantes fueron realizados con MSC autólogas, el 42% con alogénicas y el 10 % restante no fue registrado. Las MSC de este

trabajo fueron testeadas para tratar diferentes patologías como: desórdenes musculoesquelético (24 trials), cardíacos (16), reacción injerto contra huésped (GVHD, 14), inflamatorios como la enfermedad de Crohn (9), neurológicos (8), desórdenes de hígado y cirrosis (7), diabetes tipo I y II (7), rechazo de órganos transplantados (6) y otras condiciones patológicas (16). Sin embargo, pese a los múltiples estudios experimentales y pre-clínicos realizados en la última década, un gran número de preguntas relacionadas con la biología de la MSC quedan por resolver. Y las mismas están relacionadas con su supervivencia, su capacidad de "homing post-transplante", la relación entre su fenotipo inmune y su función como tal, su forma de administración sistémica o local, el tipo de MSC autóloga u alogénica y si sus propiedades de auto-renovación, diferenciación y transdiferenciación se mantienen post-transplante. Por lo tanto, de las preguntas expuestas se concluye la necesidad de continuar avanzando en los conocimientos de la biología de la MSC para acortar la distancia entre la esperanza de su potencial uso en la clínica y su real aplicación terapéutica.

■ GLOSARIO

Canales de Hering: también llamados ductulos intrahepáticos de la bilis o colangiolos, se encuentran en la parte más proximal de las vías biliares entre los canalículos biliares y los conductos biliares interlobulares, cerca del borde externo del lóbulo clásico del hígado. Histológicamente se hallan limitados por hepatocitos y células ductulares. Son importantes durante la regeneración hepática, la cual se produce normalmente a través de la activación de células maduras. Cuando el daño hepático es demasiado extenso, se produce la activación de células progenitoras ubicadas en el canal de Hering, que dan origen a las células ovals. Estas células progenitoras incompletamente diferenciadas re-

tienen la capacidad bipotencial para diferenciarse a hepatocitos y/o células epiteliales biliares.

Caracterización fenotípica: descripción de los elementos particulares y específicos que hacen único al organismo en cuestión. Estas características detectables se encuentran determinadas por una interacción entre el genotipo y el medio. En el caso particular arribado en este trabajo los elementos particulares y específicos a describir que definen a una determinada célula son moléculas de superficie (proteínas o glicoproteínas) como por ejemplo los clusters de diferenciación (CD).

Citoquinas o citocinas: son proteínas de bajo peso molecular que actúan como potentes mensajeros químicos regulando la función de las células que las producen o de otros tipos celulares, a través de la activación transitoria de receptores específicos de membrana. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular. Son capaces de inducir proliferación, maduración y diferenciación celular (como ocurre durante la hematopoyesis o la angiogénesis), favorecer la quimiotaxis y también modular la secreción de sustancias anti- o pro-inflamatorias e inmunoglobulinas, regulando en este último caso la respuesta inmune local o sistémica. Son producidas por diferentes tipos celulares del sistema inmune (macrófagos, linfocitos T, "natural killer") y por células no inmunes (fibroblastos, células endoteliales, etc.). Dentro de esta definición se agrupan: interleuquinas, quimoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral, entre otros.

Desdiferenciarse: capacidad de las células comprometidas con un linaje específico de volver a estadios previos de diferenciación; incluso al completamente indiferenciado con propiedades, en este caso, de células madres como ser la auto-renovación y plasticidad hacia el mismo o distinto linaje del que provenía anteriormente.

Diferenciarse: capacidad de una célula madre de continuar una vía

de diferenciación y, por lo tanto, producir células maduras y funcionales de uno o varios linajes específicos, según su multipotencialidad, que darán luego lugar al tejido maduro correspondiente.

“Engraftment”: vocablo en inglés que admite como traducción: prendimiento o incorporación del injerto. Hace referencia al proceso por medio del cual células transplantadas o transfundidas (por ejemplo: células madre hematopoyéticas y mesenquimales luego de un trasplante de médula ósea) se establecen en forma firme y permanente, comenzando a proliferar y diferenciarse como tales dentro del receptor.

