



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de un protocolo de diferenciación de
células madre pluripotentes en células madre
mesenquimales utilizando lisado de plaquetas
como suplemento de cultivo**

Tesista

Santiago Gabriel MIRIUKA

Directora de Tesis

Dra. Ana Lía ERRECALDE

19 de agosto de 2016

a Andrea
a Felipe
a Franco

Resumen

Las células madre pluripotentes se caracterizan por ser capaces de diferenciarse a cualquier tipo de célula adulta. Son, en realidad, un cultivo celular anclado en un estado evolutivo correspondiente a las primeras etapas del desarrollo. Por otro lado, las células madre mesenquimales presentan una capacidad de diferenciación mucho más restringido, y sólo son capaces de diferenciarse a células adiposas, a condroblastos o a osteoblastos. Sin embargo, este es un tipo celular presente en todo el cuerpo, se cree que en forma de pericitos, y que posiblemente tenga funciones de intervenir en la homeostasis y reparación de tejidos dañados. Además, las células madre mesenquimales presentan una poderosa capacidad de inmunomodular la respuesta inmune. Por otro lado, se ha demostrado que las células madre pluripotentes sean capaces de diferenciarse a células madre mesenquimales, aunque no existe un protocolo único para esta diferenciación, y parecieran existir múltiples formas de lograr este proceso. La hipótesis de esta tesis es que es posible realizar una diferenciación de células madre pluripotentes en células madre mesenquimales utilizando como principal suplemento del medio de cultivo al lisado de plaquetas, sustancia fácilmente accesible y de bajo costo.

A lo largo de este trabajo se realizaron diferentes experimentos para desarrollar un modelo de diferenciación efectivo con un medio de cultivo suplementado con lisado de plaquetas. Estos experimentos demostraron la capacidad robusta y definida del protocolo generado para diferenciar células madre pluripotentes en células madre mesenquimales y confirmaron extensamente la identidad de las células desarrolladas. Se realizó una evaluación extensa de los marcadores de superficie de las células, así como también una descripción de cómo los mismos evolucionan durante la diferenciación. Finalmente, se realizó una caracterización funcional de las células obtenidas. Los resultados de este trabajo aportan un nuevo protocolo, fácil y biocompatible, para generar células madre mesenquimales de células madre pluripotentes.

Agradecimientos

Desde mi ingreso a la facultad en 1990, nunca he dejado de realizar algún tipo de formación universitaria. Pero ya está, creo. Entonces, cronológicamente debo agradecer a los que contribuyeron a llegar a este final de ciclo.

A lo largo de mi carrera mi familia ha sido el gran motor. Andrea me acompaña desde que estudiaba medicina, es decir, en cada etapa universitaria que transité. Eso dice todo lo imprescindible que es. Luego vinieron Felipe y Franco, quienes a su manera ayudaron estos años. Fredy y Mary siempre estuvieron y me siguen estimulando. Sebastián y Lucas también forman parte de ese entorno. Todos ellos son esta tesis.

Durante los años de estudio de Medicina en la UNLP debo agradecer a dos personas. Primero, a Puchu. El sabe que contribuyó en mucho, particularmente me despertaba temprano a estudiar. A la segunda persona es a Jorge Martínez, quién fue mi mentor durante mi carrera.

Luego, durante mi residencia de cardiología y la Especialización en la UBA, debo agradecer a Hugo Grancelli. Hugo siempre estimuló mi interés por la investigación, y fue él quien me sugirió fuertemente que me fuera al exterior.

En la Universidad de Toronto le tengo que agradecer profundamente a varias personas. Primero a Diego Delgado. Fue quien me llevó y quien convenció a Heather que debía tomarme para el puesto de fellow. Nunca había hablado con Heather hasta que llegué a Toronto, es decir, fue confianza a ciegas gracias a Diego. Entonce también a Heather Ross, quien siempre me ofreció todas las oportunidades posibles que se le pueden dar a un extranjero para que se quede en su país, pero fracasó. A Vivek Rao, quien me dio una visión de hacia dónde y como me podía dirigir en una carrera clínica que mezcle la investigación básica. Creo que no sabe que en la primera reunión que tuve con él no le entendí nada de su inglés hindú. A Thomas Wadell, quien junto con Vivek me supervisaron durante mi tesis de maestría en la Universidad de Toronto. Finalmente, a David Cole. Un día le dije a David que no le entendía nada de lo que me explicaba (genética de la herencia), y si realmente entonce creía que valía la pena. Me dijo que si no lo creyese, no perdería el tiempo.

A mi vuelta, debo agradecer a Gustavo Sevelev, quien confió en muchos disparates que después se concretaron, y siguen confiando. También a Alejandra Guberman, quien se atrevió a supervisarme en los primeros años de mi carrera como investigador en el CONICET, y sigue ayudando permanentemente.

Para la realización de esta tesis, debo agradecer a mi directora Ana Lía Errecalde, a Marcela García y a Carlos Luzzani. Todos fundamentales para esta tesis. Además, debo agradecer al Servicio de Hemoterapia de FLENI, proveedor de incontables bolsas de plaquetas.

Finalmente, pertenezco a un laboratorio que trabaja con las células madre. Todos ellos hicieron posible la realización de esta tesis, y continúan trabajando activamente para que el laboratorio siga creciendo. Entonces, gracias a Marie, Leo, Caro B, Questa, Willy, Xime, Gabi, Lucia, Natalia, Vero, Darío y Oliver.

Índice general

1.	Introducción	1
1.1.	Definición y clasificación de las células madre	1
1.2.	Células Madre Pluripotentes	4
1.3.	Células Madre Mesenquimales	7
1.4.	La formación del mesodermo y la transición epitelio-mesenquimal en las células madre pluripotentes	11
1.4.1.	La formación del mesodermo y la transición epitelio-mesenquimal en el desarrollo embrionario	11
1.4.2.	La diferenciación a mesodermo de las células madre pluripotentes	15
1.4.3.	Señales moleculares involucradas en la formación del mesodermo	16
1.5.	Diferenciación de células madre pluripotentes en células madre mesenquimales	18
1.6.	Uso de lisado de plaquetas como suplemento del medio de cultivo celular	22
2.	Hipótesis y Objetivos	27
3.	Materiales y Métodos	29
3.1.	Preparación del lisado de plaquetas	29
3.2.	Células	29
3.3.	Cultivo celular	31
3.4.	Cuantificación del crecimiento de la población celular	32
3.5.	Microscopía fluorescente	32
3.6.	Citometría de flujo	33
3.7.	Reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (qPCR)	33
3.8.	Diferenciación y análisis de las células madre mesenquimales	35
3.9.	Evaluación de la capacidad de inmunomodulación	36
3.10.	Análisis del estado de metilación del promotor de Oct-4	37
4.	Resultados	41
4.1.	Células madre pluripotentes: caracterización del cultivo celular	41
4.2.	Efectos del lisado de plaquetas sobre colonias de CMP indiferenciadas	41
4.3.	Utilización del lisado de plaquetas para la diferenciación de las CMP	41
4.4.	Caracterización del fenotipo de las células mesenquimales diferenciadas	45
4.4.1.	Marcadores de superficie de células madre mesenquimales	45
4.4.2.	Marcadores de superficie de células madre hematopoyéticas	45
4.4.3.	Marcadores de superficie de células endoteliales	45
4.4.4.	Marcadores de superficie de células madre pluripotentes	48
4.5.	Análisis comparativo de las diferentes poblaciones celulares	48
4.5.1.	Expresión de genes asociados a células madre mesenquimales	48

4.5.2.	Marcadores de superficie celular	49
4.5.3.	Metilación del promotor de Oct-4	54
4.6.	Crecimiento de las células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes	54
4.7.	Evidencias y dinámica de la transición epitelio-mesenquimal en la diferenciación de las células madre pluripotentes	55
4.7.1.	Evaluación dinámica por qPCR de la caída de la expresión de los genes de pluripotencia	55
4.7.2.	Evaluación dinámica por qPCR de la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesenquimal	57
4.7.3.	Evaluación dinámica por citometría de flujo de los marcadores de superficie relacionados con la transición epitelio-mesenquimal	57
4.7.4.	Evaluación dinámica por citometría de flujo de los marcadores de superficie de células madre mesenquimales	57
4.8.	Características funcionales de las células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes: Multipotencia	60
4.9.	Características funcionales de las células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes: Inmunomodulación	60
4.10.	Hacia una teoría unificada de la diferenciación mesenquimal de las células madre pluripotentes	61
5.	Discusión	65
5.1.	Identidad de las células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes (CMM-DP)	67
5.2.	¿Por qué es tan fácil derivar células madre mesenquimales de células madre pluripotentes?	68
5.3.	Lisado de Plaquetas	71
5.4.	Alcances potenciales biotecnológicos y clínicos de los hallazgos de esta investigación	72
5.5.	Líneas de investigación a futuro	73
6.	Conclusiones	77
7.	Citas Bibliográficas	79
8.	Apéndice	99

Índice de figuras

1.	Clasificación evolutiva de las células madre	3
2.	Métodos para la generación de células madre pluripotentes	8
3.	Transición epitelio-mesenquimal	12
4.	Formas de transición epitelio-mesenquimal	13
5.	Transición epitelio-mesenquimal en el desarrollo embrionario	14
6.	Descripción de los fenómenos de transición epitelio-mesenquimal y mesenquimo-epitelial en los diferentes contextos celulares	17
7.	Correlación de la expresión génica entre las células madre pluripotentes y las células madre mesenquimales	20
8.	Capacidad de inmunomodulación de las CMM-DP	21
9.	Concentración de diferentes factores de crecimiento presentes en el lisado de plaquetas	24
10.	Efectos del lisado de plaquetas sobre las células en cultivo	24
11.	Generación de lisado de plaquetas	30
12.	Expresión de marcadores de indiferenciación en células madre pluripotentes . . .	42
13.	Efectos del lisado de plaquetas sobre las células madre pluripotentes	42
14.	Inmunomarcación de células madre pluripotentes expuestas a lisado de plaquetas	43
15.	Expresión por qPCR de marcadores de pluripotencia en células madre pluripotentes expuestas a lisado de plaquetas	43
16.	Descripción esquemática del protocolo de diferenciación de CMP a CMM-DP . .	44
17.	Análisis de la expresión de marcadores de células madre mesenquimales de las CMM-DP generadas	46
18.	Análisis de la expresión de marcadores de células hematopoyéticas de las CMM-DP generadas	47
19.	Análisis de la expresión de marcadores de células endoteliales de las CMM-DP generadas	47
20.	Análisis de la expresión de marcadores de células madre pluripotentes de las CMM-DP generadas	48
21.	Análisis comparativo por qPCR de la expresión de genes relacionados con células mesenquimales en diferentes poblaciones celulares	50
22.	Análisis por citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie mesenquimales en diferentes poblaciones celulares	51
23.	Análisis por citometría de flujo de la expresión de integrinas en diferentes poblaciones celulares	52
24.	Análisis por citometría de flujo de la expresión de marcadores de pluripotencia en diferentes poblaciones celulares	53

