



Instituto Politécnico Nacional
Secretaría de Investigación y Posgrado
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

Programa de Especialidad en Hematopatología

“Caracterización biológica de las células mesenquimales”

TESINA

Que como uno de los requisitos para obtener el diploma de
Especialidad en Hematopatología

Presenta:

Biol. Exp. Ivonne Flores Vasconcelos

Directora: M en C. Martha Lilia Cassani Galindo

México, D. F.,

2010

DEDICATORIA

A mis hijas, Ivana y Romina por darme la fuerza y el aliento para continuar con mi formación académica.

A mi amor, por su paciencia y su confianza.

A mis padres y suegros por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores de la especialidad, que me enseñaron que en cualquier momento de la vida, se debe seguir aprendiendo, para ser una mejor profesionista y sobre todo un buen ser humano.

INDICE

Índice	ii
Abreviaturas	iii
Índice de figuras y tablas	iv
Resumen	v
Objetivos	1
Justificación	1
Introducción	2
Desarrollo	4
Conclusiones	44
Bibliografía	45

ABREVIATURAS

AGM	Aorta Gónada Mesonefros
CFU-F	Unidad formadora de colonias de fibroblastos
CMH	Célula madre hematopoyética
CMM	Célula madre mesenquimal
CMN	Celulas mononucleares
COX	Ciclooxigenasa
CREB	Elemento de unión de respuesta a AMPc
CSF-M	Factor estimulante de colonias de monocitos
DMEM	Medio Eagle modificado Dulbecco
ERM	Proteinas de enlace membrana-citoesqueleto
GPI	Glicosil-fosfatidilinositol
HGM-F	Factor de crecimiento de hepatocito
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IBMX	Isobutilmetilxantina
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IGF-1	Factor de crecimiento de Insulina-1
IMDM	Medio Iscove modificado Dulbecco
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia celular
LPS	Lipopolisacáridos
M O	Médula ósea
MKP-1	mitogen- proteín kinasa
MLC	Cultivo Mixto de Linfocitos
PAI	Inhibidor del acticador del plasminógeno
PBL	Linfocitos de sangre periférica
PBMC	Celulas mononucleares de sangre periférica
PGE2	Prostaglandina E2
PPAP-g	Proliferador Peroxisoma-g
RML	Reacción Mixta de Linfocitos
SFB	Suero fetal bovino
TGF-b1	Factor de crecimiento transformante b1
TNF	Factor de necrosis tumoral

Índice de Figuras y Tablas

Figuras

1.	Multipotencialidad de las CMM	4
2.	CMM en la M.O	7
3.	Migración selectiva de las CMM	9
4.	Inmunohistoquímica de cultivos de CMM de M.O	11
5.	Diferenciación osteogénica de CMM <i>in vitro</i>	22
6.	Proceso molecular de diferenciación osteogénica de CMM	23
7.	Diferenciación adipogénica <i>in vitro</i> de CMM	24
8.	Cascada de activación de la diferenciación adipogénica de CMM	27
9.	Diferenciación condrogénica de CMM	29
10.	Proceso molecular de condrogénesis de CMM	30
11.	Mecanismo de interacción entre las CMM y el sistema inmunológico	39
12.	Usos clínicos de las CMM	41

Tablas

1.	Eventos de adhesión celular a un sustrato	12
2.	Proteínas expresadas por las CMM	13
3.	Componentes de hueso	20
4.	Efectos inmunosupresores de las CMM	32

RESUMEN

Las células madre mesenquimales pertenecen al selecto grupo de células madre de tejido adulto. Poseen un gran potencial de diferenciación a diversos tejidos mesenquimales como hueso, cartílago, estroma y tejido graso. Reportes recientes de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado una mayor plasticidad celular, ya que son capaces de originar células endoteliales, musculares e incluso neuronales. Las células madre mesenquimales son capaces de migrar hacia los sitios de daño, inflamación y tumores. Estas propiedades las hacen ideales para el uso en medicina regenerativa y en terapia celular. En este trabajo se presenta una visión general de su biología, fuentes de obtención y mecanismos de inmunomodulación.

OBJETIVOS

- Conocer los avances recientes en el campo de las células mesenquimales como línea celular y establecer si hay o no diferencias según su fuente de obtención.

- Conocer los mecanismos de diferenciación de las células madre mesenquimales (CMM) *in vitro*, para su aplicación en terapia regenerativa.

- Conocer los procesos por los cuales la CMM realizan la inmunomodulación celular.

JUSTIFICACIÓN

Las células madre mesenquimales presentan plasticidad lo que las hace ideales para ser utilizadas en terapia celular y regeneración de tejidos, así como un privilegio inmune que resulta atractivo para su uso terapéutico, desde su descubrimiento hace 40 años se han realizado diversos trabajos de investigación sobre su biología, procesos de diferenciación celular, así como de las moléculas que participan conjuntamente con ellas para lograr sus funciones de inhibición y proliferación celular.

INTRODUCCION

Las células madre mesenquimales son un grupo específico de células que muestran un potencial proliferativo elevado con dos características fundamentales: son capaces de auto renovarse, es decir, de formar células idénticas a las de origen, con capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo (1).

Dependiendo de su origen, las células madre o troncales pueden dividirse en troncales embrionarias y somáticas. Las células madre embrionarias son pluripotenciales, es decir cada una de ellas es capaz de generar todos los tipos celulares del organismo, las células madre somáticas son, en su mayoría, multipotenciales ya que pueden generar una gran variedad de tipos celulares dentro de un tejido específico (1).

El estudio de las células madre embrionarias se ha visto interrumpido en muchos países por la enorme controversia ética que representa, el ser generadas durante los primeros estadios del desarrollo embrionario (2).

Por otra parte, en los últimos años, ha crecido el interés por las células madre somáticas de múltiples tejidos humanos, ya que además de ser enorme el interés biológico, éstas no representan ningún reto ético y muchas veces se obtienen de tejidos que son desechados, como la placenta o la sangre de cordón umbilical (2).

El estudio de las CMM comenzó en la década de los años 70's y se enfocó al conocimiento de su papel en la formación del estroma hematopoyético.

Gracias a diversos estudios que han mostrado el amplio potencial de diferenciación de las CMM hacia tejidos neuronales y musculares, estas células han cobrado mayor importancia en la última década.

Las células madre mesenquimales fueron caracterizadas inicialmente entre las décadas de los años 60's y 70's con los trabajos realizados por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos **(2)**. En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia celular o (ISCT) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales (CMM); 1° adherencia en cultivo; 2°, expresión de los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y 3°) capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblasto, adipocito y condrocito bajo condiciones estándar de cultivo (3).

En adición a lo propuesto por ISCT, también se debe tomar en cuenta dos aspectos importantes para clasificarlas como células madre; que las (CMM) realicen procesos de autorrenovación, es decir, que durante la división celular solo una de las células hijas inicie programas de diferenciación celular, y que sean capaces de desarrollar plasticidad clonogénica o diferenciación hacia tejidos de capas embrionarias diferentes a mesodermo como ectodermo y endodermo; de lo contrario sería necesario clasificarlas más como progenitoras tempranas que como células madre (Figura 1) (2,4).

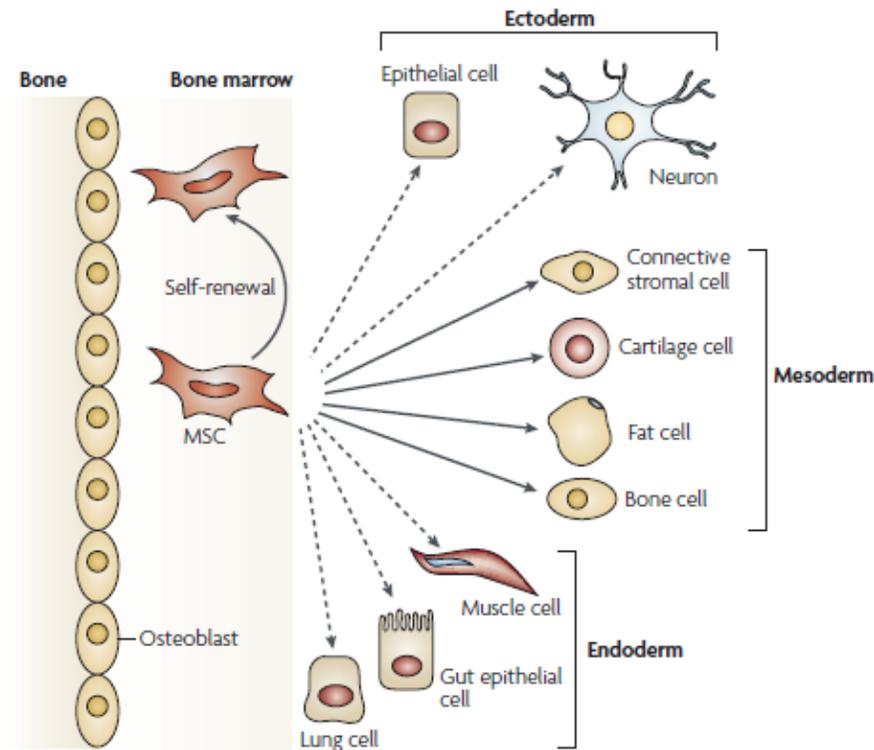


Fig.1. La multipotencialidad de las CMM. Se muestra la capacidad de las CMM, en la médula ósea para auto renovarse y diferenciarse hacia el linaje mesodérmico. La habilidad para transdiferenciarse en células de otros linajes se muestra en líneas punteadas. (4)

DESARROLLO

ONTOGENIA DE LAS CELULAS MESENQUIMALES

Durante la fecundación el óvulo y espermatozoide fusionan sus núcleos haploides y forman el cigoto que se divide mitóticamente dando origen a dos células hijas; las cuales entran a la etapa de segmentación donde cada una de ellas sufre divisiones mitóticas produciendo más células hijas a las que se les denomina blastómeras, las cuales van disminuyendo de tamaño en cada división. Después de la tercera división las blastómeras se compactan formando un conjunto apretado de células organizadas en una capa interna y otra externa. La mórula está constituida por 16 blastómeras, que ingresan a la cavidad uterina 3 ó 4 días después de la fecundación, momento en el cual en la mórula se forma una cavidad

constituyendo el blastocisto. La capa interna de células es la que se convertirá en el embrión propiamente dicho y se sitúa en un polo del blastocisto, mientras que la masa celular externa formará el trofoblasto (5).

En la tercera semana después de la fecundación ocurre la gastrulación que comienza con la aparición de la línea primitiva presentando un nódulo en su extremo cefálico; las células del epiblasto migran hacia la línea primitiva donde se desprenden y deslizan hacia abajo invaginándose. Cuando esto ha ocurrido, algunas de estas células se desplazan hacia el hipoblasto dando lugar al endodermo embrionario, otras se ubican entre el endodermo embrionario y el epiblasto formando el mesodermo, y por último, las células que quedan en el epiblasto son las que constituirán el ectodermo. Estas tres capas embrionarias serán la fuente de todos los tejidos y órganos del embrión (5).

De la tercera a la octava semana de gestación denominado período embrionario, se formarán los tejidos y órganos específicos del embrión. Las células madre mesenquimales provienen de la hoja germinativa mesodérmica que formará tres capas i) lámina lateral, ii) mesodermo praxial y iii) mesodermo intermedio (5).

La lámina lateral del mesodermo se separa en dos hojas, la parietal y la visceral. La primera junto con el ectodermo formará las paredes corporales lateral y ventral; La hoja visceral formará junto con el endodermo la pared del intestino. El mesodermo praxial dará origen al mesénquima cefálico formando el piso de la caja craneana y una pequeña porción de la región occipital, todos los músculos voluntarios de la región craneofacial, la dermis y tejidos conectivos de la región dorsal de la cabeza. El mesodermo intermedio forma los nefrotomos que son cúmulos celulares de disposición segmentaria que darán origen al sistema urogenital (5).

Las células madre hematopoyéticas (CMH) y células madre mesenquimales se originan en el mesodermo intermedio que rodea a la aorta en una región

denominada aorta-gónada-mesonefros (AGM). Las CMH migrarán a hígado donde cumplirán funciones de hematopoyesis fetal, y luego colonizarán la médula ósea que es el tejido definitivo junto con las células madre mesenquimales. La región AGM posee el microambiente necesario para alojar a las CMH, y teniendo en cuenta que son las CMM quienes proveen este microambiente estimulando una coordinación funcional con las CMH se estima la presencia de CMM en esta región (6,5 ,7 ,8).

Algunos estudios han reportado la presencia de mesangioblastos (progenitores mesenquimales) al día 9 en la aorta de embriones de ratones, con potencial de diferenciación en linajes de tipo mesodérmicos hematopoyéticos y no hematopoyéticos; este hecho sugiere que dichas células son las precursoras de los progenitores mesenquimales encontrados en la región AGM al día11 del embrión (7,9).

FUENTES DE OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales (CMM) residen en diferentes tejidos, las primeras se aislaron a partir de médula ósea (M.O) aproximadamente hace cuatro décadas, desde entonces se ha considerado a éste tejido como su principal fuente de obtención, debido a la eficiencia del aislamiento y potencial de diferenciación en condroblastos, adipoblastos y osteoblastos entre otros (10).