Fase G0/G1: las células que han entrado en el conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de las mismas y división de cada una en dos células hijas, conocido como ciclo celular, se denominan “proliferantes” y las que se encuentran en fase G0 se llaman células quiescentes. El ciclo celular es controlado por un sistema que vigila cada paso realizado. En regiones concretas del ciclo, la célula comprueba que se cumplan las condiciones para pasar a la etapa siguiente: de este modo, si no se cumplen estas condiciones, el ciclo se detiene. El paso de G0 a G1: comienzo de la proliferación, es una de estas regiones concretas. Luego, G1 (del inglés Growth o Gap 1) hace referencia a la primera fase propiamente dicha del ciclo celular, en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN. Es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. Durante este tiempo la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular.

Fase S: es una de las etapas del ciclo celular y es aplicada a células en división. El estado S representa “Síntesis”. Cuando las células están en fase S ocurre la replicación del ADN.

Ficoll-Hypaque: el Ficoll, en

particular, es un polímero de carbohidrato y metrizamida (compuesto denso que contiene yodo) de alto peso molecular que contribuye a la viscosidad y el Hypaque es un componente orgánico iodinado que incrementa la densidad del medio. Bajo determinada fuerza centrífuga y tiempo adecuado, los granulocitos y eritrocitos componentes de la sangre, pasarán a través de la capa de Ficoll-Hypaque (densidad= 1.075 gr/cm³) hacia el fondo del tubo por su mayor densidad. Los linfocitos, los monocitos y los residuos de las plaquetas permanecerán en la interfase plasma/Ficoll-Hypaque. Un posterior lavado a velocidad lenta remueve la mayor parte de los residuos de plaquetas, con lo cual se obtiene una óptima separación por gradiente de densidad de células mononucleares (monocitos y linfocitos) con un alto grado de pureza. En el caso de partir de aspirados de médula ósea, los elementos que quedan en la interfase además de los mencionados son las células madres hematopoyéticas y mesenquimales, así como los precursores y progenitores tanto hematopoyéticos como mesenquimales.

Hematopoyético: tejido donde se forman, desarrollan y maduran los elementos formes de la sangre (*Hema = sangre, poyesis = producción, fabricación*) a partir de células madre hematopoyéticas o de precursores indiferenciados o, más adelante en la progenie, por progenitores hematopoyéticos con compromiso hacia los distintos linajes de células maduras presentes en la sangre: eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Matriz Extracelular: constituye un conjunto de macromoléculas, localizadas por fuera de las células, que en conjunto forman el ecosistema donde la célula realiza sus funciones vitales. Estas moléculas son sintetizadas por las mismas células o provienen del torrente sanguíneo. Las interacciones celulares con la matriz extracelular coordinan la organización tisular regulando la diferenciación y funcionalidad celular. La matriz extracelular juega un papel importante en muchos otros

procesos celulares tales como la adhesión y migración. También actúa como reservorio de factores de crecimiento y citoquinas, modulando de esta forma la activación de diferentes procesos celulares donde estos factores están involucrados. Las moléculas de la matriz extracelular (glicosaminoglicanos y proteínas fibrosas) son secretadas por las células estromales y luego se ensamblan para formarla. Los glicosaminoglicanos forman una sustancia hidratada en donde las proteínas fibrosas se encuentran embebidas dando, estas últimas, resistencia y ayudando a organizar la matriz.

Metaloproteinasas: son una familia de endopeptidasas dependientes de Zn⁺² con un amplio espectro de acción proteolítica ante numerosos componentes de la matriz extracelular. No sólo están involucradas en la remoción mecánica de proteínas estructurales de la matriz extracelular, sino también en la remoción y, por ende, activación de precursores de los factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular y otras proteínas bioactivas; lo cual las involucra indirectamente en la regulación de la proliferación, apoptosis, angiogénesis, invasión, metástasis y respuesta inmune.

Mielopoyesis: proceso por el cual se generan, desarrollan y maduran los componentes mieloides de la sangre a partir de las células madre hematopoyéticas de médula ósea. Los componentes mieloides son aquellos cuyo proceso de maduración en el adulto se inicia y completa en médula ósea (*Mielo = médula, poyesis = producción, fabricación*); en contraposición con aquellos cuyo proceso de diferenciación se puede producir fuera de la médula ósea y se denomina linfopoyesis.