25.	Análisis del estado de metilación/demetilación de la zona promotora del gen Oct-4	55
26.	Evaluación de la proliferación celular por medio de la cuantificación del número de células totales	56
27.	Análisis por qPCR de la expresión de genes de pluripotencia a lo largo de la diferenciación	56
28.	Análisis por qPCR de la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesenquimal	58
29.	Evaluación por citometría de flujo de la expresión de CD324 y CD325 durante la diferenciación	58
30.	Análisis por citometría de flujo de la expresión evolutiva de diferentes marcadores de superficie	59
31.	Análisis de la capacidad de diferenciación multipotente de las CMM-DP	60
32.	Metodología para la evaluación de la inmunomodulación por parte de las CMM-DP	62
33.	Análisis de la inmunomodulación producida por las CMM-DP	63
34.	Imágenes de la diferenciación de CMP a CMM-DP utilizando diferentes suplementos	63
35.	Análisis por qPCR de la diferenciación de CMP a CMM-DP utilizando diferentes suplementos	64
36.	Diferencias entre CMEh y CMM en la expresión de ARN y de proteínas analizadas por secuenciación y proteómica	69

Índice de cuadros

1.	<i>Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.</i>	34
2.	<i>Primers utilizados en qPCR.</i>	35
3.	<i>Primers utilizados en el análisis del estado de metilación de la zona promotora del gen Oct-4.</i>	39
4.	<i>Valoración semi-cuantitativa de la expresión de los diferentes marcadores de superficie en las diferentes poblaciones celulares analizadas.</i>	54

Abreviaturas

CMA	Células madre adulta
CMEh	Células madre embrionarias humanas
CMM	Células madre mesenquimales
CMM-CU	Células madre mesenquimales de cordón umbilical
CMM-DP	Células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes
CMM-DP _{LP}	Células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes en lisado de plaquetas
CMM-DP _{SFB}	Células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes en suero fetal bovino
CMM-MO	Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea
CMM-TA	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
CMP	Células madre pluripotentes
CMPi	Células madre pluripotentes inducidas
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
FIB	Fibroblastos
iMEF	<i>inactivated mouse embryonic fibroblasts</i> (fibroblastos de ratón inactivados)
KSR	<i>Knock-out serum replacement</i> (reemplazo de suero <i>knock-out</i>)
LP	Lisado de plaquetas
PBS/BSA	<i>Phosphate Buffer Solution/Bovine Serum Albumin</i> (Solución buffer de fosfato/albúmina bovina sérica)
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (reacción de polimerasa en cadena)
SFB	Suero fetal bovino
TEM	Transición epitelio-mesenquimal
TME	Transición mesenquimo-epitelial

1. Introducción

A fines del siglo XIX el biólogo alemán Ernst Haecker desarrolló una hipótesis en la cual sostenía que todas las células debían tener un origen común, y que esta célula original debía auto-renovarse constantemente como un mecanismo de reemplazo celular y perpetuación (Edwards, 2004; Maehle, 2011; Ramalho-Santos & Willenbring, 2007). Haecker trasladó sus conocimientos acerca de los campos de la biología evolutiva y generó un árbol genealógico acerca del origen de las células, y nombró así a la fuente celular primaria (el tronco de ese árbol) como *stammzellen* (célula tronco en Alemán). Otros autores continuaron con estos conceptos, y observaron algunos organismos en los cuales describieron la existencia de una célula troncal (stem cell), denominación que más tarde en la traducción al español fue célula madre. Pero la demostración cabal de la existencia de este tipo de células vino en la década del '60. En aquellos tiempos, Till y colaboradores, trabajando en Toronto, Canadá, estudiaban los efectos de la radiación letal en ratones y encontraron que la médula ósea era capaz de regenerar la población de células hematopoyéticas de estos ratones irradiados. (Becker, McCulloch, & Till, 1963; Till & McCulloch, 1961) En particular, describieron la aparición de tumores de células proliferativas de estirpe hematopoyético en el bazo luego de la inyección de células de la médula ósea, y consideraron entonces que debía existir una célula troncal que permitiera la aparición de estos centros de producción de células. Estas investigaciones confirmaron empíricamente la idea que en la médula ósea existían células troncales o madre, que permitían la continua renovación de las células hematopoyéticas. Este hallazgo tomó forma en los años subsiguientes y dio paso a la aparición del trasplante de médula ósea clínico, en donde luego de una irradiación total que elimina todas las células madre nativas, éstas pueden ser reemplazadas inyectando nuevas células madre compatibles, autólogas o heterólogas. Durante años el concepto de células madre quedó restringido a esta población celular de origen hematopoyético. En los últimos años, sin embargo, el concepto de célula madre se expandió a raíz de las investigaciones que demostraron la existencia de células madre en otros órganos, y que éstas eran capaces de cumplir con funciones similares a las de las células madres hematopoyéticas. Es decir, eran células con capacidad de regenerar una población de células diferenciadas, las cuales disminuían en número por algún motivo. Comenzó entonces a tomar forma la idea que en el cuerpo humano existen tantas células madre como células que necesitan ser reemplazadas, ya sea por el desgaste por uso, o por procesos circunstanciales, como la destrucción tisular traumática o patológica.

1.1. Definición y clasificación de las células madre

Basados en la idea expresada en los párrafos anteriores, surge entonces la definición actual de célula madre. En primer lugar, este tipo de células debe tener la capacidad de reproducirse y generar dos células hijas, las cuales deben a su vez poder perpetuar la población de células madres. Es decir, al menos una de ellas debe permanecer en estado indiferenciado luego de la división celular. Por lo tanto, la primera característica de una célula madre es la *auto-renovación*. El segundo concepto que las define es que estas células hijas pueden adoptar un fenotipo diferente a la célula madre y adquirir nuevas características biológicas no presentes en la células madre original. Entonces, la segunda característica de las células madre es que presentan la capacidad de *diferenciación*. Por último, la definición de la célula madre incluye necesariamente una característica: la capacidad de *auto-regulación*. De no existir esta capacidad de regularse, las células pueden dividirse y expandir

su población sin control. Actualmente se cree que la alteración de esta propiedad es el origen de los tumores, en donde una célula madre pierde la capacidad de controlarse y se reproduce sin control (Wobus & Boheler, 2005).

Tomando en consideración la definición anterior es posible asumir que el número de células en un organismo con estas características es enorme y de variada importancia. Cada tejido entonces puede presentar una o más células madre potenciales que tengan la habilidad en cuestión. Pero la capacidad de diferenciarse de una célula madre es variada, y entonces esto nos lleva a otro concepto: la potencialidad de diferenciación. Con esta consideración surge la idea que una célula madre es completamente potente sólo si es capaz de generar en su diferenciación todo tipo celular de un organismo. Esta propiedad ha sido llamada *totipotencia*. Este es el caso, único, del huevo o cigota, la primera célula luego de la concepción. Esta célula puede generar así todas las que sobrevienen a partir del desarrollo embrionario, inclusive aquellas que forman parte de los tejidos extra-embrionarios. A partir de las sucesivas divisiones celulares, esta cualidad se pierde, y aparecen células que pueden diferenciarse en todo tipo de células de un organismo adulto pero con algunas restricciones. Estas células, llamadas *pluripotentes*, tienen una capacidad de diferenciación algo más limitada que el cigoto ya que no pueden generar células de los tejidos extra-embrionarios. Ejemplo de este tipo de células incluyen a las presentes en el macizo celular interno de un blastocisto y a las células epiblasticas del disco embrionario. Pero a medida que transcurre el desarrollo del organismo, las capacidades de diferenciación se restringen y aparecen las llamadas células madre *multipotentes*. En este tipo celular la capacidad de diferenciación se limita a unos tipos específicos. Ejemplos de este tipo incluye a las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales. Finalmente, existen células madre que tienen una potencia de diferenciación mucho más restringida, y por ende son capaces de diferenciarse solamente en un tipo de células. Éstas son habitualmente conocidas como células madre *progenitoras*. Por ejemplo, las células progenitoras del bulbo piloso, o las presentes en las bases de las criptas intestinales. Esta descripción establece entonces una clasificación evolucionista de las células madre como se observa en la figura 1, en la cual las más indiferenciadas (totipotentes y pluripotentes) son capaces de diferenciarse en muchos tipos celulares, mientras que las multipotentes y progenitoras presentan una capacidad de diferenciación más restringida.

De la descripción anterior también se desprende otra clasificación más simple de las células madre, la cual se basa en el tejido de origen. Así, inicialmente las células madre eran clasificadas en células madre embrionarias y células madre adultas, por derivarse de esos tejidos. Los avances de la investigación modificaron algo estos conceptos, y actualmente las células madre embrionarias (CME) son conocidas como células madre pluripotentes (CMP), las cuales incluyen a las células madre embrionarias, a las células pluripotentes inducidas (CMPi) y a las células madre epiblasticas. Estas, como se deduce de su nombre, pueden generar cualquier tipo celular derivado de las tres capas germinales: ecotodermo, mesodermo o endodermo. Por otro lado las células madre adultas incluyen a todos los tipos celulares derivadas de tejidos desarrollados, como las células madre mesenquimales (CMM) generadas a partir de la médula ósea o de tejido graso. Actualmente también la literatura reconoce a las células madre fetales como un tipo de célula madre adulta. Las células derivadas de tejidos fetales comprenden diversos tipos de células madre, e incluye a las células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical (CMM-CU), las células hematopoyéticas del cordón umbilical, y las células madre placentarias.