En la médula ósea las células mesenquimales se encuentran inmersas en el estroma y proveen soporte estructural y funcional para la realización de la hematopoyesis; aquí estas células residen en su propio nicho, son capaces de auto - renovarse y generar células estromales maduras que contribuyen con el microambiente de la M O (Fig.2) (1).

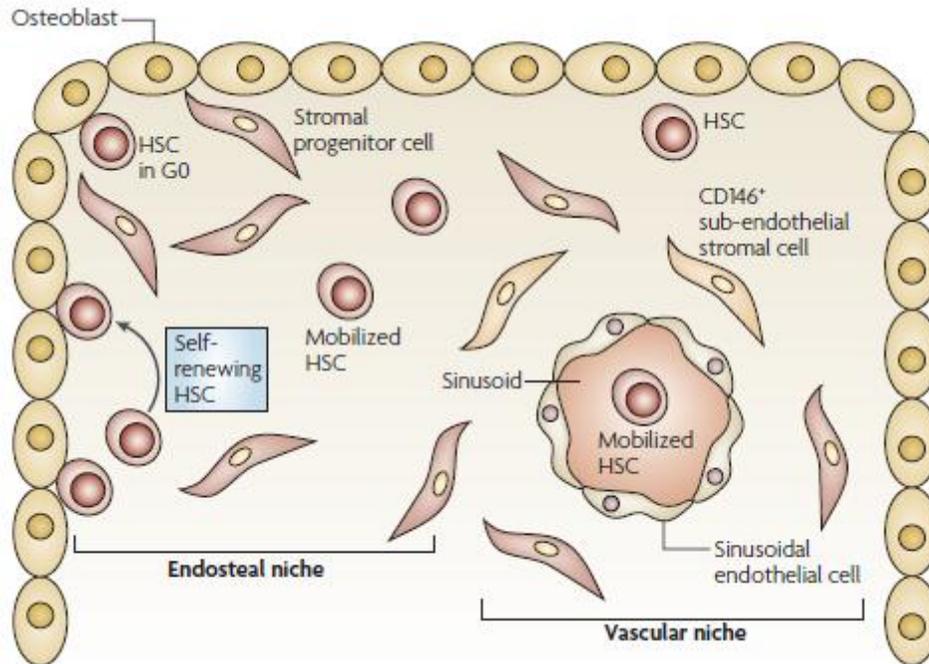


Figura 2. En la Médula ósea, las células progenitoras se encuentran en diferentes estados de maduración, las CMM contribuyen a la formación del nicho hematopoyético (4).

Sin embargo la M.O como fuente de aislamiento de estas células presenta limitaciones, como el bajo número de CMM presentes en ella, el riesgo en la toma de muestra, disminución de la capacidad de proliferación y diferenciación de las células según la edad del donante, razones por las cuales fuentes alternativas como la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo, se han aceptado para el aislamiento y cultivo de estas células (11).

La sangre de cordón umbilical se obtiene por un método menos invasivo que el de la M.O, protegiendo tanto a la madre como al hijo; pero existen desventajas como la baja tasa de aislamiento (hasta 30%), el volumen de sangre necesario para el aislamiento (mayor a 30 ml.) y el tiempo de procesamiento de la muestra no mayor a 15 horas. Además, estudios como el realizado por Kern y col. quienes reportaron la incapacidad de diferenciación hacia el linaje adipogénico de las CMM obtenidas de sangre de cordón umbilical (11,12).

El tejido adiposo es otra fuente de obtención de CMM, esta puede ser por medio de lipoaspirado a un volumen mayor respecto a la MO; algunas investigaciones han revelado similitud biológica entre las CMM obtenidas de este tejido y las de M.O, haciendo de ellas una opción para el aislamiento y cultivo de CMM.

Sin embargo, el estudio de Mitchell JB y col. mostró la presencia del marcador CD34 en células adherentes de cultivos tempranos derivados de tejido adiposo, lo cual las pone de manifiesto como un marcador hematopoyético y no mesenquimal (13).

Se ha demostrado también, la presencia de CMM en tejidos como cartílago, periostio, líquido sinovial, músculo, tendones, placenta, endotelio vascular, tejido nervioso, páncreas, hígado, líquido amniótico, sangre periférica, dermis, pulmones, pulpa dental, timo, bazo y cerebro (14,6, 15).

Esta amplia distribución de las CMM puede explicarse mediante diferentes teorías; i) Los tejidos adultos contienen reservorios autónomos de células madre, las cuales desarrollan ciertas características dependiendo de la señal emitida por cada nicho, ii) Las CMM circulan por todo el organismo y posteriormente llegan a cada órgano para establecerse como células de reserva, iii) Las CMM son originarias de poblaciones celulares procedentes de los vasos sanguíneos, y por esta razón están presentes en todos los tejidos de un organismo (figura 3) (16).

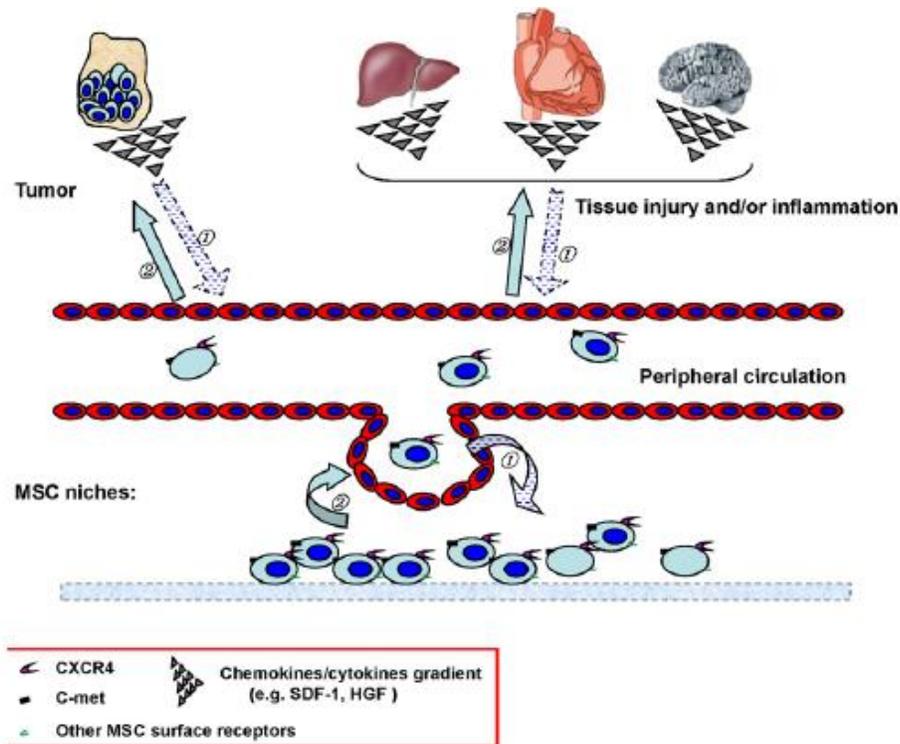


Fig.3. Migración selectiva de las CMM a diferentes tejidos; 1) Secreción de quimiocinas/ citocinas en tumores y daño a tejidos incrementando la proliferación y migración de las CMM. 2) Activación de CMM migrando a los sitios de daño, inflamación y tumores. (19)

SISTEMAS DE CULTIVO DE LAS CMM

El primer aislamiento de CMM lo realizó Friedenstein y col. en 1968, determinando la adherencia de estas células a superficies plásticas a partir de muestras de médula ósea después de 3 a 5 días de cultivo, donde observaron colonias de 2 a 4 células con morfología fibroblastoide las cuales denominaron unidades formadoras de colonias fibroblastoides (CFU-F) (14). Para obtener CMM a partir de muestras de M.O, las células mononucleares se aíslan por gradiente de densidad, y más tarde son cultivadas a una densidad de aproximadamente 1×10^6 células mononucleares/ cm^2 . El cultivo de las CMM se realiza en medios como el Dulbecco modificado de Eagle (DMEM), Medio Iscove modificado de Dulbeco (IMDM), suplementados con suero fetal bovino (SFB), aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y antibióticos. El primer cambio de medio se realiza entre las 24-

72 horas para retirar las células no adherentes del cultivo y permitir la proliferación de las células hasta obtener la confluencia deseada (11,17).

Para la diferenciación de CMM a distintos tejidos se utilizan suplementos especiales en el medio de cultivo base. Por ejemplo para la diferenciación osteogénica de las CMM, el medio basal debe ser complementado con dexametasona, beta-glicerofosfato (B-GF), ácido ascórbico y SFB. En presencia de estos suplementos las células forman agregados, adquieren un cambio de morfología, aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina y producen depósitos de cristales de hidroxapatita. Para la inducción de las CMM a precursores adipogénicos, el medio basal se enriquece con dexametasona, 3- isobutil-1-metil-xantina (IBMX), insulina recombinante humana, indometacina y SFB; donde se observa la formación de vacuolas lipídicas mediante la coloración con rojo oleoso.

La diferenciación condrogénica sucede cuando las células crecen suplementando el medio basal con factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta-1$), dicha diferenciación se comprueba mediante la secreción de proteoglicanos específicos de cartílago teñidos con safranina O (17,18). La determinación de los procesos de diferenciación se realiza mediante las coloraciones ya mencionadas, estas tinciones se consideran métodos “Estandar de Oro” para la diferenciación de CMM (Fig.4) (19).

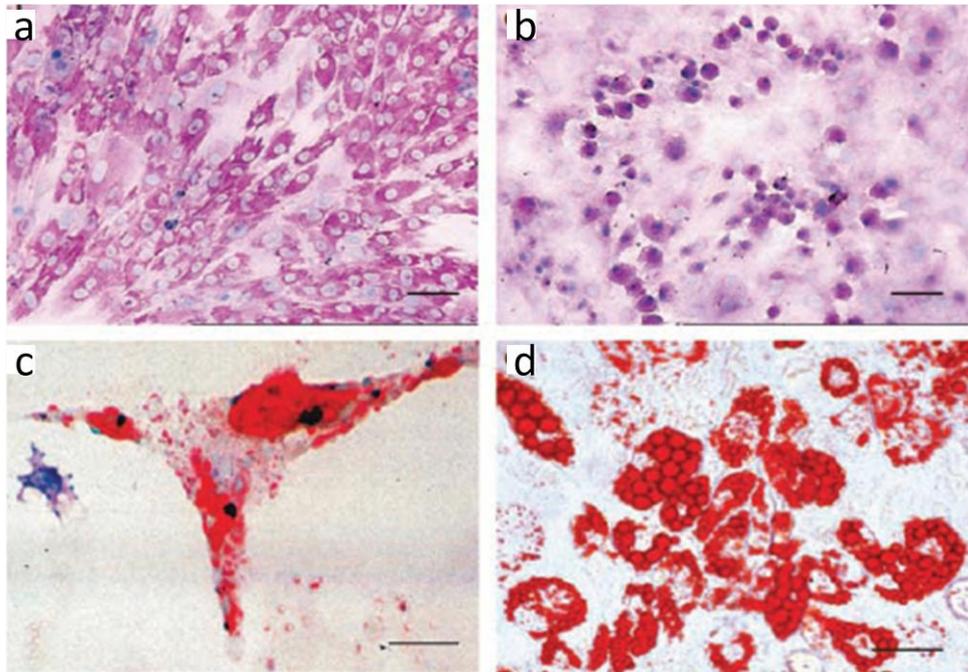


Fig.4. Inmunohistoquímica de cultivos de células mesenquimales de M.O. de rata. a) Colágeno tipo I tinción safranina O, b) Para la osteocalcina tinción roja, c) Célula fibroblastoide con gotas lipídicas tinción con safranina O, d) Micrografía de adipocitos tinción con rojo oleoso (1).

CRITERIOS DE LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

La sociedad internacional de terapia celular (ISCT) ha propuesto tres criterios para la caracterización *in vitro* de CMM, estos son 1) Probar la adherencia en plástico de las células aisladas con morfología fibroblastoide. 2) Determinar la expresión de CD105, CD73 y CD90, en ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR. 3) Inducir la diferenciación *in vitro* de las CMM en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos (20,16).

Adherencia de las células a las superficies de cultivo

Uno de los criterios establecidos por la ISCT para demostrar la presencia de CMM es la adherencia selectiva de estas células a superficies plásticas, características que no presentan las células madre hematopoyéticas (16,20,21).

Las propiedades de las superficies plásticas de cultivo para permitir la adherencia *in vitro* de las células, se relaciona con las interacciones moleculares y la topografía de dichas superficies. El proceso de la interacción celular con el material es altamente dinámico y depende de varios factores que repercuten en la respuesta celular; todo el proceso se puede dividir en diferentes eventos celulares.

El primero se refiere al contacto de la célula con el fluido o medio de cultivo seguido de la adsorción de las proteínas de superficie al material, lo cual está influenciado por las características de pH, composición iónica y temperatura de la solución, luego ocurre la fase de contacto de las células la cual se produce de manera rápida e intervienen propiedades físico-químicas como fuerzas de Van der Waals (tabla 1). La fase de adhesión celular ocurre en períodos más largos e involucra moléculas de adhesión y del citoesqueleto, quienes interactúan juntas para luego inducir una respuesta de proliferación, migración y diferenciación fenotípica celular (22).

Tabla 1. Eventos que suceden durante la adhesión celular a un sustrato.