Quimoquinas o quimocinas: familia de citoquinas relacionadas estructuralmente que poseen selectividad para activar y dirigir el tráfico de diferentes subpoblaciones de células inmunes y no inmunes, a través del aumento de la expresión de moléculas de adhesión intercelulares y la regulación de la afinidad de

esas moléculas de adhesión por sus respectivos ligandos. Promueven el reclutamiento dirigido o quimiotaxis de las células con receptores para ellas durante el proceso inflamatorio y muchas veces favorecen la activación y proliferación de sus células blanco, como en el caso de ciertos tipos de leucocitos. Proviene de variadas fuentes celulares y tienen acciones muy pleiotrópicas. Adicionalmente, se ha observado que las quimoquinas están involucradas en la hematopoyesis, angiogénesis, morfogénesis tisular, crecimiento tumoral y apoptosis.

Teratomas: la palabra "teratoma", del griego *teraton*, significa monstruo, y es empleada para describir una clase de tumor encapsulado que se forman a partir de las células pluripotentes. Comúnmente se hallan compuestos por múltiples tipos celulares derivados de uno o más de los tres linajes germinales. Los tejidos del teratoma, aunque son normales en sí mismos, pueden ser muy distintos de los tejidos que los rodean. Esta clase de tumor se clasifica según su grado de madurez y complejidad en: teratoma maduro (que normalmente es benigno), inmaduro (que es maligno) y mono-dermal o teratoma altamente especializado. Raras veces dentro de las lesiones quísticas benignas correspondientes a un teratoma maduro pueden encontrarse componentes escamosos que proceden a transformación maligna. Se forman normalmente en los ovarios de las mujeres, en los testículos de los hombres y en el hueso sacro de los niños.

"Toll-like receptors": expresión inglesa para: receptores de tipo Toll. Es un subconjunto importante de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en las células fagocíticas, los cuales son capaces de reconocer patrones moleculares expresados sobre la superficie de los patógenos (PAMP) que son conservados y compartidos por un gran grupo de agentes infecciosos. Son llamados receptores de tipo Toll por su similitud con el receptor Toll de la mosca de la fruta, *Drosophila*.

■ REFERENCIAS

- 1)- Wells JM, Melton DA. Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 393-410, 1999.
- 2)- Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cell. *Cell* 116: 639-648, 2004.
- 3)- La Russa VF, Schwarzenberger P, Miller A, et al. Marrow stem cells, mesenchymal progenitors cells, and stromal progeny. *Cancer Inves*. 20: 110-123, 2002.
- 4)- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function. *Cell* 105: 829-841, 2001.
- 5)- Aranda P, Agirre X, Ballestar E, et al. Epigenetic signatures associated with different levels of differentiation potential in human stem cells. *PLOS One* 4:e7809, 2009.
- 6)- Prindull G. Hypothesis: cell plasticity, linking embryonal stem cells to adult stem cell reservoirs and metastatic cancer cells? *Exp Hematol* 33: 738-746, 2005.
- 7)- Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat* 154: 8-20, 1995.
- 8)- Alison MR, Poulosom R, Forbes S, et al. An introduction to stem cell. *J Pathol* 197: 419-423, 2002.
- 9)- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113: 1161-1166, 2000.
- 10)- Aranguren XL, Luttun A, Clavel C, et al. In vitro and in vivo arterial differentiation of human multipotent adult progenitor cells. *Blood* 109: 2634-2642, 2007.
- 11)- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49, 2002.
- 12)- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109: 1291-1302, 2002.
- 13)- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147, 1999.
- 14)- Korbli M, Estrov Z. Adult stem cells for Tissue Repair-A new therapeutic concept?. *N Engl J Med* 349: 570-582, 2003.
- 15)- Bishop AE, Buttery LDK, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol* 197: 424-429, 2002.
- 16)- Drukker M, Katz G, Urbach A, et al. Characterization of expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 9864-9869, 2002.
- 17)- Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parkkadan B, et al. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 19: 667-679, 2010.
- 18)- Helmy KY, Patel SA, Silverio K, et al. Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. *Ther Deliv* 1: 693-705, 2010.
- 19)- Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, et al. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 103: 1647-1652, 2004.
- 20)- Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 67: 9142-9149, 2007.
- 21)- Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy* 12: 576-578, 2010.
- 22)- Linju Yen B, Yen Men-Luh. Mesenchymal stem cells and cancer-for better or worse? *J Cancer Molecules* 4: 5-9, 2008.
- 23)- Hyun I. The bioethics of stem cell research and therapy. *J Clin Invest* 120: 71-75, 2010.
- 24)- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
- 25)- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem

- cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920, 2007.
- 26)- Hyun I, Hochedlinger K, Jaenisch R, et al. New advances in iPS cell research do not obviate the need for human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 1: 367-368, 2007.
- 27)- Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, et al. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells* 19: 99-107, 2002.
- 28)- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in-vitro. *J Cell Physiol* 91: 335-344, 1978.
- 29)- Mayani H, Guilbert L, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 49: 225-233, 1992.
- 30)- Rougier F, Dupuis F, Denizot Y. Human bone marrow fibroblasts-an overview of their characterization, proliferation and inflammatory mediator production. *Hematol Cell Ther* 38: 241-246, 1996.
- 31)- Yamada M, Suzu S, Tanaka-Dozono M, et al. Effect of cytokines on the proliferation/ differentiation of stroma-initiating cells. *J Cell Physiol* 184: 351-355, 2000.
- 32)- Gregory CA, Singh H, Perry AS, et al. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 278: 28067-28078, 2003.
- 33)- Zorn AM. Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol* 11:R592-R595, 2001.
- 34)- Kortessidis A, Zannettino A, Isenmann S, et al. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 105: 3793-3801, 2005.
- 35)- Ng F, Boucher S, Koh S, et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112: 295-307, 2008.
- 36)- Tamama K, Fan VH, Griffith LG, et al. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 686-695, 2006.
- 37)- Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury Int J Care* 36S: 8-12, 2005.
- 38)- Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 13: 436-448, 2004.
- 39)- Bianco P, Robey PG, Saggio I, et al. Mesenchymal stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther*. 21:1057-1066, 2010.
- 40)- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 8:301-316, 2004.
- 41)- Zipori D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis* 33: 211-215, 2004.
- 42)- Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 56: 289-301, 1980.
- 43)- Ylostalo J, Bazhanov N, Prockop DJ. Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies. *Exp Hematol* 36:1390-1402, 2008.
- 44)- Jackson L, Jones DR, Scotting P et al. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 53: 121-127, 2007.
- 45)- Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16: 381-390, 1966.
- 46)- Friedenstein A, Gorskaja J, Kulagina N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4: 267-274, 1976.
- 47)- Friedenstein A, Chailakhyan R, Latsinik N, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17: 331-340, 1974.
- 48)- He Q, Wan C, Li G, et al. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 25: 69-77, 2007.
- 49)- Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, et al. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med*. 10: 165-181, 1999.
- 50)- Castro-Malaspina H. Myelofibrosis and the biology of connective tissue. *Prog Clin Biol Res*. Vol. 154. Berck PD, Castro Malaspina H, Wasserman LR Editors. Alan R. Liss Inc, New York; 1984.
- 51)- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. 20: 530-541, 2002.
- 52)- Bianco P, Robey PG. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105: 1663-1668, 2000.
- 53)- Docheva D, Popov C, Mutschler W, et al. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med* 11: 21-38, 2007.
- 54)- Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 110: 3438-3446, 2007.
- 55)- Dexter TM, Wright EG, Krizsa F, et al. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine* 27: 344-349, 1977.
- 56)- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells and stromal cells. *J Cell Physiol* 176: 186-192, 1998.
- 57)- Hofer EL, Chudzinski-Tavassi AM, Bullorsky E, et al. MMPs and TIMPs production by bone marrow stromal cells from normal individuals. *The Hematology Journal vol*