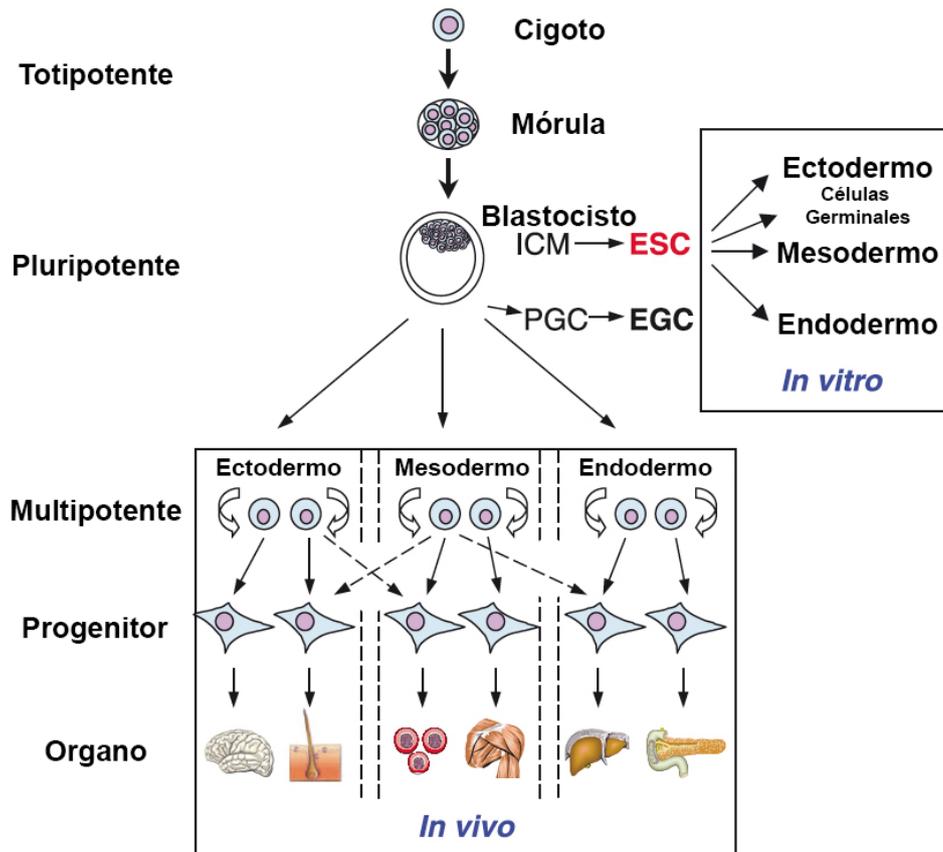


FIGURA 1: Clasificación evolutiva de las células madre. Las células madre pueden ser clasificadas según la escala evolutiva en que se encuentran. Así, existen células con amplio potencial de diferenciación (células madre totipotentes o pluripotentes) y células madre con potencial de diferenciación restringido (células madre multipotentes o progenitoras). Tomado de Wobus y Boheler, 2005.

1.2. Células Madre Pluripotentes

La idea de cultivar *in vitro* células con capacidades pluripotentes fue elaborada décadas atrás. A mediados del siglo XX existían dos líneas de investigación en este tema. Por un lado, se cultivaban células aisladas de teratocarcinomas de ratón, las cuales presentaban la capacidad de diferenciarse a las tres capas germinales. Sin embargo, estas células presentaban anomalías cromosómicas mayores, y por lo tanto no eran modelos experimentales de calidad apropiada. En otra línea de investigación, muchos autores trabajaban en la búsqueda por lograr un cultivo primario de CMP *in vitro*. El desafío era *anclar* a las células en un estado permanente de pluripotencia. Los trabajos en embriones de ratón y conejo de la década del '60 y '70 se realizaban por medio de la disgregación del blastocisto y su cultivo posterior, por el cual obtenían células que en los días subsiguientes se diferenciaban en células correspondientes a diferentes tejidos. Estos experimentos sin embargo, no lograban mantener la pluripotencia en cultivo más allá de unos días, lo que demuestra la naturaleza evolutiva que presentan las células de este origen si no se fija su condición a un determinado tiempo temporal. En 1981 Martin Evans y su grupo descubren los métodos necesarios para *anclar* evolutivamente a las células de la masa interna del blastocisto en un estado de pluripotencia (Evans & Kaufman, 1981). Estos autores lograron obtener poblaciones de CMP al cultivar blastocistos disgregados, con un macizo celular interno sobre-crecido artificialmente, y en condiciones de cultivo que generaban un ambiente propicio para el crecimiento de estas células. Básicamente, estas condiciones propicias se correspondían al uso de fibroblastos embrionarios mitóticamente inactivos, los cuales producían las señales de indiferenciación adecuadas. Estos autores entonces encontraron que podían mantener en estado indiferenciado por largos períodos a las células aisladas del macizo celular interno. Además, estas células eran capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* a las tres capas germinales. Esta demostración de la capacidad de *frenar* el proceso espontáneo de diferenciación de las células pluripotentes y *anclarlas* en un estado de indiferenciación permanente abrió las puertas para que el mismo grupo, unos años más tarde, lograra modificar el genoma de las células indiferenciadas e insertarlas en una mórula y realizar una fertilización *in vitro*. El resultado fue el nacimiento de la técnica para generar animales *knock-out* (Kuehn, Bradley, Robertson, & Evans, 1987), con una rápida expansión en la décadas posteriores. Estos trabajos le valieron Martin Evans compartir el premio Nobel de Medicina en el año 2007.

Los trabajos para generar hallazgos similares en células humanas tuvieron que esperar hasta el año 1998 por dos razones. En primer lugar, existieron (y existen) conflictos éticos. La obtención de las células del macizo interno de un blastocisto es solo posible de realizar con la destrucción del embrión. Sin embargo, a mediados de la década de los '90 varios grupos en Estados Unidos comenzaron a utilizar blastocistos generados en clínicas de fertilización *in vitro* que eran descartados por diferentes motivos. Una segunda razón de la demora en generar CMP derivadas de humanos fue la diferencia en el procedimiento de cultivo entre las CMP de ratón y las humanas, la que se describirá en detalle más adelante. En 1998 Thomson y colaboradores publicaron la primera línea de células pluripotentes humanas, las cuales nuevamente eran capaces de recapitular la diferenciación a las tres capas germinales, tanto *in vitro* como *in vivo* (Thomson et al., 1998).

A principios de los año 2000 comenzaron a publicarse un número importante de estudios en los cuales se describían la obtención de células adultas *in vitro* a partir de las CMP humanas,

incluyendo neuronas o cardiomiocitos. Estas publicaciones daban crédito a la posibilidad de generar en un plato de cultivo células adultas capaces de reemplazar tejidos dañados en un ser humano adulto, por lo que comenzó una etapa de activa investigación en células madre con perspectivas de su uso en tratamientos de medicina regenerativa. Sin embargo, el dilema ético persistía, y era poco probable pensar en una medicina basada en la destrucción de blastocistos. Pero, en los años 2006 y 2007 el grupo de Shinya Yamanaka en Japón revolucionó el campo con la obtención de células madre pluripotentes a partir de fibroblastos adultos (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). La idea fue sencilla: en esos años ya eran conocidos muchos factores de transcripción relacionados con el estado de pluripotencia en ratones, a partir de los conocimientos generados con la utilización de las células madre embrionarias. Los autores entonces seleccionaron 24 de estos genes relacionados con la pluripotencia y los transfectaron todos juntos en fibroblastos embrionarios de ratón. Al cabo de un tiempo observaron la aparición de colonias de células morfológicamente diferentes a los fibroblastos, y similares a las células presentes en las colonias de CMP murinas. Los autores llamaron a estas células células madre pluripotentes inducidas (CMPi, también conocidas como iPS por la abreviación de *induced pluripotent stem cells* en inglés). En ensayos subsiguientes determinaron que la combinación de solo cuatro de estos factores de transcripción (*oct-4*, *sox-2*, *klf-4* y *c-myc*) eran suficientes para reprogramar una célula diferenciada en una indiferenciada. Las colonias de células indiferenciadas reproducían las características de las CMP embrionarias: expresaban los mismos marcadores de indiferenciación, presentaban un estado de metilación de los genes de pluripotencia similar a las CMP (es decir, un estado epigenético similar), se diferenciaban a las tres capas germinales in vitro, eran capaces de formar teratomas, y eran capaces de integrarse a un blastocisto en desarrollo y contribuir a la formación de los diferentes tejidos. Este último es conocido como ensayo de complementación diploide, y en él sólo una parte de las CMPi inyectadas forman parte del embrión al haberse mezclado con las presentes originalmente. Sin embargo, posteriormente se demostró la potencia de estas células al realizarse exitosamente ensayos de complementación tetraploide, en el que las dos primeras células hijas del huevo o cigoto son fusionadas, lo cual genera una célula tetraploide. Estas células continúan con la diferenciación y generan un blastocisto. Este blastocisto tetraploide es capaz de generar tejidos extra-embryonarios e implantarse, pero no puede generar células de la masa interna. Para la realización del ensayo entonces se inyectan las células pluripotentes exógenas en la masa interna, y luego el blastocisto es inyectado intraútero, lo que eventualmente genera un animal en el cual el cien por ciento de las células adultas son producto de las CMPi. El grupo de Yamanaka pudo trasladar estos hallazgos a humanos un año más tarde y describieron que con los mismos cuatro factores de transcripción era posible reprogramar células adultas humanas en CMPi similares a las embrionarias humanas. En 2011, S. Yamanaka compartió el premio Nobel en medicina por estos trabajos, hecho destacado por el corto tiempo pasado entre sus descubrimientos y la obtención del premio (Takahashi & Yamanaka, 2016).