Evento	Factores que Intervienen	Tiempo
Adhesión al fluido	Humedad	Segundos
Adhesión de proteínas	pH, composición iónica, temperatura	Segundos-minutos
Contacto celular	Fuerzas de van del Walls	Minutos-horas
Adhesión celular	Proteínas del citoesqueleto, Matriz y membrana celular	Horas
Extensión celular	Proteínas del citoesqueleto, Matriz y membrana celular	Horas

Adaptado de: Meyer U y Wiesmann H. Bone and Cartilage Engineering. Editorial Springer. Estados Unidos 2006.

Las CMM expresan una gran variedad de proteínas en su superficie celular que incluyen integrinas, receptores de factores de crecimiento, receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión (tabla 2). Además producen moléculas de la matriz entre las que se destacan fibronectina, colágeno tipo I, III, IV, laminina,

ácido hialurónico y proteoglicanos. La adhesión de las células a la superficie del material es regulada por algunas de estas moléculas; la adhesión se realiza desde distintos sitios de contactos los cuales se clasifican en: contactos focales, contactos cerrados y contactos de la matriz extracelular dependiendo de la distancia entre la célula y el sustrato y la presencia de las proteínas de adhesión (15).

Tabla 2. Proteínas expresadas en células madre mesenquimales.

Grupo	Proteínas
Moléculas de adhesión	ALCAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, L-selectina, LFA-3, NCAM, HCAM y VCAM
Factores de crecimiento y receptores de citocinas	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, interferon alfa R, Factor de necrosis tumoral alfa 1-R, Receptor de transferrina.
Integrinas	VLA- 1, VLA a 2, VLA-a5, VLA-b, b4-integrina
Marcadores de matriz extracelular	Colágeno tipo I, II, IV y V, proteoglicanos, laminina, hialurán

Adaptado de: Arévalo J, Páez D, Rodríguez V. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas .NOVA. 2007;5:177-84.(23)

Inmunofenotipo

Hasta el momento no se ha identificado una molécula de superficie específica y/o única de CMM, sin embargo, uno de los criterios para identificar las CMM por inmunofenotipo se basa en un extenso panel de anticuerpos monoclonales, incluyendo la determinación de marcadores de diferenciación, moléculas de adhesión, marcadores de matriz extracelular y receptores de factores de crecimiento. El inmunofenotipo aceptado para la identificación de CMM es la co-expresión de CD44, CD73 (SH3 y SH4), CD90, CD105 (SH2) y HLA-I, en ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45.

Estructura y función de CD44

CD44 es una proteína transmembrana que posee un peso molecular de 37 kD y forma parte de la familia de los receptores hialurónicos. En su estructura, CD44 posee un dominio extracelular ligado a un dominio hialurónico en la región N-terminal, seguido de una región de mucina; el dominio citoplasmático está fosforilado constitutivamente en un solo residuo de serina y se puede asociar a miembros de la familia ERM (proteínas de enlace a la membrana-citoesqueleto) (24).

CD44 es el receptor extracelular principal para glicosaminoglicanos y ácido hialurónico; también se ha reportado que esta proteína se une al colágeno, laminina y fibronectina. Entre sus funciones se encuentra mediar señales coestimuladoras, adhesión, migración, presentación de factores de crecimiento y citoquinas. Se expresa en la mayoría de los linfocitos, además en monocitos, granulocitos, timocitos, fibroblastos y CMM (24).

Estructura y función de CD73

CD73, 5'-ectonucleotidasa, SH3 o SH4, es una proteína de 70 kDa unida a una molécula de glicosil-fosfatidilinositol (GPI), ha sido detectada en la membrana de diferentes células de mamíferos. La función principal de la enzima 5'-ectonucleotidasa es catalizar la defosforilación extracelular de nucleótidos a sus correspondientes nucleósidos. Esta reacción permite la entrada de adenosina, inosina y guanosina a la célula y su posterior conversión en ATP y GTP para ser utilizado como fuente de energía celular (25).

La molécula CD73 también ha sido establecida como una molécula coestimuladora en la activación de los linfocitos T, su expresión en linfocitos se relaciona con el estadio de maduración de estos. Además de linfocitos T, CD73 ha sido encontrada en fibroblastos, tejido nervioso, células dendríticas foliculares, hepatocitos de ratas, neutrófilos de cerdos y CMM en humanos (26).

Estructura y función de CD90

CD90 o Thy-1, es una pequeña proteína perteneciente al grupo de las inmunoglobulinas que se encuentra del lado externo de la bicapa lipídica, anclada a su membrana por medio de una molécula de GPI; posee un peso molecular de 25-37 kDa y está compuesta de 112 aminoácidos (26).

CD90 se expresa en gran variedad de células incluyendo fibroblastos humanos, neuronas, CMH, CMM, células endoteliales, células T murinas y en células de hígado de ratas. Su función precisa es desconocida, pero se cree que está involucrada en el reconocimiento, adhesión y activación de linfocitos, señales de apoptosis, supresión de tumores y proliferación y migración de fibroblastos; esto indica que Thy-1 es un importante regulador en interacciones entre célula-célula y célula-matriz (26).

Estructura y función de CD105

También conocida como endoglina, CD105 es una glicoproteína de 180 kDa, fosforilada, que atraviesa la membrana de las células. CD105 forma parte del complejo receptor del (TGF)- β , que es una citocina implicada en la proliferación, diferenciación y migración celular (27).

Se han detectado niveles altos de expresión de CD105 en el endotelio microvascular de humanos, en endotelio vascular en estado de angiogénesis activa, en tejidos inflamados, células inmaduras de tumores de vasos sanguíneos, cáncer gástrico, próstata y pulmonar, además de células no endoteliales como monocitos, macrófagos, células B maduras, precursores eritroides, fibroblastos, melanocitos, células mesenquimales del corazón, células del músculo liso y CMM (27).

En algunos estudios se ha demostrado que CD105 regula la expresión de ciertos componentes de la matriz extracelular como fibronectina, colágeno e inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) (27).

Estructura y función de HLA –I

La molécula HLA-I es un heterodímero formado por una cadena transmembrana denominada alfa de 43 kDa que está unida no covalentemente a la β 2-microglobulina, una proteína extracelular de 15 kDa. La cadena alfa posee tres dominios denominados α 1, α 2 y α 3, una región transmembranal y una pequeña cola citoplasmática, la β 2-microglobulina se encuentra unida no covalentemente con el dominio α 3 y los dominios α 1 y α 2, que se encuentran del lado externo de la célula formando un espacio donde se alojarán los péptidos derivados de alguna proteína intracelular (28).

Todas las células del organismo con excepción de los hematíes expresan HLA-I, entre ellas las CMM. La molécula HLA-I presenta sus péptidos a los linfocitos T CD8+, el cual tiene como ligando el dominio α 3 de las moléculas de histocompatibilidad clase I (28).

Estructura y función del HLA-DR

Las moléculas HLA-DR están formadas por dos cadenas transmembranales denominadas α y β , una región transmembrana y una pequeña cola citoplasmática. Los dominios α 1 y β 1 son los que forman la hendidura para albergar los péptidos que suelen tener entre 13 y 17 aminoácidos (28).

Las únicas células que expresan la molécula de HLA-II son las células presentadoras de antígeno que incluyen células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, las cuales presentan péptidos a los linfocitos T CD4+ (28).

Diferenciación de Células Madre Mesenquimales

La capacidad que tienen las CMM de diferenciarse en células de tipo mesodérmico, como osteoblastos, condroblastos y adipoblastos, es otra de las características que las define como multipotenciales *in vitro*.

Osteogénesis

El hueso es un tejido especializado que provee soporte a los órganos. Existen dos maneras de formación de hueso durante el desarrollo embrionario: i) intramembranoso y ii) formación endocondral de hueso (22).

La osificación intramembranosa forma los huesos planos que incluyen el cráneo y las clavículas medias; mientras que la formación endocondral forma los huesos largos que comprenden el esqueleto apendicular, huesos faciales y clavículas laterales (22).

La formación intramembranosa se produce gracias a una condensación de las CMM comprometidas hacia el linaje osteogénico, las cuales se encuentran en contacto por medio de prolongaciones largas. Algunas CMM se diferencian en osteoblastos que al poco tiempo comienzan a secretar matriz ósea orgánica sin calcificar, la cual se denomina osteoide y consta de proteoglicanos, fibras de colágeno y sustancia fundamental.

Los osteoblastos que están embebidos dentro del osteoide se comunican entre sí por medio de finas prolongaciones y al momento de la calcificación, por fosfato de calcio, quedan atrapados formándose un pequeño espacio propio del hueso que se denomina canalículo; al mismo tiempo, el osteoblasto de la zona de calcificación pierde su capacidad de metabolizar matriz ósea y se convierte en osteocito. Este osteoblasto es rápidamente reemplazado por otro, el cual se encuentra encima del nuevo osteocito dándole de esta manera la estructura laminar (por capas) al hueso y haciendo que aumente su grosor (22).

La osificación endocondral se diferencia de la intramembranosa, en la manera en que este proceso involucra un paso intermedio, donde el cartílago es quien regula el crecimiento y desarrollo del hueso. La formación dentro del embrión comienza con el desarrollo de un modelo de cartílago el cual crece por yuxtaposición y de manera intersticial; enseguida los condrocitos de este cartílago se hipertrofian

dando como resultado el crecimiento de lagunas y reducción de los tabiques de matriz cartilaginosa intercalados que se calcifican. El pericondrio se vasculariza haciendo que las células condrogénicas pasen a ser osteoprogenitoras formando los osteoblastos, los cuales elaboran matriz ósea sobre la superficie del cartílago calcificado. Esta matriz se calcifica formando un complejo de cartílago y hueso calcificado (29).

Componentes del hueso

La matriz ósea aparece al final de la formación del hueso, posee componentes orgánicos e inorgánicos. Los componentes orgánicos se refieren a los tipos de colágeno que la componen, estas fibras proveen el microambiente necesario para favorecer los depósitos de apatita. En el hueso existen varios tipos de colágeno aunque el que predomina es el colágeno tipo I, seguido de colágeno tipo III y X, y los tipos de colágeno V, VI, XIII y XIV se encuentran en la matriz ósea en menor cantidad (22).

En la matriz ósea existen también proteínas no colágenas que intervienen en la estructura y proceso de mineralización del hueso. Estas proteínas se dividen en tres grupos que corresponden a las glicoproteínas, proteínas gamma- ácido glutámico carboxy (Gla) y proteoglicanos. El grupo de las glicoproteínas incluye la osteonectina, osteopontina, proteína siálica del hueso, fosfatasa alcalina, fibronectina, vitronectina y trombospondina. El grupo de proteínas Gla incluye la osteocalcina que se fija a la hidroxiapatita y proteína S, estas son proteínas que parecen restringirse solamente al hueso; mientras que las proteínas fibromodulina, biglican y modulina pertenecen al grupo de los proteoglicanos (22).

El componente inorgánico de la matriz ósea, constituye cerca de 65% de hueso, está compuesto por calcio y fósforo principalmente y en menor cantidad de bicarbonato, citrato, magnesio, sodio y potasio. El calcio y el fósforo forman los llamados cristales de hidroxiapatita los cuales se encuentran ordenados a lo largo de las fibras de colágeno, tienen 40nm de longitud y 25nm de ancho. Estos

cristales relacionados con las fibras de colágeno son los que proveen de la dureza y resistencia al hueso (22).

Las células osteoprogenitoras se derivan de las CMM, las cuales sufren divisiones mitóticas y poseen el potencial de diferenciarse en osteoblastos (fig.5). Su morfología es fusiforme con núcleo oval, poseen citoplasma escaso al igual que retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi, mientras que contienen abundantes ribosomas libres (22).

Los osteoblastos son células óseas inmaduras, derivadas de las células osteoprogenitoras, encargadas de sintetizar los componentes orgánicos de matriz ósea como el colágeno, proteoglicanos y las glicoproteínas. Expresan marcadores como la fosfatasa alcalina y receptores para hormonas como dihidroxivitamina D, estrógenos y glucocorticoides los cuales están involucrados en la diferenciación osteoblástica. En su citoplasma poseen abundante retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi bien desarrollado y un gran número de vesículas de secreción. Estas células emiten pseudópodos que entran en contacto con otros osteoblastos formando uniones comunicantes (22).

Los osteocitos son células óseas maduras que se encuentran depositadas dentro de la matriz ósea en cúmulos llamados lagunas. De aquí emiten prolongaciones que hacen contacto con otros osteocitos, a través de las cuales pueden intercambiar iones y moléculas pequeñas. Estas células se encuentran en mayor cantidad en el hueso estimándose que de cada osteoblasto existen 10 osteocitos. Su citoplasma es pobre en organelos y su núcleo es aplanado. Aunque parecen ser células inactivas, secretan sustancias que conservan el hueso (tabla 3) (22).

Los osteoclastos son células derivadas de las células madre hematopoyéticas, encargadas de la resorción del hueso. Poseen un tamaño grande, son multinucleadas (poseen hasta 50 núcleos), móviles y miden 150 nm aproximadamente de diámetro (22).