- 3, supp1, abst 0155, pg 57, 2002.
- 58)- Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther* 21: 1045-1056, 2010.
- 59)- Boiret N, Rapatel Ch, Veyrat-Masson R, et al. Characterization of non-expanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol* 33: 219-225, 2005.
- 60)- Kasper G, Glaeser JD, Geissler S, et al. Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior. *Stem Cells* 25: 1985-1994, 2007.
- 61)- De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, et al. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* 92: 440-449, 2007.
- 62)- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 226: 507-520, 2001.
- 63)- Van Overstraeten-Schlogel N, Beguin Y, Gothot A. Role of Stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur J Haematol* 76: 488-493, 2006.
- 64)- Schauwer CD, Meyer E, Walle GR, et al. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 2010 in press.
- 65)- Bühring HJ, Tremel S, Cerabona F, et al. Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci* 1176: 124-134, 2009.
- 66)- Zhou DH, Huang SL, Wu YF, et al. The expansion and biological characteristics of human mesenchymal stem cells. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 41: 607-610, 2003.
- 67)- Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)*. 47: 126-131, 2008.
- 68)- Bühring HJ, Battula VL, Tremel S, et al. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci* 1106: 262-271, 2007.
- 69)- Barry F, Boynton R, Murphy M, et al. The SH3 and SH4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 519-524, 2001.
- 70)- Wang R, Stromer MH, Huiatt TW, Integrin expression in developing smooth muscle cells. *J Histochem Cytochem* 46: 119-126, 1998.
- 71)- Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, et al. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 109:1743-1751, 2007.
- 72)- Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, et al. In Vitro High-Capacity Assay to Quantify the Clonal Heterogeneity in Trilineage Potential of Mesenchymal Stem Cells Reveals a Complex Hierarchy of Lineage Commitment. *Stem Cells* 28: 788-798, 2010.
- 73)- Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol* 36:1035-1046, 2008.
- 74)- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317, 2006.
- 75)- Kuçi S, Kuçi Z, Kreyenberg H, et al. CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica* 95: 651-659, 2010.
- 76)- Ren G, Zhao X, Zhang L, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 184: 2321-2328, 2010.
- 77)- Caplan AI, The mesengenic process. *Clin Plas Surg* 21: 429-435, 1994.
- 78)- Fibbe WE, Noort WA, Mesenchymal stem cells and Hematopoietic stem cells transplantation. *Ann NY Acad Sci* 996: 235-244, 2003.
- 79)- Mueller SM, Glowacki J, Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* 82: 583-590, 2001.
- 80)- Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med* 233: 901-913, 2008.
- 81)- Bieback K, Kern S, Kocaömer A, et al. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* 18 (1 Suppl):S71-6, 2008.
- 82)- Guillot PV, O'Donoghue K, Kurata H, et al. Fetal stem cells: betwixt and between. *Semin Reprod Med* 24: 340-347, 2006.
- 83)- Galotto M, Berisso G, Delfino L, et al. Stromal damage as consequence of high dose chemo-radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 27: 1460-1466, 1999.
- 84)- Li J, Kwong DL, Chan GC, The effects of various irradiation doses on the growth and differentiation of marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Pediatr Transplant* 11: 379-387, 2007.
- 85)- Benayahu D, The Hematopoietic Microenvironment: The Osteogenic Compartment of Bone Marrow: Cell Biology and Clinical Application. *Hematology* 4: 427-435, 2000.
- 86)- Mauney JR, Kaplan DL, Volloch V, Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion. *Biomaterials* 25: 3233-3243, 2004.
- 87)- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem Stem* 64: 295-312, 1997.
- 88)- Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, et al. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic li-