La descripción de la reprogramación celular desencadenó un extraordinario interés por estas células al dejar de lado el conflicto ético de la fuente de obtención de células madre pluripotentes. Durante los últimos años se publicaron (y se continúan publicando) investigaciones acerca de las CMPi con diferentes intereses (Aasen et al., 2008; Hanna, Saha, & Jaenisch, 2010; Loh et al., 2010; Miyoshi et al., 2011; Somers et al., 2010; Sommer & Mostoslavsky, 2010, 2013; Stadtfeld & Hochedlinger, 2010; Takahashi & Yamanaka, 2016; Zhou & Melton, 2008). En primer lugar, la fuente originalmente descrita para la reprogramación fueron los fibroblastos embrionarios de ratón.

Sin embargo, se demostró posteriormente que era posible reprogramar cualquier tipo de célula adulta, incluyendo fibroblastos, queratinocitos de piel y folículo piloso, linfocitos o eritroblastos de sangre periférica, células madre mesenquimales o hematopoyéticas de la médula ósea, e inclusive células epiteliales descamadas de la vejiga. Por otra parte, también se publicaron múltiples estudios que buscaron mejorar la eficiencia de la reprogramación, la cual es habitualmente baja (entre 0.1 y 0.5 % de las células infectadas). Una parte importante de las investigaciones se centró en lograr generar CMPi por medio de otros mecanismos que no involucren la utilización de factores de transcripción oncogénicos como c-myc, o la utilización de métodos de reprogramación que no involucren la alteración del genoma de la células huésped y de esta forma generar CMPi aptas para ser potencialmente utilizadas en medicina regenerativa. Actualmente entonces es posible realizar una reprogramación celular utilizando métodos que involucran plásmidos episomales no integrativos que contienen los factores de transcripción necesarios para la reprogramación, o la utilización de vectores no integrativos adenovirales o derivados del virus Sendai, y hasta inclusive utilizar plásmidos que contienen microARNs que permiten inducir la pluripotencia (particularmente los de la familia mir-302) (Miyoshi et al., 2011). Finalmente, se describieron protocolos para lograr la diferenciación de las CMPi en células adultas. La lista de protocolos y metodologías de reprogramación es extensa, y la lista de células adultas posibles de obtener a partir de las CMPi abarca casi todas las poblaciones celulares adultas (Murry & Keller, 2008), incluyendo a cardiomiocitos (BurrIDGE et al., 2011; BurrIDGE, Keller, Gold, & Wu, 2012), neuronas de diferentes tipos (Chambers et al., 2009; Di Giorgio, Boulting, Bobrowicz, & Eggan, 2008), hepatocitos (Siller, Greenhough, Naumovska, & Sullivan, 2015), células β pancreáticas (Rezania et al., 2014), o células pigmentarias de la retina (Kamao et al., 2014). Todos estos tipos celulares, obtenidos en algunos casos de una gota de sangre periférica (Tan et al., 2014), son postulados como potenciales fuentes de unidades funcionales para reemplazar a las dañadas en un organismo. Así, la regeneración de un órgano dio un paso adelante con el descubrimiento de la reprogramación celular y las diferenciaciones específicas.

En los últimos años, el estado del conocimiento de las CMP humanas ha avanzado substancialmente. Inicialmente, no se comprendía claramente el por qué de las diferencias en las condiciones necesarias para el cultivo de las CMP humanas y las murinas, ya que las primeras requerían suplementar el medio de cultivo con el factor de crecimiento bFGF, pero en cambio las murinas requerían la utilización de LIF (Dahéron et al., 2004; Ginis et al., 2004; Wei et al., 2005). También se observaban diferencias morfológicas que eran fácilmente apreciables, ya que las colonias de CMP de ratón crecían mucho más densamente agrupadas y de manera tridimensional. Se postulaba entonces que las diferencias entre especies podía explicar estos hechos, pero en los últimos años la explicación fue aclarada a partir de la determinación de las diferencias en el estado de desarrollo embrionario entre las células de ambas especies. Se ha observado que las CMP humanas son ligeramente más evolucionadas desde el punto de vista embriológico, y que en realidad corresponden a células epiblasticas. Aún así, conservan la característica de ser pluripotentes. En recientes publicaciones se ha demostrado que es posible des-diferenciar aún más las CMP humanas y llevarlas a un estado de pluripotencia similar a las CMP murinas. Estas células son conocidas actualmente como CMP *naïve* o *ground state pluripotency* (De Los Angeles et al., 2015; Dodsworth, Flynn, & Cowley, 2015; Gafni et al., 2013; Huang, Maruyama, & Fan, 2014; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014).

Finalmente, hay que destacar que la reprogramación celular por medio de la transfección de

los factores de transcripción no es la única manera de obtener CMP a partir de células adultas somáticas (Yamanaka & Blau, 2010) (figura 2). Antes inclusive de obtener CMPi como fue descrito por S. Yamanaka, la primera fuente de células reprogramadas provino del trasplante nuclear, utilizando un núcleo de una célula embrionaria y transfiriéndolo a un oocito enucleado, tal como fue descrito en los años '90 con la clonación de la oveja Dolly y posteriormente con la clonación en ratones (Campbell, McWhir, Ritchie, & Wilmut, 1996; Wakayama, Perry, Zuccotti, Johnson, & Yanagimachi, 1998; Wilmut, 2007). Recientemente, el grupo de S. Mitalipov logró con éxito la transferencia nuclear en células humanas, y generar CMP a partir de este procedimiento (Kang et al., 2014; Ma et al., 2014; Tachibana et al., 2013). Sin entrar en detalles, existe la controversia acerca de cuál método puede generar CMP con menos problemas para ser utilizadas clínicamente, ya que por un lado las CMP logradas por transfección de factores de transcripción pueden presentar alteraciones genéticas (particularmente si se utilizan virus integrables en la reprogramación) (Ma et al., 2014), y por el otro se ha reportado que la transferencia nuclear puede desencadenar una respuesta inmunológica contra los antígenos presentes en la mitocondrias provenientes del oocito (*heteromitocondrias*) (Deuse et al., 2015). Además, en la transferencia nuclear es necesaria la utilización de un oocito, y esto conlleva dificultades técnicas relevantes. Por último, existe también la posibilidad de generar CMP por medio de la fusión de una célula somática con una embrionaria, esto genera una célula pluripotente, pero aberrante (Cowan, Atienza, Melton, & Eggan, 2005). Si bien estas dos últimas estrategias están descritas (transferencia nuclear y fusión celular), es infrecuente que las mismas sean utilizadas en los laboratorios que trabajan con CMP.

En resumen, las células madre pluripotentes presentan como característica principal la capacidad de diferenciarse en células adultas de las tres capas germinales. Los métodos para su obtención son variados, pero actualmente la reprogramación celular utilizando vectores de diferentes orígenes (lentivirus, retrovirus, plásmidos episomales, etc.) y diferentes componentes (factores de transcripción o microARNs) es la estrategia más utilizada y efectiva.

1.3. Células Madre Mesenquimales

La descripción de las células madres mesenquimales data de mediados de la década de los '90, aunque en los años sesenta comenzó a sospecharse de su existencia. En 1966 Friedenstein y colaboradores reportaron la existencia de una población celular presente en la médula ósea que no correspondía con las características de las células hematopoyéticas (Caplan, 1991; Friedenstein, Piatetzky-Shapiro, & Petrakova, 1966; Tavassoli & Crosby, 1968). Estos y otros autores describieron que cuando la médula ósea era implantada fuera de su nicho, la producción de células hematopoyéticas cesaba, y posteriormente aparecía tejido óseo. Estos trabajos iniciales hablaban de una población con características multipotentes, las cuales no se correspondían con la función hematopoyética de la médula ósea. Esta población fue descrita como similar a los fibroblastos. El concepto existente era el de una población de células heterogéneas no hematopoyéticas con la capacidad de diferenciarse en células de tejidos conectivos, ya sea cartílago, tejido óseo o tejido intersticial. Las definiciones y la caracterización era más bien difusa, hasta que en 1999, Pittenger y colaboradores describen una población celular presente en la médula ósea que dio origen a lo que actualmente conocemos por célula madre mesenquimal (CMM) (Pittenger et al., 1999). Los autores identificaron una población de células clonogénicas que se adherían al plato de cultivo y posteriormente se expandían rápidamente. Estas células no presentaban un fenotipo hema-