Tabla 3. Componentes de hueso

	COMPONENTES ORGÁNICOS
	Colágeno tipo I
	Colágeno tipo VI
	Colágeno tipo XIII
	Colágeno tipo XIV
Matriz Osea	Proteínas no colágenas :Glicoproteínas: Osteonectina Osteopontina Fosfatasa alcalina Fibronectina Vitronectina Trombospondina
	Proteínas gamma-ácido glutámico Carboxy (Gla): Osteocalcina Proteína S
	Proteoglicanos: Fibromodulina Biglican modulina
	COMPONENTES INORGÁNICOS
	Calcio Fósforo
CÉLULAS	Osteoprogenitoras Osteoblastos Osteocito Osteoclastos

Diferenciación Osteogénica *in vitro*

La diferenciación osteogénica *in vitro* de CMM obtenidas de MO adulta se caracterizan por la formación de depósitos de calcio y aumento de expresión de fosfatasa alcalina después de la exposición de las células a dexametasona, beta-GP, ascorbato y SFB (18).

Dexametasona

La dexametasona es un adrenocorticoide sintético que posee propiedades antiinflamatorias, inmunosupresoras y reguladoras del calcio sanguíneo, produce

efectos inhibitorios en la formación del hueso a altas concentraciones mientras que a concentraciones fisiológicas (10 nM), promueve la diferenciación osteoblástica de CMM *in vitro*.

Durante la osteogénesis, por la vía MKP-1 (Mitogen-activated protein kinase-1), la dexametasona regula la fosforilación de un residuo de serina (Serina125) de la proteína Runx2, la cual es un regulador esencial en la transcripción. Runx2 dirige la diferenciación osteogénica uniéndose a un elemento específico de osteoblastos llamado OSE2, en la región del promotor de los genes diana regulando la expresión y activación de genes de osteocalcina y sialoproteína ósea, y aumentando la actividad de la fosfatasa alcalina y acumulación de mineral en las células produciendo la diferenciación osteoblástica de las mismas(fig.6) (29,30).

B-glicerofosfato

El B-GP es un fosfato orgánico, utilizando como suplemento del medio para la diferenciación osteogénica de CMM gracias a su capacidad para estimular la calcificación de las células *in vitro*, induciendo la formación de calcio. El B-GP es un sustrato de la fosfatasa alcalina ósea, en cuya reacción enzimática se produce un incremento de fosfatos inorgánicos en el medio (31).

Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima localizada en las vesículas de la matriz extracelular como una proteína fijada a un glicolípido de fosfatidilinositol, inicia la mineralización en la superficie de estas vesículas y es utilizada como uno de los principales marcadores bioquímicos para demostrar la actividad osteoblástica de las células, su función es hidrolizar fosfatos orgánicos para liberar fosfatos inorgánicos al sitio de mineralización de dichas células. Este fosfato será luego convertido en cristales de hidroxiapatita que produce la calcificación de las células y por tanto, su resistencia (31).

Acido Ascórbico

El ácido ascórbico (vitamina C reducida) es otro suplemento esencial para la diferenciación de CMM a osteoblastos. Estudios *in vivo* han demostrado que cuando se inyecta vitamina C radiomarcada, esta se acumula en los sitios en donde existe formación activa de hueso. Para realizar este proceso, los osteoblastos contienen un sistema de transporte de ácido ascórbico dependiente de sodio, esencial para la acumulación de vitamina C (32).

En cultivos de CMM, el ácido ascórbico estimula la hidroxilación de aminoácidos y procesamiento del procolágeno. La síntesis normal de colágeno depende de la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en el retículo endoplásmico de la célula, para formar hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente. Las enzimas hidroxilasas, que catalizan esta hidroxilación, requieren ácido ascórbico para funcionar correctamente.

Sin ácido ascórbico, las enzimas no pueden hidroxilar la prolina y la lisina; esta hidroxilación es indispensable para la formación en triple hélice de las fibras de colágeno que permiten mantener la estructura de los tejidos (32).

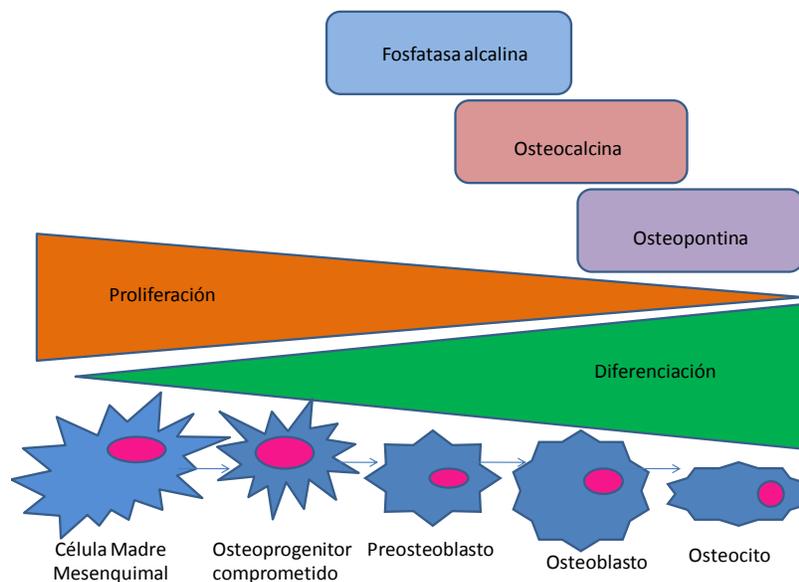


Fig.5 Diferenciación osteogénica de las CMM.

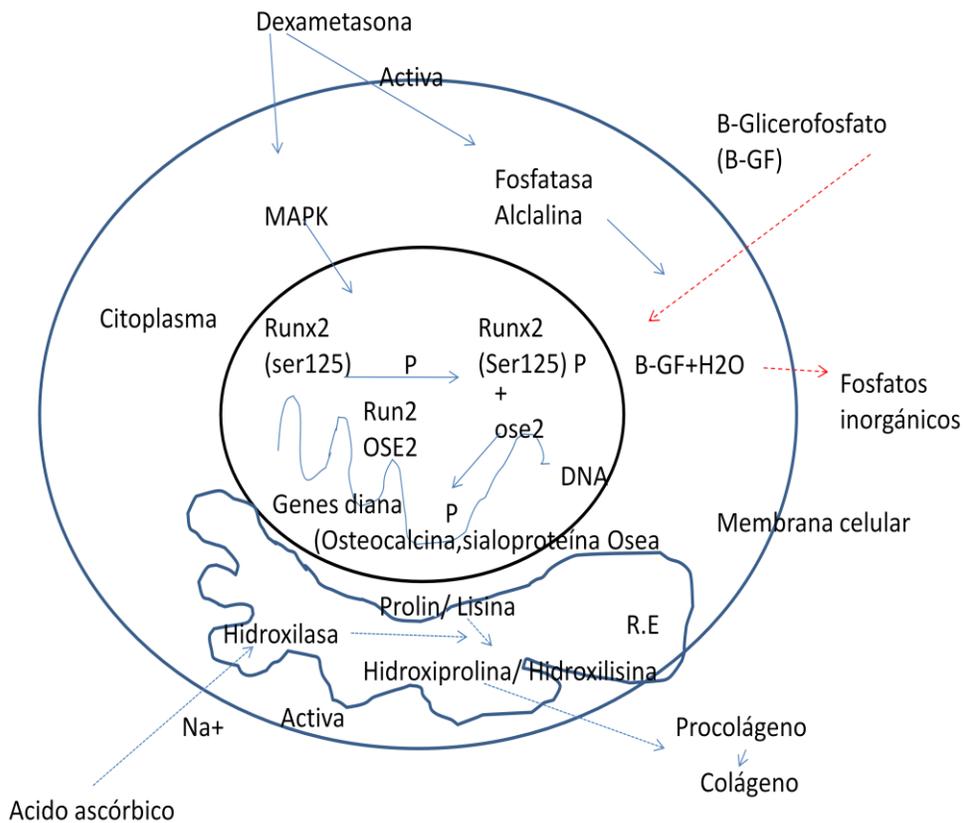


Fig.6 Proceso molecular de diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (32).

Adipogénesis

El tejido adiposo es un órgano difuso con gran actividad metabólica, puesto que sus lípidos están capacitados para almacenar energía. En el humano se encuentran dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco, amarillo o unilocular que representa la mayor parte del tejido adiposo del organismo, y el tejido adiposo marrón o multilocular, es más escaso y es llamado así porque las células contienen muchas gotas pequeñas de lípidos (33).

El tejido adiposo blanco o unilocular, posee células adiposas grandes (hasta 100 microgramos de diámetro) y esféricas, que pueden llegar a deformarse cuando

están formando grupos tomando una morfología poliédrica. Cada célula contiene una gota grande de lípidos en el centro, principalmente triglicéridos, y un citoplasma reducido al borde de ella, con escasos organelos, el núcleo se encuentra desplazado hacia la periferia del citoplasma, es oval, con cromatina fina y no contiene nucléolos. El tejido adiposo blanco se encuentra ampliamente distribuido como grasa subcutánea, en el mesenterio y en la zona retroperitoneal (33). Todas las células adiposas se originan por diferenciación de las CMM (fig.7), aunque el proceso de desarrollo para los dos tipos de tejido adiposo es diferente.

El tejido adiposo blanco se desarrolla en los islotes grasos en fetos con 5 meses de vida aproximadamente; en el citoplasma de las CMM aparecen gradualmente gotas grasas y las células se van haciendo más redondeadas, mientras que las gotas de lípidos se hacen más grandes para luego fusionarse y formar una sola vacuola, por esto el núcleo cada vez está más excéntrico; en esta etapa la célula ya es llamada adipocito. El tejido adiposo marrón también se desarrolla a partir de CMM en el embrión, las cuales se vuelven semejantes a las células epiteliales y el tejido se hace lobulado; aquí comienzan a aparecer las primeras gotas de lípidos haciendo que las células se vuelvan multiloculares y maduras, convirtiéndose en adipocitos (33).

Diferenciación adipogénica de CMM

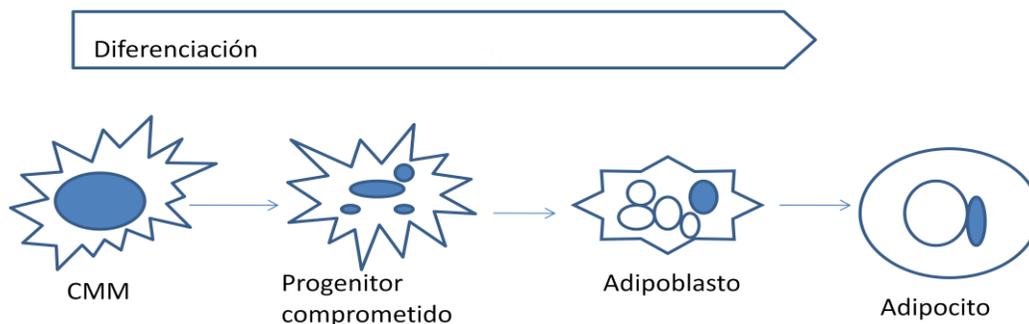


Fig.7. Diferenciación adipogénica *in vitro* de las CMM.

Los inductores que mejor actúan en la diferenciación adipogénica *in vitro* de CMM obtenidas de MO son la dexametasona, isobutilmetilxantina, la insulina y la indometacina (34).

Dexametasona

La dexametasona también es un estimulante de la diferenciación de las CMM a adipoblastos; ésta actúa a nivel celular sobre el factor de transcripción C/EBP, el cual es necesario para el proceso de adipogénesis, su expresión es inducida poco después del comienzo de la diferenciación y disminuye en la fase terminal del proceso. Existen tres isoformas de este factor de transcripción: C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ ; la dexametasona actúa sobre C/EBP δ el cual induce la expresión de C/EBP α y del receptor nuclear de proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ); los cuales permanecen elevados durante el resto del proceso de diferenciación promoviendo la expresión de marcadores de diferenciación (34,35).

Isobutilmetilxantina (IBMX).

La IBMX actúa sobre la CMM regulando el compromiso de esta hacia el linaje adipogénico, ya que es un inductor del cAMP el cual inicia la adipogénesis mediante la activación temprana de CREB (proteína de unión a un elemento de respuesta a cAMP) el cual participa en la inducción de la expresión de C/EBP β (36).

Insulina

La insulina es un inductor de la adipogénesis que origina la diferenciación de CMM únicamente a concentraciones mayores a las fisiológicas, su función la realiza uniéndose al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1); el cual está presente en gran cantidad en el progenitor comprometido del adipocito, mientras que el receptor de la insulina se encuentra en muy poca cantidad y

aumenta hasta veinte veces durante la diferenciación del adipocito, por lo que se vuelve sensible a ella.

El IGF-1 es igual estructuralmente a la insulina, por lo que esta sustituye casi todas sus acciones entre ellas, la de inductor fisiológico de la adipogénesis uniéndose con baja afinidad al receptor.

La insulina también estimula la captación de glucosa por parte de las células adiposas, dentro de las cuales ocurre la glucólisis en donde se forman grandes cantidades de alfa-glicerofosfato, que se acopla con ácidos grasos libres sintetizando triglicéridos dentro de la célula (33,34).

La indometacina es otro inductor incluido en la mezcla de compuestos usados para promover la diferenciación adipogénica de CMM; su función está dada como un activador del factor transcripcional PPAR γ el cual se expresa ampliamente en la diferenciación adipogénica de CMM. Al unirse la indometacina al PPAR γ se produce una activación del factor transcripcional PPAR α interviniendo de esta manera en la cascada de la diferenciación adipogénica (fig.8) (37).