- neages. *J Hematother Stem Cell Res* 9: 841-848, 2000.
- 89)- Ramalho AC, Jullienne A, Couttet P, et al. Effect of oestradiol on cytokine production in immortalized human marrow stromal cell lines. *Cytokine* 16: 126-130, 2001.
- 90)- Kim DH, Yoo KH, Choi KS, et al. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* 31: 119-126, 2005.
- 91)- Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK, Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp Cell Res* 294: 458-468, 2004.
- 92)- Roodman GD, Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 350: 1655-1664, 2004.
- 93)- Khosla S, Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5055, 2001.
- 94)- Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 1704: 49-57, 2004.
- 95)- Demers LM, Bone markers in the management of patients with skeletal metastases. *Cancer* 97(3 Suppl): 874-879, 2003.
- 96)- Rose AA, Siegel PM, Breast cancer-derived factors facilitate osteolytic bone metastasis. *Bull Cancer* 93: 931-943, 2006.
- 97)- Talchman RS, Emerson S, The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells* 16: 7-15, 1998.
- 98)- Compston JE, Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* 173: 387-394, 2002
- 99)- Horn P, Bork S, Diehimann A, et al. Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy* 10: 676-685, 2008.
- 100)- Horn P, Bokermann G, Cholewa D, et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 12:888-98, 2010
- 101)- Tocci A, Forte L, Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 4: 92-96, 2003.
- 102)- Prockop DJ, Defining the probability that a cell therapy will produce a malignancy. *Mol Ther* 18:1249-50, 2010.
- 103)- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65: 3035-3039, 2005.
- 104)- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ, Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 895-902, 2003.
- 105)- Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL, One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci* 100: 11917-11923, 2003.
- 106)- Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ, Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironment "Niches" in culture: A two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci STKE* 294: pe 37, 2005.
- 107)- Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 306: 330-335, 2005.
- 108)- Matthay MA, Advances and challenges in translating stem cell therapies for clinical diseases. *Transl Res.* 156: 107-111, 2010.
- 109)- Prockop DJ, Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther.* 17: 939-946, 2009.
- 110)- Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, et al. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med.* 14: 2190-2199, 2010.
- 111)- Prockop DJ, "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin Pharmacol Ther.* 82: 241-243, 2007.
- 112)- Horwitz EM, Dominici M, How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? *Cytotherapy* 10: 771-774, 2008.
- 113)- Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, et al. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol* 36: 1176-1185, 2008.
- 114)- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4: 415-428, 1998.
- 115)- Tuli R, Tuli S, Nandi S, et al. TGF-beta mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem* 278: 41227-41236, 2003.
- 116)- Song L, Webb NE, Song Y, et al. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 24: 1707-1718, 2006.
- 117)- Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* 5: 442-447, 2009.
- 118)- Augello A, De Bari C, The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther.* 21: 1226-1238, 2010.
- 119)- Muraglia A, Corsi A, Riminucci M, et al. Formation of a chondroosseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells. *J Cell Science* 116: 2949-2955, 2003.
- 120)- Simmons PJ, Przepiorka ED, Tomas B, et al. Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature* 328: 429-432, 1987.
- 121)- Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, et al. Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Hematol* 84: 722-727, 2005.
- 122)- Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA et al. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol.* 137: 491-502, 2007.
- 123)- Ponte AL, Marais E, Gallay N, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor che-

- motactic activities. *Stem Cells*. 25: 1737-1745, 2007.
- 124)- Schmidt A, Ladage D, Schinköthe T, et al. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 1750-1758, 2006.
- 125)- Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 27: 2614-2623, 2009.
- 126)- Alphonso A, Alahari SK, Stromal cells and integrins: conforming to the needs of the tumor microenvironment. *Neoplasia* 11: 1264-1271, 2009.
- 127)- Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 24: 1030-1041, 2006.
- 128)- Koh SH, Noh MY, Cho GW, et al. Erythropoietin increases the motility of human bone marrow-multipotent stromal cells (hBM-MSCs) and enhances the production of neurotrophic factors from hBM-MSCs. *Stem Cells Dev*. 18: 411-421, 2009.
- 129)- Steingen C, Brenig F, Baumgartner L, et al. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 44: 1072-1084, 2008.
- 130)- Rüter B, Göttig S, Ludwig RJ, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 108: 3938-3944, 2006.
- 131)- Karp JM, Leng Teo GS, Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4: 206-216, 2009.
- 132)- Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW, et al. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood* 87: 73-82, 1996.
- 133)- Eaves CJ, Cashman JD, Sutherland HJ, et al. Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. *Ann NY Acad Sci*. 628: 298-306, 1991.
- 134)- Whetton AD, Dexter TM, Influence of growth factors and substrates on differentiation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 5: 1044-1049, 1993.
- 135)- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131: 324-336, 2008.
- 136)- Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 18: 307-316, 2000.
- 137)- Parekkadan B, Milwid JM, Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng*. 12: 87-117, 2010.
- 138)- Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for non-hematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci*. 95: 1142-1147, 1998.
- 139)- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci*. 99: 8932-8937, 2002.
- 140)- Krause U, Harter C, Seckinger A, et al. Intravenous delivery of autologous mesenchymal stem cells limits infarct size and improves left ventricular function in the infarcted porcine heart. *Stem Cells Dev*. 16: 31-37, 2007.
- 141)- Alaiti MA, Ishikawa M, Costa MA, Bone marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative cardiovascular therapy. *Transl Res*. 156: 112-129, 2010.
- 142)- Schwarz SC, Schwarz J. Translation of Stem Cell-Therapy for neurological diseases. *Trans Res* 156: 155-160, 2010.
- 143)- Chopp M, Li Y, Zhang ZG. Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. *Stroke*. 40 (3 Suppl): S143-145, 2009.
- 144)- Sueblinong V, Weiss DJ, Stem cells and cell therapy approaches in lung biology and diseases. *Transl Res*. 156: 188-205, 2010.
- 145)- Lee JW, Fang X, Gupta N, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci*. 106: 16357-16362, 2009.
- 146)- Tögel F, Westenfelder C, Stem cells in acute kidney injury repair. *Minerva Urol Nefrol*. 61: 205-213, 2009.
- 147)- Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 20: 1053-1067, 2009.
- 148)- Lee RH, Seo MJ, Reger RL, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci*. 103: 17438-17443, 2006.
- 149)- Ezquer F, Ezquer M, Simon V, et al. Endovenous administration of bone-marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells prevents renal failure in diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 15: 1354-1365, 2009.
- 150)- Shaker A, Rubin DC, Intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche. *Transl Res*. 156: 180-187, 2010.
- 151)- Abrams MB, Dominguez C, Pernold K, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells attenuate chronic inflammation and injury-induced sensitivity to mechanical stimuli in experimental spinal cord injury. *Restor Neurol Neurosci* 27: 307-321, 2007.
- 152)- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, et al. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory

- MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5: e10088, 2010.
- 153)- Kidd S, Spaeth E, Klopp A, et al. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy* 10: 657-667, 2008.
- 154)- Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, et al. Veto like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigen and recall antigens. *J Immunol* 171: 3426-3434, 2003.
- 155)- Chan JL, Tang KC, Patel AP, et al. Antigen presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon γ . *Blood* 107: 4817-4824, 2006.
- 156)- Patel SA, Sherman L, Munoz J, et al. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp* 56: 1-8, 2008.
- 157)- Nauta AJ, Fibbe WE, Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 11: 3499-3506, 2007.
- 158)- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363: 1439-1441, 2004.
- 159)- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371: 1579-1586, 2008.
- 160)- Li H, Guo Z, Jiang X, et al. Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. *Stem Cells* 26: 2531-2541, 2008.
- 161)- Le Blanc K, Ringdén O, Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.* 262: 509-525, 2007.
- 162)- Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 1: 2, 2010.
- 163)- Uccelli A, Prockop DJ, Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases? *Curr Opin Immunol.* 22: 768-774, 2010.
- 164)- Aggarwal S and Pitterger M, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune responses. *Blood* 105: 1815-1822, 2005.
- 165)- Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an IL-6 dependent mechanism. *Stem Cells* 25: 2025-2032, 2007.
- 166)- Jiang X, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105: 4120-4126, 2005.
- 167)- Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, et al. Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD 83 mRNA. *J Exp Med* 191: 1581-1590, 2000.
- 168)- Chen L, Zhang W, Yue H, et al. Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. *Stem Cells Dev.* 16: 719-731, 2007.
- 169)- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, et al. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 177: 2080-2087, 2006.
- 170)- Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (IL-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 60: 307-315, 2004.
- 171)- Lepelletier Y, Lecourt S, Renand A, et al. Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev.* 19: 1075-1079, 2010.
- 172)- Ren G, Su J, Zhang L, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 27: 1954-1962, 2009.
- 173)- Ding Y, Xu D, Feng G, et al. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes* 58: 1797-1806, 2009.
- 174)- Maccario R, Podestá M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90: 516-525, 2005.
- 175)- Djouad F, Ponce P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837-3844, 2003.
- 176)- Parekkadan B, Tilles AW, Yarmush ML, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory T cells. *Stem Cells* 26: 1913-1919, 2008.
- 177)- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106: 1755-1761, 2005.
- 178)- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B cell functions. *Blood* 107: 367-372, 2006.
- 179)- Myers TJ, Granero-Molto F, Longobardi L, et al. Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 10: 1663-1679, 2010.
- 180)- LeBlanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulated mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 57: 11-20, 2003.
- 181)- Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B et al. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* 65: 336-343, 2007.