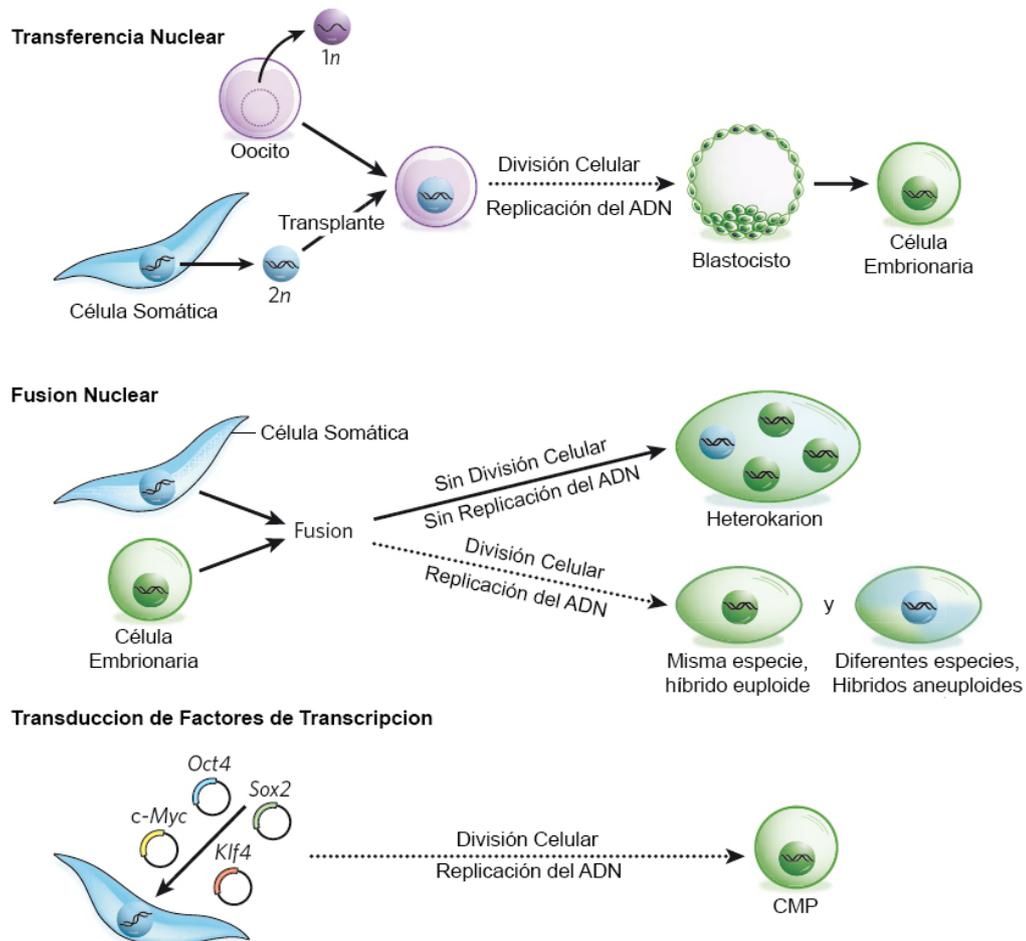


FIGURA 2: Métodos para la generación de células madre pluripotentes. A: Transferencia nuclear. En esta metodología se transplanta un núcleo de una células somática en un oocito enucleado. Así, la información epigenética del oocito reprograma al núcleo somático. B: Fusión celular: En este caso se fusionan dos células, una somática con otra pluripotente. Las células resultantes pueden se aberrantes y no funcionales o generar células pluripotentes si se reprograma el núcleo somático con la epigenética de la célula pluripotente. C: Reprogramación celular: En este caso una células somática es reprogramada a una célula pluripotente por medio de la tranfección de los factores de transcripción que regulan el estado de pluripotencia. Tomado de Yamanaka y Blau, 2010.

topoyético, a pesar de ser aisladas de la médula ósea. Al contrario, presentaban características mesenquimales y podían diferenciarse en condrocitos, adipocitos u osteoblastos.

La definición de una CMM fue relativamente estandarizada en el año 2006 (Dominici et al., 2006). Un documento de la *International Stem Cell Therapy Society* propuso una serie de criterios para definir una población celular como CMM. Estos criterios se basaban en tres aspectos. En primer lugar la adherencia al plástico en cultivo, lo cual no sucede con las células hematopoyéticas. En segundo lugar la presencia de marcadores de membrana característicos de esta población, incluyendo a CD90, CD73 y CD105, junto con la ausencia de marcadores de células hematopoyéticas, tales como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 y HLA-DR. Finalmente, una tercera característica fue considerada la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Si bien esta definición ha dado un marco de trabajo, la misma ha sido debatida. Por ejemplo, existe un número importante de marcadores de superficie que también se encuentran en las CMM y que no se encuentran contenidos en esta definición (Nombela-Arrieta, Ritz, & Silberstein, 2011). Sin embargo, es de destacar que ninguno de estos marcadores son exclusivos *per se* de esta población. Por lo tanto, la definición involucra la presencia de diferentes características que confluyen en un concepto amplio y poco definido, pero usualmente distintivo de otras fuentes y fenotipos celulares.

Si bien no se cuenta entre las características que definen a las CMM, la inmunomodulación llamó rápidamente la atención de los investigadores que trabajaban con estas células. Varios grupos de investigación observaron que las CMM respondían particularmente a la interacción con las células del sistema inmune, por cuanto la co-incubación de linfocitos con CMM hacía que los primeros suprimieran su respuesta inmunológica en una prueba de reacción linfocitaria mixta (Glennie, Soeiro, Dyson, Lam, & Dazzi, 2005; Potian, Aviv, Ponzio, Harrison, & Rameshwar, 2003). De hecho, se comprobó que éste era un fenómeno particularmente potente. Experimentos posteriores demostraron que las CMM tenían efectos inmunomoduladores sobre los linfocitos T, linfocitos B, las células NK y las células dendríticas (Aggarwal & Pittenger, 2005; Bernardo & Fibbe, 2013; Corcione et al., 2006; da Silva Meirelles, Chagastelles, & Nardi, 2006). Con estos resultados, en los últimos años se ha generado la hipótesis que las células madre mesenquimales presentan un rol de inmunomodulación del sistema inmune. No queda claro hasta donde éste es un efecto que sucede *in vivo*, o si es un fenómeno que sucede *in vitro*, y que puede ser forzado *in vivo* cuando las CMM son inyectadas en grandes cantidades. De cualquier manera, este hallazgo es utilizado actualmente como la base para la posible aplicación de las CMM en tratamientos de diversas enfermedades (Bernardo & Fibbe, 2013; Keating, 2012; Menard & Tarte, 2013).

Como se mencionó, las CMM originalmente fueron descritas como una población celular no hematopoyética de la médula ósea. Sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que células con características de CMM eran posibles de ser encontradas prácticamente en cualquier órgano del cuerpo (da Silva Meirelles et al., 2006). Es decir, es posible encontrar en los tejidos células que presentan adherencia al plato de cultivo, que expresan marcadores de superficie similares a las CMM (y no expresan los marcadores hematopoyéticos) y que se pueden diferenciar en adipocitos, osteoblastos y condroblastos. Además, estas células también puede inmunomodular de la misma manera. Con los años, la descripción de las CMM se convirtió así en un juego de encontrar las similitudes y las diferencias. La expresión de marcadores de superficie, las características inmunomodulatorias, y la expresión del perfil genético analizado por medio de secuenciación han

sido utilizados para tal caso (Niehage et al., 2011; Pevsner-Fischer, Levin, & Zipori, 2011; Yoo et al., 2009). Inclusive, recientemente se observaron diferencias en el perfil epigenético de diferentes CMM (de Almeida et al., 2016). Se ha observado de esta manera que existe un amplio perfil de células madre mesenquimales, y que quizá todas presenten características comunes, pero con diferencias dadas por las condiciones particulares del tejido donde se encuentran. Una hipótesis refiere que los pericitos presentes en los pequeños vasos sanguíneos de cada órgano corresponden a una reserva local de CMM, y que potencialmente pueden responder ante determinadas injurias localmente (Blugermann et al., 2013; Arnold I Caplan, 2008). Además, ha sido demostrado que las CMM migran preferencialmente hacia tejidos lesionados cuando son inyectadas de manera exógena, inclusive desde otros órganos, probablemente desde la médula ósea (Fox, Chamberlain, Ashton, & Middleton, 2007; François et al., 2006; Kidd et al., 2009).

Una manera frecuente entonces de dividir las CMM ha sido a partir del origen de las mismas. De esta manera, las CMM más caracterizadas en estos años han sido las originadas de la médula ósea, pero también lo han sido extensamente las CMM aisladas del tejido adiposo (CMM-TA) (Fraser, Zhu, Wulur, & Alfonso, 2008; Kern, Eichler, Stoeve, Klüter, & Bieback, 2006). Es más, los fibroblastos aislados primariamente del tejido subcutáneo pueden considerarse un tipo de población de CMM (Alt et al., 2012; Halfon, Abramov, Grinblat, & Ginis, 2011; Phinney, 2008). Todos estos tipos de CMM son comúnmente denominados CMM adultas, ya que habitualmente son aislados de tejidos terminalmente diferenciados. Otra fuente habitual de CMM, de particular interés para la medicina regenerativa, han sido las que se pueden aislar de los tejidos extra-embrionarios, ya sea del cordón umbilical o de la placenta (Klein & Fauza, 2011; Ryan, Pettit, Guillot, Chan, & Fisk, 2011; Seshareddy, Troyer, & Weiss, 2008; Valencic, Piscianz, Andolina, Ventura, & Tommasini, 2010; Weiss et al., 2008). Estas CMM son comúnmente conocidas como CMM fetales. Nuevamente, se han establecido diferencias entre los diversos orígenes de las CMM de estos tejidos fetales. Por ejemplo, las CMM de cordón umbilical (CMM-CU) han sido aisladas de la gelatina de Wharton así como también de los tejidos perivasculares del paquete vascular (Ennis, Sarugaser, Gomez, Baksh, & Davies, 2008; Keating, 2012). La real diferencia entre las mismas no está clara, si es que existe.

Las CMM son por lo tanto un grupo heterogéneo de células presentes en diferentes órganos, con características comunes en su expresión de marcadores y en funcionalidad. Más complejo aún, parecieran existir diferentes sub-tipos de CMM en cada órgano, lo cual se corresponde con la expresión de marcadores de superficie, y que a su vez son muchas veces utilizados para separar las poblaciones (Lian et al., 2007; Psaltis et al., 2010; Wu et al., 2013). En estos últimos años, el conocimiento acerca de las CMM se ha extendido marcadamente por el interés generado en su potencial utilización en tratamientos de terapias celulares. Primeramente se pensó que las células mesenquimales presentaban la capacidad única de trans-diferenciarse, es decir, de convertirse en una células extraña a su origen. Así, se creyó que las CMM derivadas de la médula ósea podían transformarse en cardiomiocitos o neuronas (Dimmeler, Zeiher, & Schneider, 2005; Grove, Bruscia, & Krause, 2004). El origen de este concepto equivocado provino del hecho que las CMM *in vitro* pueden expresar algunos marcadores correspondientes a los fenotipos cardíacos o neuronales, o de cualquier otro órgano al cual se fuerce en el plato de cultivo. Pero esta expresión de marcadores dista mucho de la concepción de transformar una célula en otra. Por lo tanto, actualmente se considera que las CMM no se transdiferencian (Keating, 2012). El interés clínico, sin embargo, continuó por varias otras razones. En primer lugar, las CMM demostraron producir una gran