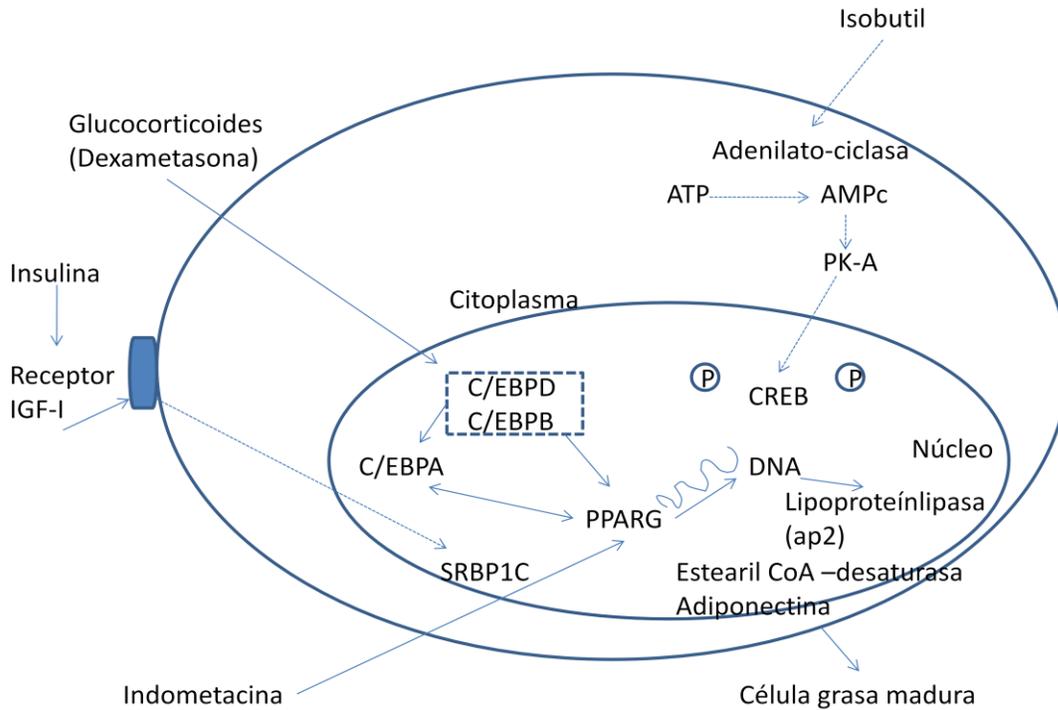


Fig.8 Cascada de activación de la diferenciación adipogénica de las células madre mesenquimales (37).

Condrogénesis

Los adultos contienen cartílago en las superficies de huesos largos y tráquea, bronquios, nariz, orejas, laringe y en discos intervertebrales. El cartílago es un tejido mecánico; que posee células denominadas condrocitos que se encuentran en cavidades llamadas lagunas dentro de la matriz extracelular que ellos mismos secretan, es un tejido que carece de vasos sanguíneos y linfáticos.

Sin embargo, los condrocitos reciben su nutrición desde los vasos sanguíneos de los tejidos conectivos más cercanos por difusión a través de la matriz. La matriz extracelular está compuesta de glucosaminoglicanos y proteoglicanos, los cuales se asocian con las fibras de colágeno y elásticas que se encuentran ahí. Existen tres tipos de cartílagos: i) hialino, ii) elástico y iii) fibrocartílago (33).

El cartílago hialino es el más abundante y se encuentra en el individuo adulto en las costillas, como parte del esqueleto nasal, laringe, tráquea, bronquios y

superficies articulares. El cartílago se desarrolla a partir del mesodermo en la quinta semana de gestación, donde las CMM se hacen redondas formando cúmulos celulares densos llamados centros de condricación. Durante la diferenciación de las CMM a condroblastos, las células aumentan su tamaño y dividen la sustancia fundamental metacromática y el tropocolágeno, que se polimeriza fuera de la célula para formar colágeno; y las células van quedando atrapadas en esta matriz formando lagunas. Aquí los condroblastos se diferencian en condrocitos que son células cartilaginosas maduras. El crecimiento del cartílago sucede de dos maneras: i) el crecimiento intersticial que comienza en el centro de condricación, donde los condroblastos sufren divisiones mitóticas aumentando el número de células, las cuales producirán matriz extracelular y se convertirán en condrocitos; ii) el crecimiento aposicional se refiere a la diferenciación de las CMM que rodean el cartílago para formar condrocitos(fig.9) (33).

El cartílago elástico forma parte del cartílago de la epiglotis, laringe y oídos; se diferencia del cartílago hialino porque su matriz presenta un entretejido denso de fibras elásticas. El cartílago fibroso está compuesto por una combinación de fibras de colágeno y células cartilaginosas ubicadas en lagunas rodeadas por matriz hialina. El fibrocartílago se encuentra en ciertas articulaciones, discos intervertebrales y meniscos (33).

Los tipos de colágeno que más predominan en el cartílago son el colágeno tipo II, IX y XII; pero también se encuentran en menores cantidades colágenos tipo III,VI, XII, XIII y XIV. En la matriz extracelular al igual que en el hueso, existen proteínas no colágenas y polisacáridos que intervienen en la estructura del cartílago. Estas proteínas corresponden a los grupos de las glicoproteínas, proteínas Gla y proteoglicanos (22).

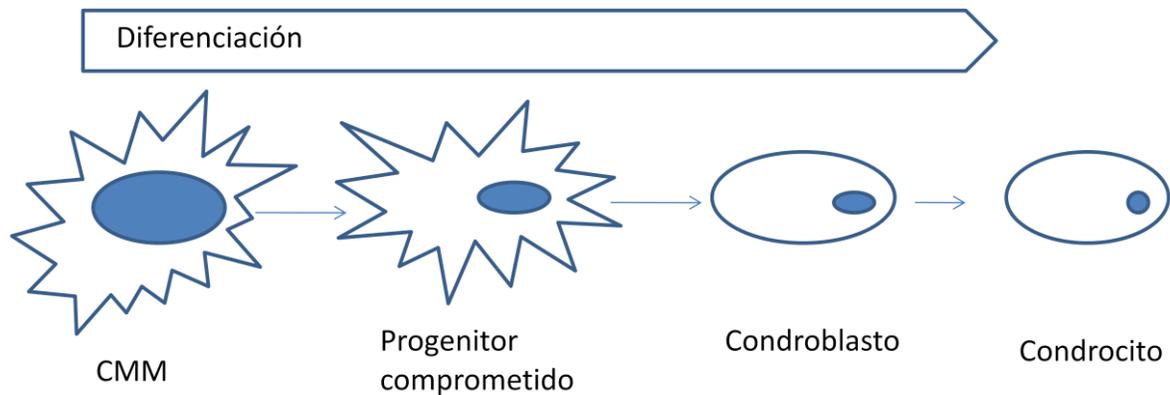


Fig. 9 .Diferenciación condrogénica a partir de células madre mesenquimales.

Diferenciación condrogénica *in vitro*

Para promover la diferenciación condrogénica *in vitro*, las CMM obtenidas de M.O se cultivan en presencia de medio basal y TGF- β 1; el cual es un potente inductor de la condrogénesis *in vitro*. Su acción se basa en la inducción de la síntesis de fibronectina, la cual es una glicoproteína dimérica que unida a sus receptores de integrinas intervienen en la adhesión, migración y señalización celular. De acuerdo a la especie, existen más de 10 isoformas de esta proteína que se expresan mediante empalmes alternativos de una región variable (denominada V o IIICS) y dos exones llamados EDA y EDB (38).

El mesodermo embrionario expresa una isoforma de fibronectina que incluye EDA y EDB; durante la condensación, el cartílago que se encuentra en proceso de maduración cambia la producción de las isoformas de fibronectina excluyendo el exón EDA e incluyendo el EDB. La pérdida del exón EDA se asocia con la maduración de los condrocitos, específicamente la presencia del exón EDA facilita la propagación de las células lo que es característico de condrocitos sin diferenciar. El cambio de la isoforma de fibronectina parece tener un efecto en la diferenciación celular; TGF- β 1 se utiliza como inductor de la condrogénesis, ya que favorece la retención del exón EDA, siendo este un paso importante para la diferenciación celular (fig.10) (38).

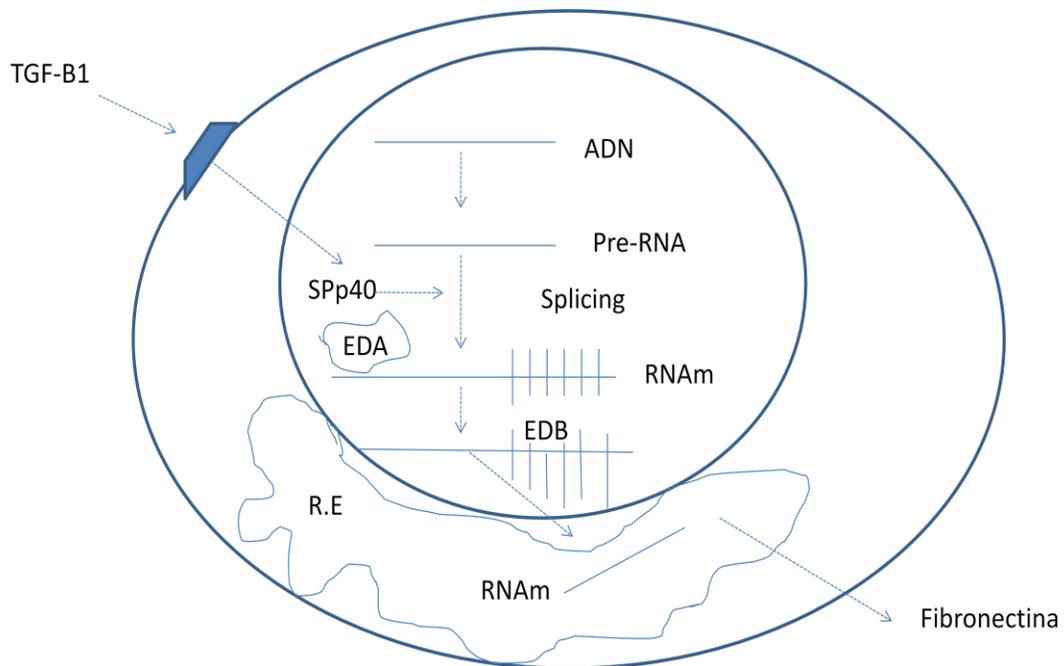


Fig.10 Proceso molecular de condrogénesis iniciado por el TGF-B1 en las CMM (38).

INMUNOMODULACIÓN

Acción Inhibitoria

Las CMM inducen la detención de la división celular de las células T en una reacción mixta de linfocitos (RML) de manera irreversible (39); a su vez se ha demostrado como las CMM pueden inhibir la proliferación de linfocitos inducido por aloantígenos y por mitógenos no específicos, como “Fitoheماغlutinina y Concaivalina A” (40,41). En co-cultivo con células mononucleares de sangre periférica, las CMM incrementan la proporción de subpoblaciones de linfocitos T con fenotipo de células reguladoras como CD4+/CD25 alto, CD4+/CTLA - 4+, CD4+/CD25+/CTLA-4+ (42).

Las células CMM también pueden inhibir la proliferación y diferenciación de las células B, maduración y proliferación de las células dendríticas y suprimir la

proliferación de células natural killer y citoquinas, al igual que a las IL-2 e IL-15 (39).

Mecanismo Inmunomodulador

La expresión de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sobre la superficie celular de todas las células contribuye a ayudarle al sistema inmune a distinguir entre lo propio y lo extraño. Las CMM tienen marcadores de superficie del epitelio tímico y expresa conjuntamente moléculas de adhesión (VCAM- 1, molécula de adhesión intracelular- 2), y molécula de función linfocitaria asociada a antígeno- 3, estos son elementos claves para su interacción con los LT (32,36 - 37,43,44).

Las CMM humanas (hCMMs) adultas expresan niveles intermedios de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y HLA clase I y no expresan CMH-HLA de clase II ni moléculas coestimuladoras (CD80(B7-1), CD86(B7-2), CD40). Por *western blot* se demostró que las CMM lisadas muestran depósitos intracelulares de aloantígenos clase II e interferon-gamma (45, 46,47).

Por lo tanto en ausencia de supresión inmune o mecanismos de tolerancia, las células alogénicas son rechazadas por el sistema inmune del receptor debido a la expresión en las células de CMH y antígenos extraños. Estos complejos CMH-Ag estimulan directamente al LT en presencia de moléculas coestimuladoras. Esto confirma la hipoinmunogenicidad de las células madre mesenquimales (CMM).

Los mecanismos inmunomoduladores empleados por las CMM han sido estudiados y probados en modelos *in vitro* e *in vivo*, demostrando inhibición de células del sistema inmune, por lo tanto, suprime la respuesta inmunitaria. Los mecanismos exactos por lo cual logran esto aún se desconocen ya que cuentan con un amplio repertorio de elementos, entre ellos se encuentran el contacto celular y los factores solubles como la indolamina-2,3- dioxigenasa (IDO), TGF-

beta 1, prostaglandina E2, factor de crecimiento de hepatocitos y síntesis de algunas citocina (tabla 4) (48,49,50).

Tabla 4. Efectos inmunosupresores de las CMM *in vivo* (57).