cantidad de factores de crecimiento. Estos factores podrían producir un efecto paracrino una vez inyectadas en el lugar deseado durante el transcurso de un daño tisular o la cicatrización de un tejido (Chimenti et al., 2010; Reis et al., 2012). Por ejemplo, en el curso de un infarto de miocardio ha sido postulado que las CMM podrían tener un efecto beneficioso al secretar numerosos factores de crecimiento, entre ellos, muchos con capacidad de inducir angiogénesis (Cashman, Gouon-Evans, & Costa, 2013; Ishikane et al., 2010). En segundo lugar, las CMM presentan un efecto de inmunomodulación *in vivo*, por lo que se llevan adelante numerosos ensayos clínicos para determinar si producen algún beneficio en enfermedades en las cuales la activación del sistema inmune tiene un rol protagónico (Salem & Thiernemann, 2010; Sensebé, Krampera, Schrezenmeier, Bourin, & Giordano, 2010; Wang et al., 2012). Finalmente, las CMM también presentan un interés clínico por la potencialidad de ser utilizadas como la fuente celular en bioprótesis, tales como anillos traqueales producidos *ex vivo* para el tratamiento de la traqueomalacia (Macchiarini et al., 2008), o la fuente de derivados con propiedades biológicamente activas, tales como son los exosomas derivados de CMM (C. Lee et al., 2012; J.-K. Lee et al., 2013). Cabe destacar finalmente que a pesar de la gran mayoría de las potenciales aplicaciones de las CMM, todas éstas se encuentran en una etapa clínica experimental. Una excepción, sin embargo, es la utilización de las CMM para el tratamiento pediátrico de la enfermedad de injerto contra huésped refractaria como complicación de un trasplante de médula ósea (Kebriaei et al., 2009; Le Blanc et al., 2008). Los estudios clínicos con CMM han demostrado utilidad y en muchos países se ya aprobado su utilización.

1.4. La formación del mesodermo y la transición epitelio-mesenquimal en las células madre pluripotentes

Las células madre pluripotentes son, como hemos visto, homólogas a las células de la masa interna del blastocisto o del epiblasto, y se pueden mantener en cultivo en este estado indiferenciado por tiempo indefinido. Dadas las condiciones de cultivo necesarias, estas células pueden diferenciarse entonces en cualquier fenotipo celular adulto. Los conocimientos de la embriogénesis nos ayudan a comprender la diferenciación *in vitro* de las CMP y a lograr protocolos específicos para obtener células adultas definidas. Para comprender el desarrollo de este trabajo, se discutirán las bases de la diferenciación embrionaria hacia mesodermo y los tejidos mesenquimales.

1.4.1. La formación del mesodermo y la transición epitelio-mesenquimal en el desarrollo embrionario

La transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un fenómeno biológico extensamente caracterizado a lo largo de los últimos 30 años. En 1995 Elizabeth Hay describe la transformación de las células epiblasticas de la línea primitiva en células mesenquimales (Hay, 1995). En su trabajo, Hay detalla las transformaciones morfológicas necesarias en las células epiblasticas embrionarias para devenir en una célula mesenquimal en el transcurso de la gastrulación. En los años posteriores esta descripción se expandió con evidencias de un proceso complejo por el cual una célula epitelial, no migrante, no secretora de matriz extracelular, y con polarización ápico-basal de sus funciones celulares, se transforma en una célula mesenquimal, con capacidad de migración a distancia, productora de la matriz extracelular, y sin polarización ápico-basal. Esta descripción

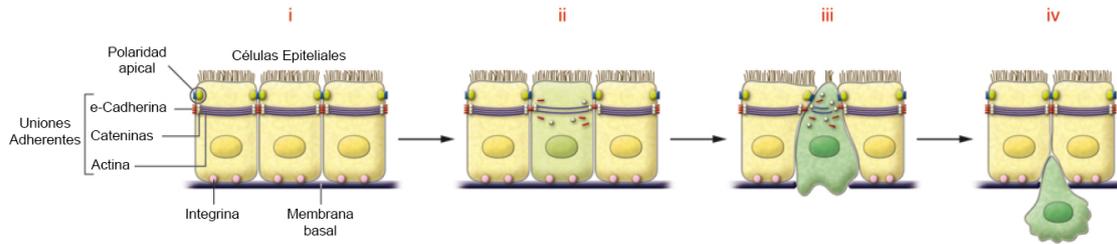


FIGURA 3: *Transición epitelio-mesenquimal.* Las células epiteliales presentan características distintivas, como son la presencia de uniones intercelulares y la polarización de sus estructuras celulares. Así, presentan proteínas características en sus membranas laterales que las unen firmemente, incluyendo a la e-cadherina y las connexinas. En su lado basal expresan integrinas que las unen a las proteínas de la matriz extracelular. La transición epitelio-mesenquimal involucra una pérdida de la polaridad y de la expresión de estos marcadores, con adquisición de la capacidad de migración. Así, la células mesenquimal desarrollada se despegan de las epiteliales y migra hacia la zona basal. Tomado de Acloque et al., 2009.

se expandió a otros contextos, particularmente importante en los tumores epiteliales, en donde existen fenómenos de TEM que facilitan la diseminación de las células tumorales y la formación de metástasis. Por lo tanto, la TEM involucra una serie de cambios celulares importantes con adquisición de funciones específicas, las cuales particularmente son necesarias en ciertos procesos fisiológicos, como el desarrollo y la reparación de tejidos, y forman parte de procesos patológicos, tales como la diseminación de los tumores.

La TEM comprende entonces una serie de eventos que terminan en un cambio radical en la morfología y función de la célula (Acloque, Adams, Fishwick, Bronner-Fraser, & Nieto, 2009; Kalluri & Weinberg, 2009; Lamouille, Subramanyam, Belloch, & Derynck, 2013; Lamouille, Xu, & Derynck, 2014) (figura 3). En primer lugar, existe una pérdida de las uniones intercelulares. Las células epiteliales presentan una serie de estructuras especializadas formadas por complejos proteicos presentes en su cara lateral, que les permiten mantenerse unidas. Existen varios tipos de uniones intercelulares, cada una con funciones específicas, tales como la adherencia o la comunicación intercelular. Una de las mejores caracterizadas en la TEM es la pérdida de la proteína de unión adherente e-cadherina (Wheelock, Shintani, Maeda, Fukumoto, & Johnson, 2008). Esta proteína de membrana interacciona fuertemente con la presente en la membrana celular de la célula adyacente. La pérdida de las uniones intercelulares se acompaña de un cambio morfológico, con pérdida de la llamada polaridad celular. Este fenómeno es observado en aquellas células epiteliales, las cuales presentan una cara hacia la luz y otra hacia la membrana basal. Además, la célula comienza a secretar enzimas que degradan la matriz extracelular presente en la membrana basal, y adquiere capacidad de migrar montando las estructuras intracelulares para tal efecto que le permite la elongación de una parte de su citoplasma y su posterior retracción. Todos estos cambios llevan a que la célula pueda desplazarse a distancia, lejos de su posición original.

La TEM es actualmente dividida en tres tipos, dependiendo del contexto biológico en el que ocurra (Acloque et al., 2009; Kalluri & Weinberg, 2009) (figura 4). La tipo 1 es la que sucede en el proceso de diferenciación embrionaria, y fue descrita originalmente. Este es un proceso crítico del desarrollo embrionológico. La tipo 2 sucede en circunstancias de daño tisular, en el cual un determinado tipo de célula epitelial sufre una TEM para lograr la reparación de un

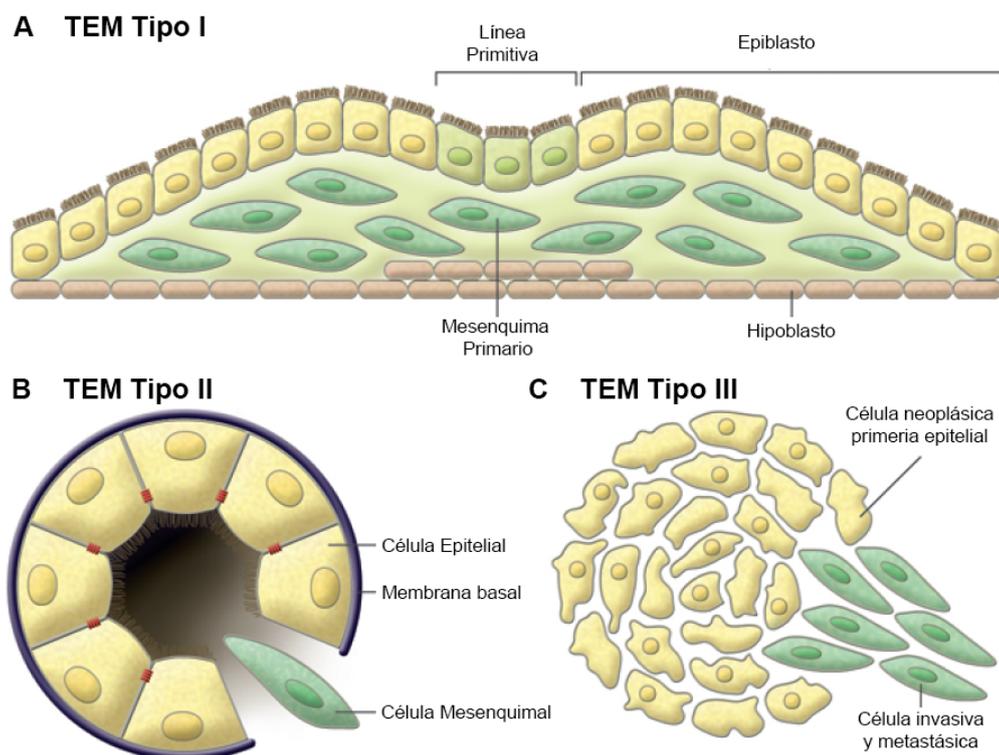


FIGURA 4: *Formas de transición epitelio-mesenquimal. A: la TEM tipo I describe a los fenómenos encontrados durante el desarrollo embrionario. B: La TEM tipo II describe a los fenómenos que se corresponden a la reparación normal de tejidos dañados. C: La TEM tipo III describe la transición patológica que sufren algunas células cancerosas. Tomado de Kalluri & Weinberg, 2009.*

tejido. A diferencia del tipo anterior, en estas circunstancias existe un desencadenante que es la inflamación local del tejido dañado. Finalmente, la tipo 3 se describe en células tumorales de un fenotipo epitelial, que transicionan a células tumorales con un fenotipo mesenquimal. Esta transformación genera una célula tumoral con capacidad de invasión y migración a distancia. Si bien en líneas generales estos mecanismos de TEM responden a señales y vías efectoras similares, existen características propias y únicas para cada tipo.