Modelo animal	Células mesenquimales	Resultado
Ratón		
Melanoma	Infusión alogénica IV y SC	Promoción de crecimiento tumoral
EICH	Infusión múltiple alogénica IV	Prevención EICH
EICH	Infusión única alogénica IV	Sin efecto
Rechazo de injerto	Singénico	Disminución del rechazo
Encefalitis experimental aguda	Infusión alogénica IV	Prevención
Babuino: Trasplante de injerto de piel	Infusión alogénica IV	Sobrevida prolongada del injerto
Rata: isquemia	Infusión alogénica IV	Protección contra isquemia
Humano		
Leucemia mieloide aguda	Infusión haploidéntica IV	HSC injertadas y no EICH
EICH severa aguda	Infusión haploidéntica IV	Resolución del grado agudo de EICH
Leucemia	Infusión haploidéntica IV	Baja incidencia EICH

IV, intravenosa, SC, subcutánea; EICH, Enfermedad Injerto contra huésped

Efecto de las CMM sobre Linfocitos T (LT)

Las CMM induce inhibición de LTs (CD4-CD8/ Virgen- Memoria) de manera eficiente sin llevarlos a apoptosis, además estudios *in vitro* han demostrado que las CMM no son inmunógenas para células mononucleares (LT aloreactivos) de sangre periférica, tras realizarse un cultivo celular mixto primario y secundario con LT y CMM, aún en presencia de mitógenos. El mecanismo inhibitorio por el cual la CMM lleva a cabo este proceso esta mediada por contacto directo y secreción de moléculas solubles. Esta teoría tiene como base los estudios realizados en cocultivos entre linfocitos de sangre periférica (PBL) y CMM separados por una membrana semipermeable, evidenciando igualmente supresión en la estimulación de LT (51-52,41).

La expresión de marcadores asociados a activación linfocitaria CD25 (Receptor estimulado-IL2), CD38 y CD69 disminuye en presencia de CMM (53, 45,51), al

tiempo que las CMM inhiben la activación linfocitaria que conlleva a proliferación, la producción de INF- γ o aumento de marcadores asociados a activación. Se aclara que la CMM no solamente induce fallas en la activación de LT CD4, sino que además escapan a la lisis del LT citotóxico CD8 y NK (51). La inhibición del CD8 se da como consecuencia de un péptido específico en la CMH de clase I, aunque otros análisis indican que las CMM inducen un programa de abordaje de activación en las CD8. (HLA I. Rasmusson, M. Uhlin, K. Le Blanc and F.V. Levistsley, unpublished observation). Como se citó anteriormente, la CMM suprime la formación de CD4/CD8 por medio de factores solubles, estos factores en su mayoría no son constitutivos de CMM ya que en cultivos de células en suspensión, no hay supresión en la proliferación LT (54, 45, 51, 47).

Las CMM producen TGF-beta1 en respuesta a IL-2 e IL-4; esta molécula es un potente inhibidor de la proliferación de LT; además inhibe a los timocitos triplemente negativos (CD3-, CD8-) (54). Anticuerpos contra el factor de crecimiento de hepatocito y TGF- beta 1 restauran parcialmente la proliferación de células T purificadas, pero no de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Otros factores que jugarían un papel en la inmunosupresión incluyen citocinas como INF-gamma, IL-10, TNF-alfa e IL-12. Algunos grupos de investigación demostraron que disminuía la actividad supresora de CMM si se adicionaban anticuerpos específicos para Fas- L, INF- γ y TGF- β 1 en cultivos mixtos de linfocitos; en los estudios realizados con anticuerpos neutralizantes contra Fas-L y TGF- β 1 en cultivos mixtos de linfocitos estimulados con Conca-A, se observó que la inhibición en la supresión de la CMM se comportaba de manera dosis dependiente; ab anti- IL10 no muestra efecto (55).

La CMM provoca inhibición de la proliferación de LT por la producción de IDO; esta es inducida por el INF- gamma de forma dosis dependiente, la función de la IDO radica en catalizar la conversión de triptofano (Tryp) a quinurenina; varios estudios han postulado que la inhibición de la respuesta de la célula T por la CMM es debida a depleción de Tryp (56). El L-triptofano es uno de los diez aminoácidos

esenciales; es un aminoácido aromático, apolar y presenta un anillo indólico en su cadena lateral con capacidad de establecer enlaces débiles con estructuras semejantes, por lo cual se clasifica como un aminoácido hidrofóbico. El Tryp es necesario para la biosíntesis de proteínas estructurales y funcionales, en el organismo es el principal precursor del neurotransmisor serotonina, la vitamina niacina y de la hormona melatonina que es secretada en la glándula pineal.

La enzima IDO se ha encontrado en tejidos extrahepáticos como intestino, pulmón, placenta y cerebro; y en algunas células del sistema inmune (macrófagos y células dendríticas) (57). La IDO posee un Km muy bajo (20mM), por lo que la afinidad de la enzima por el triptófano es considerable. La vía metabólica del Tryp hasta quinurenina se resume de la siguiente manera: inicia con oxidación del triptófano que se convierte en N-formilquinurenina, esta es hidrolizada rápidamente a quinurenina, la quinurenina conduce a varias vías de degradación cuyos productos finales son el ácido quinurético, el 3-OH- kinurenina, el 3-OH-ácido antranílico, el ácido picolínico y los metabolitos de niacina. Los productos de degradación del triptófano previamente mencionados participan en la activación y supresión del sistema inmune. Los más relevantes son la 3-OH-kinurenina y el 3-OH-ácido antranílico, y en menor grado la quinurenina y ácido picolínico. El ácido picolínico actúa como coestimulador del Interferón gamma (INF-gamma) en la activación de los macrófagos (58). Se demostró que los metabolitos del tryp inducen la apoptosis selectiva de timocitos murinos y linfocitos Th1, pero no células Th2 *in-vitro* (59).

El INF-gamma es un potente inmunomodulador con efectos antiproliferativos y antineoplásicos, capaz de inducir la expresión de la IDO en diferentes células como macrófagos, células dendríticas, líneas de células tumorales, fibroblastos de piel y tejido conectivo sinovial; últimamente se ha identificado su expresión en CMM. Los efectos antiproliferativos del INF-gamma se han observado en líneas celulares de tumores debido a la disminución de triptófano en los medios de cultivo. Recientemente se demostró que la expresión de la IDO en las células

dendríticas humanas inducida por el INF-gamma, lipopolisacáridos (LPS) o a través del ligando CD40, es capaz de metabolizar grandes cantidades de triptófano e inhibir la proliferación de linfocitos T; en cocultivos de células dendríticas y LT, el INF-gamma fue el más potente inductor en la síntesis de laIDO (60). En otro estudio se demostró que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) participa en la inducción de laIDO en respuesta al estímulo con LPS.

Sin embargo, otros estudios han sugerido que el INF-gamma estimula la producción de moléculas CMH clase I-clase II en la superficie de CMM, induciéndolas a presentar antígenos al LT CD4 (60).

La actividad de laIDO se detectó de forma significativa en LT tratados con mitomicina C y PBMC en presencia de CMM. La adición de Tryp restaura la proliferación del LT sugiriendo que la actividad de laIDO actúa como mecanismo supresor de MCS. Sin embargo, la depleción de Tryp no es responsable del efecto inmunosupresor en el cultivo mixto de linfocitos (MLC), sino son los productos de degradación del mismo (47).

La prostaglandina E2 (PGE2) se sintetiza por la enzima ciclo oxigenasa (COX), esta induce regulación en el LT; la CMM expresan constitutivamente COX-1 y COX-2. En cocultivos purificados de CMM y LT; tanto la COX-2 como la PGE2 se hallan aumentadas; así como también la síntesis de PGE2 inhibe la proliferación de LT estimulados con PHA en cocultivo con CMM. Tse et, al en 2003, estudiaron cocultivos de CMM con LT aloreactivos contra LT estimulados con mitógenos; encontraron que la producción de IL-10, TGF β 1, PGE2 y productos del metabolismo de Tryp eran responsables de la supresión en MLC. Una de las principales funciones ejercida por PGE2, es regular la acción de la IL-2 suprimiendo la producción de la misma; afectando de manera directa la proliferación de LT (62, 63,47).

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) tiene la habilidad de modular la función celular dendrítica y previene la enfermedad injerto vs huésped (GVHD) (64).

Conjuntamente Di Nicola et. al en 2002, encontró que el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β) y el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), son mediadores de la supresión de la proliferación de células T en una reacción mixta de linfocitos (RML) cocultivados con CMMs, al adicionar anticuerpos neutralizantes contra TGF- β y HGF, se reinició la respuesta proliferativa de las células T (65).

Efectos CMM sobre LB

Las CMM han mostrado la capacidad de inhibir la proliferación linfocítica inducida por mitógenos adscritos a la célula B o LB (Mitógeno fitolaca y Proteína A staphylococcus aureus); la estimulación linfocítica del mitógeno fitolaca es dependiente de LT y la estimulación de proteína A es dependiente de LT y LB, por lo que la proliferación no puede ser diferenciada. Las CMMs inhiben la estimulación de las células B por factores solubles anti CD40 y anti-IL4. La proliferación LB es detenida en fase G0/G1 del ciclo celular sin generar apoptosis (66,67). Cuando los LB purificados son activados, la producción y niveles de inmunoglobulinas (IgM; IgG; IgA) se reduce por la CMM solo si las células se agregan en una proporción 1:1, no en una relación menor.

Las CMM no inhiben la producción de TNF- α , INF- γ , IL-4 e IL10 por el LB. Las CMMs aumentan la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR5 y CCR7B, así como la quimiotaxis a CXCL12, y los ligandos CXCR4 y CXCL13, CXCR5 lo cual sugiere que los altos números de CMM afectan las propiedades quimiotácticas del LB (67,68). Sin embargo, con todos estos avances los resultados aun no sustentan el uso de la CMM en enfermedades autoinmunes, en el cual las células B juegan un papel importante.

El grupo de investigación de Corcione et.al. , en 2006, reportaron recientemente que las CMMs cocultivadas con LB purificados CD19+ en presencia de un coctel de estimuladores, se comprobó inhibición significativa de la proliferación de LB. De manera interesante, la inhibición máxima se consigue en una proporción 1:1 y se va perdiendo progresivamente en 1:5 y 1:10; es marcado el contraste en comparación a la inhibición en LT por la CMM. Otros estudios de igual manera muestran que las células B cocultivadas con CMM aumentan la expresión de CXCR4, CXCR5 y del receptor de quimiocina CXCR7 exhibiendo un defecto en la quimiotaxis (67).

Efectos CMM sobre NK

Las células Natural killer (NK) son de actividad citolítica espontánea contra células blanco que no expresan moléculas HLA clase I, esto es mediado por la regulación que ejerce la NK en el balance de señales transmitidas por receptores activadores e inhibidores, que interaccionan con moléculas HLA en células blanco. La CMM reduce la secreción de IL-2 e IL15, aumentando y direccionando la proliferación de NK llevando a aumentar la síntesis de INF-gamma; la CMM no puede inhibir la lisis mediada por la NK en células K562. En proporción 1:1 de CMM y CMN puede inhibir a ambos, pero no en una relación 1:10 ya no se evidencia la inhibición de las funciones citotóxicas de LTC y NK. Por lo tanto, se sugiere que las CMM en altas concentraciones son capaces de bajar la expansión de LTC y NK, pero no es viable ya que niveles tan altos de CMM no se pueden *usar in vivo* (62).

Se cree que el mecanismo inhibitor de la CMM sobre la NK requiere contacto célula-célula, posiblemente por mecanismos más complejos a los observados hasta el momento. Se ha demostrado parcialmente que la secreción de PGE2 por las CMMs afecta la proliferación de las células NK, la expresión de CD56 y su citotoxicidad, pero no interfiere con la producción de citocinas o expresión de receptores de activación. La inhibición de TGF-beta restaura parcialmente la proliferación de células NK, indicando que este factor suprime la actividad de las células NK por medio de diferentes mecanismos (69).

Efecto de CMM sobre la Célula presentadora de Antígeno (CPA)

Las CMM reducen indirectamente la activación LT al reducir la producción de células dendríticas y monocitos, la CMM inhibe la diferenciación y función de la CD derivada de monocito al alterar su sistema de membrana (70); inhibiendo conjuntamente la regulación positiva de CD1A,CD40,CD80 (B7-1),CD86(B7-2) y la de HLA-DR durante el proceso de maduración de CD; por lo tanto, las DCs inmaduras no pueden activar de manera efectiva al LT; la inhibición de DCs se restaura al removerseles las CMM (62,53 ,70).

Las células dendríticas (DCs) juegan un papel en la inducción de la inmunidad y tolerancia, proceso dependiente del estado de activación, maduración, citocinas circulantes y sitio de inflamación (71).

Es importante el aislamiento de DC para el cocultivo con CMM, en este se evidencia una reducción potencial de la actividad de las células CD4 en MLC (70). A su vez la CMM reduce la secreción de citocinas proinflamatorias en la CD (INF- γ , IL-12 y TNF- α) con incremento en la producción de la citocina supresora IL-10. El TNF-alfa inhibe la maduración, migración y habilidad de la DC para estimularse con células T aloreactivas, por lo que esta puede ser una vía adicional de inmunosupresión empleado por la CMM. En presencia de IL las células dendríticas plasmocitoides secretan IL-10 y estas se caracterizan por la expresión incrementada del antígeno BDCA4 luego de una estimulación con LPS (62,53 ,70). La producción de IL-6 y factor estimulador de colonias monocíticas (M-CSF) por las CMMs podría contribuir al efecto inhibitorio de la diferenciación de DCs, debido a la discrepancia encontrada en diversos estudios. Se ha observado que la PGE2 puede ser un factor importante en la interacción de CMMs-DCs; al inhibirse la síntesis de PGE2 se restaura la secreción de TNF- β e INF- γ por DCs en cultivo en presencia de CMMs (62). El incremento en la producción de IL-10 por DCs en cocultivo con CMM, puede contribuir al efecto supresor de CMMs con anticuerpos neutralizantes contra IL-10, de hecho restauran la proliferación de células T (53) aunque no completamente.