La TEM que nos interesa en este trabajo corresponde a la tipo I (Bondue et al., 2011; Thiery & Sleeman, 2006) (figura 5). Luego de la fertilización, el cigoto comienza una ronda de divisiones celulares hasta alcanzar una masa compacta de células llamada mórula, para posteriormente cavitar y transformarse en el blastocisto. Esta estructura contiene las células de la masa interna, homólogas a las CME. A medida que transcurre el desarrollo embrionario en estas etapas iniciales suceden dos procesos denominados transición epitelio-mesenquimal primaria por suceder sobre células que al momento nunca habían transicionado a un estadio mesenquimal. La primera de ellas sucede en el disco germinal bilaminado formado tempranamente a partir de la masa interna del blastocisto. Este disco contiene el epiblasto y el hipoblasto. En la línea media del epiblasto las células sufren la TEM y comienzan a migrar ventralmente hacia el espacio entre medio del epiblasto y el hipoblasto. Algunas de estas células iniciales se colocan en la parte más ventral para generar el endodermo embrionario (por eso también se las conoce como células mesoendodermales). Las células remanentes formarán el mesodermo primitivo para así finalmente conformar un nuevo disco trilaminar conteniendo el ectodermo, el mesodermo y el endodermo.

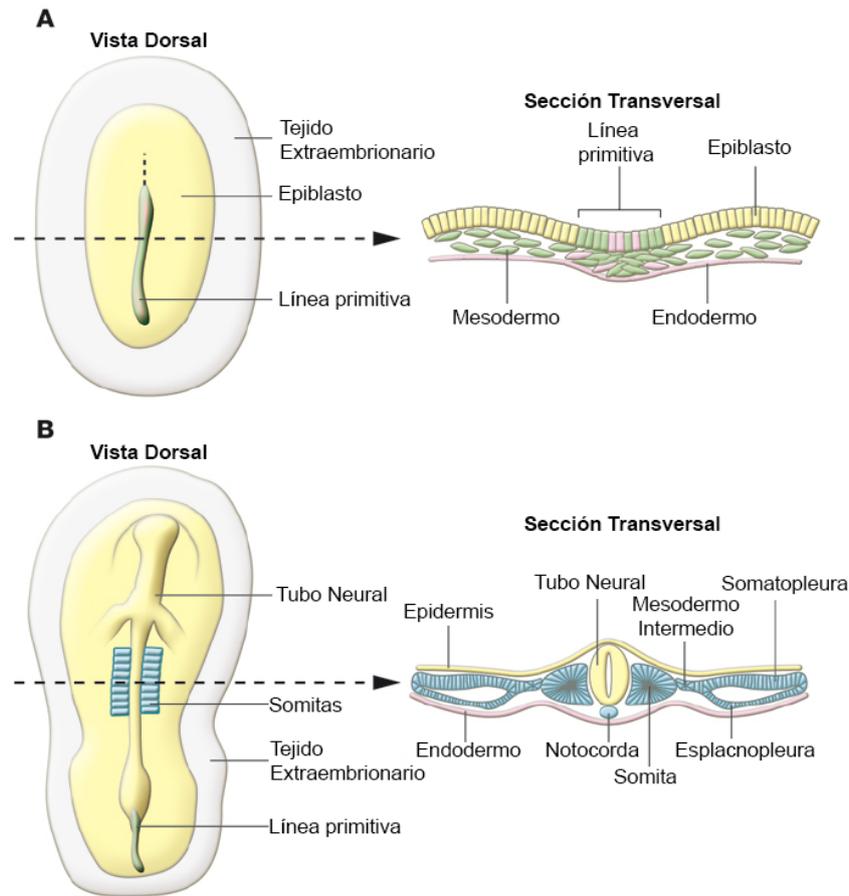


FIGURA 5: *Transición epitelio-mesénquimal en el desarrollo embrionario. A: En las primeras etapas del desarrollo embrionario el disco germinal forma la línea primitiva en su centro, desde las cuales las células epiblasticas se diferencian a células mesoendodermales mientras se invaginan y migran ventralmente (gastrulación). B: En un estadio posterior, las células mesoendodermales forman las estructuras primarias para la diferenciación a mesodermo y endodermo, incluyendo el mesodermo lateral e intermedio. El mesodermo parcial sufre un proceso de transición mesénquimo-epitelial y forma los somitas. Tomado de Achoque et al., 2009.*

Las células mesodérmicas primitivas evolucionan especificándose según su localización en un mesodermo paraxial, intermedio y lateral. Estas células mesodérmicas continuarán posteriormente diferenciándose en los progenitores específicos de cada tejido. Por lo tanto, existen unas células que tempranamente adoptan un fenotipo mesénquimal al diferenciarse en la línea media del epiblasto y migrar internamente y hacia los laterales.

La segunda TEM primaria ocurre también inicialmente durante la formación de la cresta neural en el proceso de formación del sistema nervioso. A partir del tubo neural, en la línea media-dorsal, las células epiteliales que forman la denominada cresta neural sufren la TEM y migran hacia diferentes lugares del embrión para posteriormente generar ganglios del sistema nervioso periférico y melanocitos, entre otras estructuras.

Estos procesos de TEM primarias ocurren en forma temprana en la formación del embrión. Sin embargo, el desarrollo de las estructuras finales embrionarias requiere que las células sufran procesos de TEM así como también su proceso inverso, es decir, la transición mesénquimo-epitelial (TME). De esta forma, existe un proceso por el cual las células epiblasticas evolucionan transicionando

entre estos dos estados hasta situarse temporal y espacialmente en el lugar indicado para generar una célula específica adulta. En algunos casos, como en el de las válvulas cardíacas, este proceso sucede en varias oportunidades antes de generar la célula adulta (Nakajima, Yamagishi, Hokari, & Nakamura, 2000). Por lo tanto, durante el desarrollo embrionario se reconocen diferentes procesos que llevan a cambios compatibles con TEM y TME, los cuales suceden de una manera tal que producen la especificación de los tejidos en desarrollo.

1.4.2. La diferenciación a mesodermo de las células madre pluripotentes

Los modelos históricos para el estudio del desarrollo embriológico dieron cuenta de los eventos iniciales y señales moleculares involucradas en la formación temprana del mesodermo. Estos conocimientos fueron aplicados a los desarrollos *in vitro* que sucedieron a partir de la descripción de las células madre pluripotentes. Estas células representan las etapas iniciales de los estadios del desarrollo embrionario correspondientes a la masa interna del blastocisto. Por su perfil de identidad molecular y funcional son de las primeras células existentes luego de la fecundación con capacidad de generar todos los tipos celulares adultos. Por lo tanto, representan un estadio en donde no han sufrido al momento ningún episodio de TEM. En consecuencia, las CMP representan un modelo único para el estudio de la diferenciación embrionaria, y la TEM en estas células es un paso necesario para generar células mesenquimales diferenciadas (Kim, Yi, Kim, & Choi, 2014; Kovacic, Rosner, Schipany, Ionce, & Hengstschläger, 2015; Nieto, 2013). La TEM entonces es parte necesaria de la aparición del mesodermo primario.

Inicialmente, una manera de estudiar la diferenciación *in vitro* de las CMP ha sido la generación de los llamados cuerpos embrioides (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Kehat et al., 2003). Estos consisten en la agregación de un cúmulo de CMP en forma tridimensional y cultivados en suspensión en un medio rico en señales de diferenciación, el cual consiste básicamente en suero fetal bovino (SFB) con sus factores de crecimiento. Estas señales, sumadas a las señales producidas por las mismas células en diferenciación, generan un microambiente que produce al cabo de algunos días la aparición de células de las tres capas germinales. Este sistema de alguna forma emula *in vitro* la formación de un teratoma *in vivo*. Por lo tanto, es posible con este sistema simple identificar células mesodérmicas en mayor o menor grado de diferenciación, e inclusive, prolongado el tiempo de diferenciación suficiente, es posible observar la aparición de derivados mesodérmicos tardíos, tales como zonas contráctiles espontáneas, las cuales representan progenitores cardíacos organizados y funcionales (Scassa et al., 2011).

Los modelos de diferenciación anteriormente descritos, sin embargo, son inespecíficos y generan células de las tres capas germinales. Por lo tanto, en los últimos años se aplicaron los conocimientos originados en modelos *in vivo* para lograr diferenciaciones celulares específicas de las CMP. Existen diferentes modelos de diferenciación *in vitro* a partir de CMP basados en la aplicación de factores de crecimiento por los cuales se pueden obtener células progenitoras adultas con un fenotipo definido, como por ejemplo cardiomiocitos (BurrIDGE et al., 2012). Pero para llegar a esta célula con características funcionales definidas las CMP deben transicionar por una serie de cambios que incluyen la TEM y la aparición de un progenitor mesodérmico temprano. Por lo tanto, si bien nos referimos a la TEM y a los progenitores mesodérmicos como entidades únicas, es posible que en un plato de cultivo se reproduzcan de manera ciertamente poco organizada la aparición de diferentes TEM, así como de diferentes progenitores con capacidad de generar mesodermo

(Era et al., 2008). Sin embargo, también ha sido descrita la metodología para el desarrollo de un progenitor mesodérmico único que es capaz de diferenciarse en todas las células adultas derivadas del mesodermo (Evseenko et al., 2010), o de progenitores mesodérmicos estables con restricciones en su capacidad de diferenciación (Kumar et al., 2015). Estos fenómenos son indudablemente más indefinidos en un plato de cultivo que en el desarrollo in vivo, pero los conocimientos desarrollados permiten la reproducción de muchas de las señales y estadios que conducen al desarrollo del mesodermo primitivo.