Los monocitos CD14+ activan CMM a secretar factores solubles como IL-1b que inhibe células T aloreactivas. En términos generales el efecto de CMM sobre CPA juega un papel importante en la inhibición de la activación de células T(fig.11) (72).

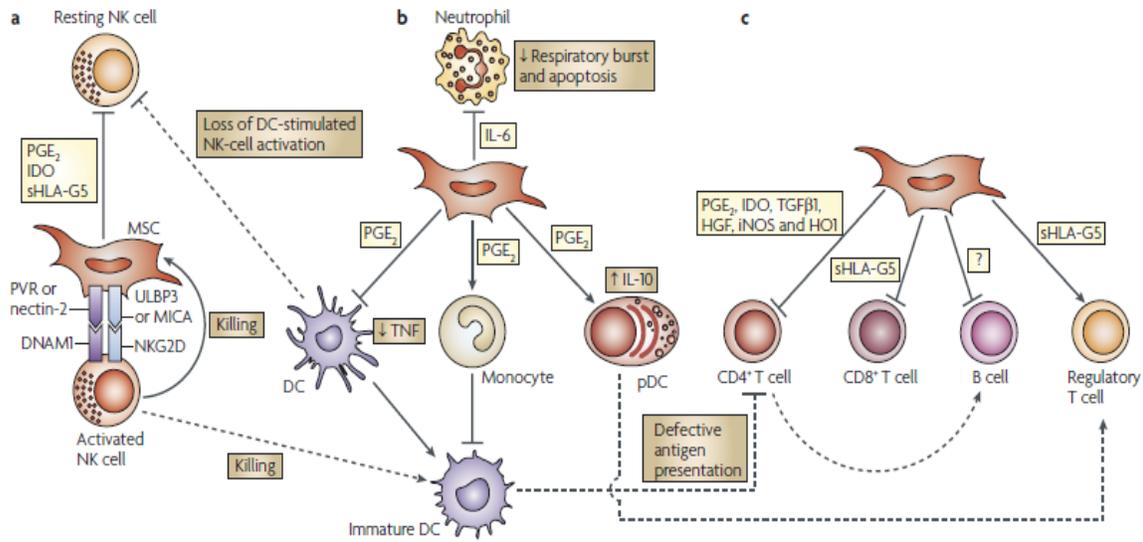


Fig.11. Posibles mecanismos de interacción entre las CMM y el sistema inmunológico (4).

- La CMM inhibe la proliferación, citotoxicidad y producción de citocinas, efectos mediados por la PGE₂, IDO, HLA, en la NK en estado latente natural y la producción de citocinas *in vitro*.
- Las CMM inhiben la diferenciación de monocitos a células dendríticas mieloides inmaduras la producción de TNF por las DC e incrementa la producción de IL-10 por las CD plasmacitoide. La PGE₂ derivada de CMM, está involucrada en todos estos efectos. Las DC inmaduras son susceptibles de morir por las NK activadas por citocinas.
- El efecto de la CMM sobre las DC mejora la estimulación de las DC maduras sobre las NK en reposo y compromete la presentación de antígeno a las cel. T, las cuales no pueden proliferar ni expandirse clonalmente, finalmente las CMM retrasan la apoptosis espontanea de los neutrófilos por liberación de IL-6.

d) La inhibición directa de la función de las células T CD4, depende de la liberación de varias moléculas por las CMM incluyendo PGE,IDO, TGF B1, HGF, sintasa-oxido-nítrico y oxígenasa hem-1. La activación defectuosa de las células T CD4 afecta la función cooperadora para la proliferación de las células B y producción de anticuerpos, la inhibición de la citotoxicidad de las cel. T CD8 y de la diferenciación de las células T reg es mediada directamente por las CMM, relacionadas con la liberación de S-HLA G5 por CMM. Además, la sobre regulación de la producción de IL-10 por células dendríticas plasmacitoides resulta en incremento de la generación de células T reguladoras; a través de un mecanismo indirecto. Las CMM dirigen la inhibición de la función de las células B, esto parece dependiente de factores solubles y contacto célula- célula, pero poco se sabe de la identidad de las moléculas involucradas.

APLICACIONES CLINICAS

La elevada capacidad multipotencial y la plasticidad de las células troncales mesenquimales las hace un blanco perfecto para su aplicación clínica. De hecho, gran parte de la literatura sobre células troncales mesenquimales en los últimos cuatro años se refiere, precisamente, a este aspecto. Su uso clínico, presente y futuro, abarca enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco y hematopoyético, entre otros (Fig.12) y está basado en una serie de estudios preclínicos realizados en modelos animales.

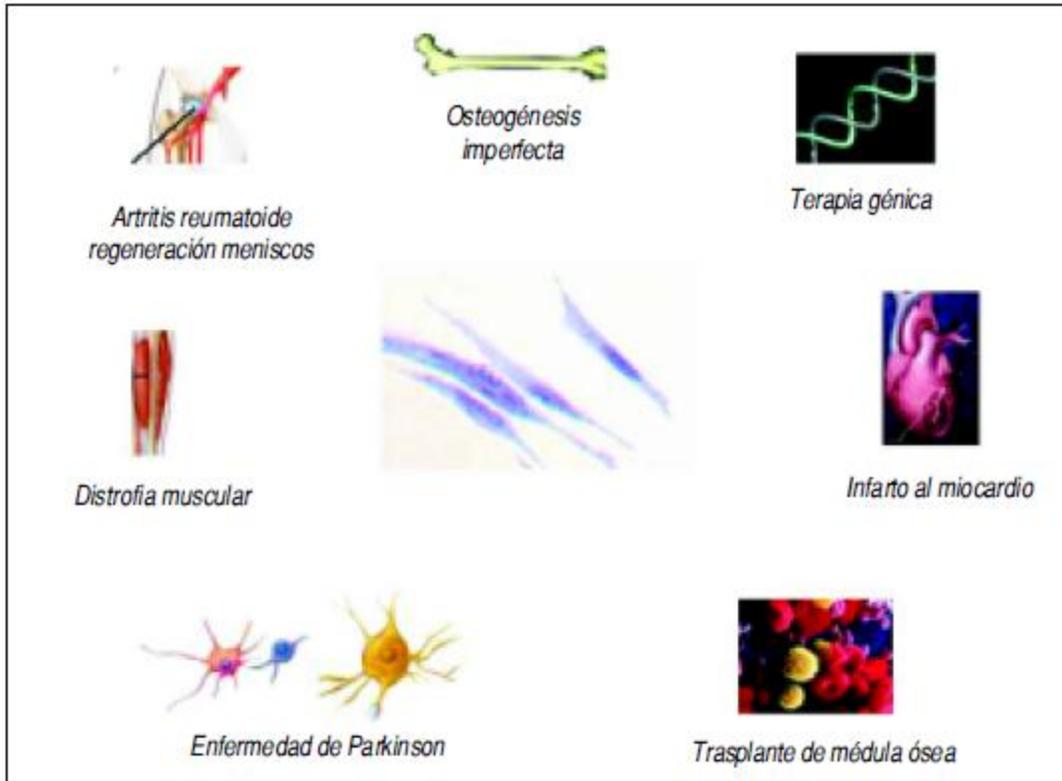


Fig.12. Diferentes usos clínicos de las células madre mesenquimales.

Como ya se ha mencionado, diferentes grupos han demostrado que estas células, después de haber sido cultivadas y expandidas *in vitro*, pueden ser transplantadas. En 1983, Piersma et al. Informaron que era posible transplantar por vía intravenosa no solamente células hematopoyéticas, sino también las unidades formadoras de colonias CFU-F. (73) Estos autores encontraron que después de tres meses de haber transplantado en un ratón previamente irradiado, 50% de la CFC-F obtenidas de médula ósea provenían del donador.

Posteriormente, quedó demostrado que en ratones irradiados, las células madre mesenquimales injertan no solamente en médula ósea, si no en diversos tejidos como cartílago, bazo, hígado, pulmón y cerebro (1,4).

En la mayoría de los estudios realizados en modelos animales, se utilizó la radiación como un tipo de acondicionamiento para el trasplante. Allers y col., en 2004, sin embargo, estudiaron la distribución de las células troncales mesenquimales después de ser transplantadas en ratones no irradiados y sin ningún tipo de acondicionamiento previo al trasplante (74). Este grupo encontró la presencia de las CMM en médula ósea, bazo y tejido mesenquimal, incluso después de un año postrasplante. Estos resultados apoyan el trasplante de CMM sin la necesidad de aplicar un tratamiento previo de quimioterapia o radiación a los pacientes. Otro modelo de estudio para evaluar el destino de las células transplantadas es el trasplante *in útero* en ovejas. En este tipo de modelo, Liechty y col.2000, transplantaron células troncales mesenquimales en ovejas fetales en etapas tempranas de la gestación. (75) Los autores encontraron que las células humanas transplantadas persistían en múltiples órganos después de 13 meses del trasplante. Las células transplantadas se diferenciaron en condrocitos, adipositos, miocitos, cardiomiocitos y células estromales de médula y timo.

En todos los estudios antes mencionados se utilizaron capas de células madre mesenquimales obtenidas únicamente por adherencia. Sin embargo, un estudio realizado por Bensidhoum y col.en 2004, demostró que dentro de dichas capas de células adherentes, existen subpoblaciones celulares con propiedades particulares que pueden ser empleadas de manera selectiva en modelos preclínicos (76). Estos autores reportaron que las células STRO-1 positivas, tienen una mayor capacidad para injertar en diversos tejidos, mientras que las células STRO-1 negativas, si bien no son tan eficientes en los modelos *in vivo*, tienen una mayor capacidad para mantener la hematopoyesis *in vitro*. Basados en sus resultados, estos autores han sugerido que las CMM STRO-1 positivas pueden ser las células mesenquimales más apropiadas para utilizar en terapia génica y celular. La confirmación de estos resultados por otros grupos de investigación será fundamental para dar paso a la aplicación clínica de esta población celular.

El empleo de las CMM en esquemas terapéuticos en humanos ya se ha realizado con éxito. Lazarus et al. han presentado evidencia al respecto, demostrando que las células troncales mesenquimales de humano pueden ser expandidas *in vitro* y transplantadas, sin causar efectos adversos; estas células son bien toleradas por los pacientes y pueden ser detectadas a distintos tiempos postransplante (77).

Las CMM han sido utilizadas para mejorar el injerto de otras células. En estudios *in vivo* en el modelo de xenotransplante en oveja fetal, se ha demostrado que el transplante simultáneo de células hematopoyéticas con células madre mesenquimales, tanto alogénicas como autólogas, resulta en incremento del injerto a largo plazo de células humanas, así como mayor número de células sanguíneas circulantes del donador durante la gestación y después del nacimiento (77).

Estos resultados pueden explicarse en parte, con los estudios recientes, los cuales reportaron que las CMM mejoraron los resultados del transplante alogénico promoviendo el injerto de las células hematopoyéticas y disminuyendo la enfermedad injerto contra huesped (GVHD, por sus siglas en inglés), al suprimir la activación de las células T (4).

Otra alternativa importante en la terapia celular es utilizar a CMM para promover la angiogénesis. Diversos estudios utilizando modelos de isquemia, han demostrado que estas células tienen un efecto positivo en la recuperación del flujo sanguíneo (19). Al menos dos mecanismos han sido propuestos para explicar el papel de las células troncales mesenquimales en este proceso. Por otro lado, existe evidencia experimental que indica la generación e incorporación de células endoteliales derivadas de las células troncales mesenquimales, a los capilares en formación, y por otra parte, un nuevo estudio ha demostrado que las MSC también promueven la angiogénesis a través de la secreción de citocinas como VEGF-A, FGF-2, IL-6, PIGF y MCP-1 (19).

Estas células han sido ampliamente utilizadas para la formación de cartílago en modelos animales. Por ejemplo, Murphy et al en 2000, reportaron el trasplante de células madre mesenquimales de cabra en las rodillas de cabras, a las cuales se les había realizado una menisectomía y la resección del ligamento anterior. (78). Después de un lapso de tiempo se encontró que había regeneración del tejido del menisco y disminución en la destrucción del cartílago. Las células del tejido reparado tenían el marcador de las células del donador.

El potencial más prometedor del uso de las CMM es en aquellas enfermedades en las que hasta el momento no existe una terapia curativa, como es el caso de la osteogénesis imperfecta, el infarto al miocardio o la enfermedad de Parkinson, entre otras.

Los estudios de terapia celular para tratar a la osteogénesis imperfecta han avanzado desde modelos murinos (19), hasta su aplicación clínica. Se han realizado tres trasplantes alogénicos de médula ósea en niños con osteogénesis imperfecta severa. Los investigadores encontraron que la CMM injertaron y que habían migrado e incrementado la formación de hueso en los tres niños. Estudios posteriores utilizaron genes marcados de CMM derivadas de médula ósea de donantes alógenicos para el tratamiento de seis niños que habían sometido a trasplante de médula ósea para el tratamiento de osteogénesis imperfecta severa. Cada niño recibió dos infusiones de células alogénicas, en cinco de seis pacientes, el injerto se hizo evidente en uno o más sitios, incluyendo hueso piel y estroma medular, estos cinco pacientes tuvieron una aceleración de la velocidad de crecimiento celular durante los primeros seis meses después de la infusión. Estas mejoras fueron asociadas con aumento de velocidad de crecimiento y menor frecuencia de fracturas, los autores concluyeron que el trasplante alogénico puede llevar a injerto de CMM funcionales, lo que indica la viabilidad de esta estrategia en el tratamiento de la osteogénesis imperfecta. Este estudio también demostró que la CMM transplantadas de médula ósea pueden migrar en

los niños con osteogénesis imperfecta y luego dar lugar a los osteoblastos, correlacionados con una mejora en la estructura ósea y función (79).

En el infarto al miocardio, los resultados han sido también favorables. Cuando se introducen células madre mesenquimales en el área infartada del corazón, éstas previenen el remodelado anormal del tejido y mejoran su recuperación funcional, lo que resulta en una mejoría clínica de los pacientes. (19) Aunque todavía falta por conocer el papel de las células madre mesenquimales en la diferenciación del tejido cardíaco en la cicatriz, y su rechazo inmunológico, los resultados hasta ahora son alentadores. Sin duda, hoy en día la CMM es de gran interés para la biomedicina. Hasta el momento, el uso de estas células en la clínica ha probado no tener riesgos para el individuo, no son capaces de producir teratomas e inhiben el rechazo inmunológico al ser transplantadas. Es por eso importante continuar con el estudio de estas células para conocer más de su biología, su capacidad de diferenciación y su papel en diversas enfermedades hematológicas, así como su aplicación en terapia celular y medicina regenerativa.

Sin embargo, deben valorarse los riesgos potenciales de cáncer en los tratamientos con CMM ya que aumentan la neovascularización del tejido isquémico y ese efecto puede resultar negativo si incrementa el crecimiento de tumores. En el modelo de melanoma murino las CMM reducen la vigilancia inmune sobre los tumores. También la manipulación *in vitro* de las CMM puede causar anomalías citogenéticas que pueden ser responsables de procesos cancerosos tras su administración *in vivo*, como se ha demostrado en ratón (80). Los cultivos de CMM presentan limitaciones porque con el tiempo presentan una tasa de reducción de proliferación atribuible al acortamiento de los telómeros y la senescencia de las células, para contrarrestar este problema se utilizan factores de crecimiento y suero fetal bovino (SFB), el uso de éste es motivo de preocupación por el temor de la transmisión de priones y zoonosis aún no identificadas, a pesar que los lotes de SFB son rutinariamente seleccionados para cumplir con los requisitos de seguridad de la biotecnología de cultivos celulares. Por otra parte la

administración de productos tales como Prochymal, Provacel, y Chondrocen ayudara a mejorar las perspectivas para el consumo humano en la terapia con CMM, estos productos están diseñados para proporcionar un beneficio terapéutico mediante el control de la inflamación, la generación de tejidos y la formación de cicatriz (79).

CONCLUSIONES

- Las CMM representan una línea celular con alto potencial para aplicación en la terapia celular, el tratamiento de algunas enfermedades, y como línea de investigación.
- El hecho que este tipo de células puedan diferenciarse a distintos tejidos las hace especiales y diferentes puesto que se pueden manipular con suplementos en los medios de cultivo dando como resultado las células que se requieran, como pueden ser adipocito, condrocito, osteocito, neuronas etc .
- El uso que se les ha dado es experimental en algunas enfermedades, como la osteogénesis imperfecta y en la enfermedad injerto contra huésped en los trasplantes de células hematopoyéticas, así como en tratamientos contra el cáncer.

BIBLIOGRAFIA

1. Zhang ZL, Tong J, Lu RN, Scutt AM, Goltzman D, and Miao DS. Therapeutic potencial of non- adherent BM- derived mesenchymal stem cell in tissue regeneración. Bone Marrow Transplant 2009; 43: 69-81.
2. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales. Revista, Investigación clínica 2006; 58: 498-511.
3. Guerrero PD, Romero JA, Rodriguez PVM. Evaluación de Características Morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales. NOVA- Publicación científica en ciencias Biomédicas 2007; 5:101-115
4. Ucelli A, Moretta L and Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Reviews. Immunol. 2008; 8: 726-736.
5. Sadler TW. Embriología Médica. Ed. Médica Panamericana. Buenos aires 2004.
6. Summer R, Fine A. Mesenchymal progenitor cell research. Proc Am Thorac Soc.2008; 5: 707-710.
7. Mendes SC, Robin C, Dzierzak E. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. Development 2005; 132: 1127-36
8. Durand C, Robin C, Dzierzak E. Mesenchymal lineage potentials of aorta-gonad-mesonephros stromal clones. Haematologica 2006; 92:1172-79
9. Lanza R, Blau H, Gearhart J, Hogan B, Melton D y col. Handbook of stem cells. Editorial Hardbound. Estados Unidos 2004.
10. Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cell. Stem Cells 2008; 26: 2287-99.
11. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klsuter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem cells 2006; 24: 1294-301.
12. Summer R, Fine A. Mesenchymal progenitor cell research. Proc Am Thorac Soc. 2008; 5: 707-10.

13. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, et al. The immunophenotype of human adipose derived cell: Temporal changes in stromal and stem cell-associated marker. *Stem Cells* 2006; 24: 376-85.
14. Kof CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal Stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9: 204-13.
15. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: Surface Characteristics and the integrin system. *J Cell Mol. Med.* 2007; 11: 21-38
16. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*. 2006; 13: 419-25
17. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review. Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25: 2739-49.
18. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
19. Ye C, Jian-zhong S, Li-xin X, Xue-Jun D, Guo-Rong Z. Mesenchymal Stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 814-820.
20. Guerrero D, Arévalo J, Rodríguez V. Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. *NOVA*. 2007; 5: 114-26.
21. Kassem M, Pizzolo G, Basem M. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. Biological Characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res*. 2007; 331: 157-63
22. Weismann H, Meyer U. *Bone and cartilage Engineering*. Ed. Springer. Estados Unidos 2006.
23. Arévalo JA, Páez DM, Rodríguez VM. Células madre mesenquimales: Características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA*. 2007; 5: 177-84.

24. Isacke C, Horton M. The adhesion molecule factsbook. Ed. Paperbach, 2a Edición. Londres 2000.
25. Arias L, Niemela J, Salmi M, Puurunen, Smith DJ, Jalkanen S. Differential regulation and function of cd 73, a glycosyl-phosphatidylinositol- linked 70-kd adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells J cells. J Cell Biol. 1997; 136: 421-31
26. Haeryfar SM, Hoskin DW. Thy- 1: more than a mouse pan-t cell marker. J Immunol. 2004; 173: 3581-88
27. Fonsatti E. Maio M. Highlights on endoglin (cd105):from basic findings towards clinical applications in human cancer. J Transl Med. 2004; 2: 18-24.
28. Regueiro JR, López C, González S, Martínez E. Inmunología: Biología y patología del sistema inmune. Ed. Médica Panamericana. 3ª edición. Madrid 2002.
29. Phillips JE, Gersbach CA, Wojtowicz AM, García AJ. Glucocorticoid- induced Osteogenesis is negatively regulated by run x2/ cbfa 1 Serine phosphorylation. J Cell Sci. 2006; 119: 581-91
30. Hall BK. Bones and Cartilage: Developmental Skeletal Biology. Ed. Hardbound. 1a edición. Cánada 2005
31. Hamade E, Azzar G, Radisson J, Buchet R, Roux B. Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro. Eur J Biochem. 2003; 270: 2082-90
32. Xiao G, Cui Y, Du cy P, Karsenty G, Franceschi RT. Ascorbic acid- dependent activation of the osteocalcin promoter in mc3t3- e 1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact ose 2 sequence. Mol Endocrinol. 1997; 11: 1103-13.
33. Geneser F. Histología. Ed. Médica Panamericana. 2ª edición Argentina 1993.
34. Viveros Cortés, Laviada Molina H, Bastarrachea Sosa R. Influencia endocrina y paracrina sobre la adipogénesis. Endocrinologia Nutr. 2002; 10: 151-64
35. Rosen E. The Transcriptional basis of adipocyte development. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2005; 73: 31-4.

36. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006; 4: 263-73.
37. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1997; 272: 3406-10.
38. Han F, Gilbert JR, Harrison G, Adams CS, Freeman T, et al. Transforming growth factor- β 1 regulates fibronectin isoform expression and splicing factor srp 40 expression during atdc5 chondrogenic maturation. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 1518-32.
39. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazinghi B, Pizzolo G, Vinante F, et al. Role of the IFN γ in the immunomodulatory activity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2005; 24: 386-398.
40. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J Immunol* 2003; 57: 11-20.
41. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 389-97.
42. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with involved in alloantigen specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets, expressing a regulatory/ suppressive phenotype. *Haematologica.* 2005; 90: 516-525.
43. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66.
44. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.

45. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V y col. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 2005; 12: 47-57.
46. Le Blanc K, Tammik L, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Haematol* 2003; 31: 890-6.
47. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T- cell proliferation by human marrow stromal cell: implications in transplantation 2003; 75: 389-97.
48. Kolf C, Cho E, Tuan R.. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007;9:204.
49. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T- cell responses by indoleamine 2,3 – dioxygenase mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103: 4619- 4621.
50. Otiropoulou P A, Perez S A, Gritzapis AD, Baxevasis CN, Papamichail M.. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural Killer cells. *Stem Cells* 2006; 24: 74-85.
51. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003; 76: 1208-13.
52. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res* 2005; 305: 33-41.
53. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D y col. Human mesenchymal stem cells alter antigen- presenting cell maturation and induce T- cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105: 2214-9
54. Di Nicola M, Carlo- Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM,. Human bone marrow stromal cells Suppress T- lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843.

55. Liu J, Lu XF, Wn L y col. Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbredline. *Transplant Proc.* 2004;36: 3272-5.
56. Munn DH, Zhou M, Attwood JT y col. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1988; 281: 1191-3
57. Alma J. Nauta and Willem E. Fibbe. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Review in translational hematology. Blood* 2007;11: 3499-3504.
58. Varesiol, Clayton M, Blasi E, Ruffman R, Radzioch D. Picolonic acid, a catabolite of tryptophan, an the second signal in the activation of IFN- γ -primed macrophages. *J Immunol* 1990; 145: 4265-4271.
59. Terness, Peter. Chuang, Jing-Jing and Opelz, Gerhard. The immunoregulatory role of IDO- producing human dendritic cells. *Trends Immunol* 2006 ;27: 68-73.
60. Chan JL, Tang KC, Patel AP y col. Antigen- presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- γ . *Blood* 2006; 107: 4817-24.
61. Arikawa T. Omura K, Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell physiol* 2004; 200: 400-6.
62. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-22.
63. Akasaki Y, Liu G, Chung NH, Ehtesham M, Black KL, Yu JS. Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase- 2- over expressing glioma. *J Immunol* 2004; 173: 4352-9.
64. English, Karen, Barry, Frank P., Fiedd- Corbett, Ciara P, Mahona, Bernard P. IFN- γ an TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 2007; 110: 91-100
65. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2003; 5: 485-489.

66. Augello A, Tasso R, Negrini SM y col. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1482-90.
67. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E. y col. Human mesenchymal stem cells modulate B- cells functions. *Blood* 2006; 107: 367-72.
68. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringden O. Mesenchymal Stem Cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* 2007; 65: 336-43.
69. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cell. *Stem Cells* 2006; 24: 74-85.
70. Jiang XX, Zhang Y, Liu B y col. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte- derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105: 4120-6.
71. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*. 2006; 108: 1435-1440.
72. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte- mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp. Hematol* 2005; 33:928- 34.
73. Piersma AH, Ploemacher RE, Brockbank KG. Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *J Haematol* 1983; 54: 285-90.
74. Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, Rivera F, Minguell J. Conget PA. Dynamic of distribution of human bone marrow derived mesenchymal stem cell after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation* 2004;78: 503-8.
75. Lienchty KW, Mackenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AB, Dean R, Marshack DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site- specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6: 1282-6.
76. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, et al. Homing of in vitro expanded stro-1- or stro-1⁺ human mesenchymal

- stem cells into the NOD/ SCID mouse and their role in supporting human CD 34 cell engraftment. *Blood* 2004; 103: 3313-9.
77. Lazarus H, Haynesworth S, Gerson S, Rosen thal N, Caplan A. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow- derived stromal progenitor cells: Implications for therapeutic use. *Bone Marrow transplant* 1995; 16: 557- 64.
78. Murphy JM, Kavalkovitch KW, Fink D, Barry FP. Regeneration of meniscal tissue and protection of articular cartilage by injection of mesenchymal stem cell. *Osteoarthritis cartilage* 2000 ; 8 : 525.
79. Anita H. Undale, MBBS, PHD; Jennifer J. Westendorf. Mesenchymal stem cells for Bone Repair and Metabolic Bone Diseases. *Mayo Clin Proc.*2009;84: 893-902.
80. Tyndall A. Uccelli A. Multipotent mesenchymal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43:821-828.