La transición epitelio-mesenchimal ha sido estudiada en el proceso de diferenciación de las CMP (Behr, Heneweer, Viebahn, Denker, & Thie, 2005; Eastham et al., 2007; Ullmann et al., 2007) (figura 6). Además, el fenómeno inverso de la transición mesenchimo-epitelial también ha merecido atención al demostrarse que es de vital importancia para la reprogramación celular (Gill et al., 2011; Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010). Las investigaciones realizadas demuestran que los cambios y señales característicos de la TEM observada en modelos de células neoplásicas o en modelos de desarrollo embrionario también suceden en la diferenciación de las CMP a mesodermo. Behr y colaboradores demostraron la existencia de cambios morfológicos celulares, la pérdida de uniones intercelulares, y la aparición de factores de transcripción específicos de mesodermo en colonias de CMP que iniciaban la diferenciación (Behr et al., 2005). Eastham y colaboradores describieron además la aparición de los factores de transcripción específicamente relacionados con la TEM, tales como SNAI y SLUG (Eastham et al., 2007). Además, demostraron la aparición de proteínas relacionadas típicamente con funciones mesenchimales, tales como las metaloproteinasas. Por lo tanto, estas y otras publicaciones demuestran que las CMP son capaces de reproducir los fenómenos de la TEM in vitro antes de diferenciarse en células mesodérmicas (Kovacic et al., 2015).

1.4.3. Señales moleculares involucradas en la formación del mesodermo

El desarrollo embrionario del mesodermo primitivo ha sido extensamente estudiado en modelos animales, y muchos de estos hallazgos han sido confirmados en el proceso de diferenciación de CMPs. Este proceso involucra múltiples señales paracrinas, transducidas por una compleja maquinaria interna de segundos mensajeros y factores de transcripción. Esta señalización ocurre a partir de las diferentes estructuras del embrión en desarrollo, siendo el endodermo visceral particularmente importante en las etapas iniciales al secretar las señales de diferenciación, e inducen la formación de la línea primitiva. Entre las señales críticas para este proceso se encuentran Wnt3, Nodal, Activina-A y BMP4 (Brand, 2003; Tam & Loebel, 2007). Los modelos animales *knock-out* de estas tres señales resultan en la ausencia de formación de mesodermo.

Los hallazgos en la señalización para la formación de mesodermo pueden ser replicados en la diferenciación de las CMP (Evseenko et al., 2010; Kattman et al., 2011; Mahmood, Harkness, Schröder, Abdallah, & Kassem, 2010; Tran et al., 2009). Múltiples trabajos reportan similitudes entre el desarrollo embrionario y la diferenciación de las CMP en las señales responsables de la formación de mesodermo. Sin embargo, los procedimientos de diferenciación de las CMP se encuentran limitados por la obvia ausencia de una organización tridimensional propia del desarrollo. Sin embargo, ésta pérdida no impide la diferenciación de las células, y de tal manera que las CMP pueden generar células derivadas de las tres capas germinales. A pesar de no perder esta capacidad, la diferenciación de las CMP acontece en un ambiente en donde no

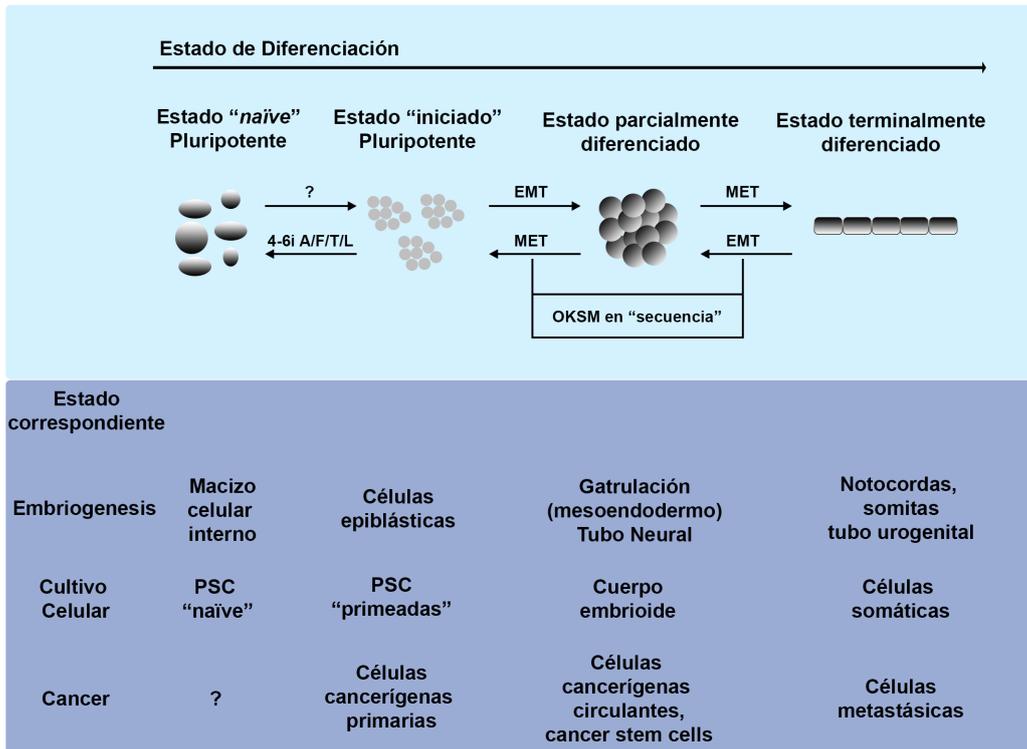


FIGURA 6: Descripción de los fenómenos de transición epitelio-mesenquimal y mesenquimo-epitelial en los diferentes contextos celulares. De izquierda a derecha se observa un gradiente evolutivo de diferenciación. En el extremo izquierdo se encuentran las células madre pluripotentes en su estado más indiferenciado (naïve o ground state). Ligeramente más indiferenciadas, las CMP son habitualmente las cultivadas en los laboratorios. Si se induce la diferenciación de las mismas se transita una transición epitelio-mesenquimal y se generan las estructuras mesoendodérmicas, hasta alcanzar un estado totalmente diferenciado. Se ha demostrado que este camino evolutivo puede ser revertido totalmente por la reprogramación celular (que requiere una transición mesenquimo-epitelial) y la inducción de un estado naïve de las CMP por medios químicos. Actualmente también se considera que las células cancerígenas pueden transitar caminos similares. Adaptado de Kovacic et al., 2015.

existe la tridimensionalidad dada de un embrión en desarrollo, ni los patrones de gradientes de señalización intercelular típico de los morfógenos embrionarios. En parte, esto se suple realizando la diferenciación en pequeñas esferas tridimensionales en suspensión, en las cuales las señales de una células en diferenciación inducen a otras células vecinas influyendo entonces en la diferenciación de las mismas. Se podría decir que la diferenciación de las CMP ocurre de una manera relativamente caótica en este modelo tridimensional, en la cual las señales provenientes del medio se suman a las provenientes de sus pares celulares en una estructura no específica. Así, no es de sorprender que este modelo genere células variadas, sin un patrón definido, y con un resultado algo impredecible. El desafío ha sido en estos años desde su descubrimiento, dominar la diferenciación para lograr células adultas específicas.

La manera de circunvalar este inconveniente ha sido el desarrollo de protocolos de diferenciación específicos. En este caso, las células madre pluripotentes suelen ser expuestas de manera secuencial y homogénea a señales de diferenciación definidas (Murry & Keller, 2008). Para ello, se utilizan períodos de exposición definidos a factores de crecimiento que inducen la aparición de células diferenciadas. A medida que avanza la diferenciación, las células adquieren un fenotipo cada vez más diferenciado. Existen varios ejemplos de derivados mesodérmicos generados con estos protocolos de diferenciación específicos, incluyendo la generación específica de cardiomiocitos (Burridge et al., 2012) , células hematopoyéticas (Kennedy, D'Souza, Lynch-Kattman, Schwantz, & Keller, 2007), o células endoteliales (Yang et al., 2008), entre muchos otros. En todos los casos, los protocolos específicos utilizan una señalización inicial a un progenitor mesoendodérmico, para posteriormente realizar un *patterning* específico por medio de factores de crecimiento.

1.5. Diferenciación de células madre pluripotentes en células madre mesenquimales

Como hemos visto, la propiedad fundamental de las células madre pluripotentes es su capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular. No es de extrañar entonces que estas células sean capaces de generar *in vitro* células con un fenotipo similar a las células madre mesenquimales. En etapas muy tempranas de la embriogénesis las células epiblasticas evolucionan hacia una TEM primaria para la formación del mesodermo (Evseenko et al., 2010). Este evento es reproducible *in vitro*, y a partir de allí es posible generar todos los progenitores derivados de esta capa germinal, incluyendo a células que presentan características similares a las CMM.

La caracterización de las células madre mesenquimales derivadas de células madre pluripotentes (CMM-DP) se ha realizado en forma análoga a la realizada habitualmente en las CMM fetales y adultas. Es decir, la expresión de marcadores de membrana, la capacidad de diferenciarse a condroblastos, adipocitos y osteoblastos, y la capacidad de inmunomodulación han dado identidad a las CMM-DP. Sumado a esto, en esta población celular es posible caracterizar el proceso de TEM a través del análisis fenotípico de características epiteliales que dan paso a la aparición de características mesenquimales. Sin embargo, no es claro cual es el grado de similitud entre las CMM-DP y las derivadas de tejidos adultos (de Peppo et al., 2010). Las células madre mesenquimales presentes en tejidos fetales y adultos presentan similitudes y diferencias entre sí dependiendo de su origen (Al-Nbaheen et al., 2013; Strioga, Viswanathan, Darinskas, Slaby, & Michalek, 2012). Lo mismo es de esperar que suceda con las CMM-DP, pero esta caracterización esta mucho menos estudiada. Además, existen muchos protocolos para la derivación de CMM-DP,

y es posible entonces que las células obtenidas con cada uno de ellos también presenten algunas diferencias.

Luego de la descripción del método para cultivar CMP humanas en 1998 comenzaron a publicarse trabajos de investigación en donde se describían diferentes maneras de cultivar las CMP. Originalmente, en la primera publicación, las CME fueron co-cultivadas con fibroblastos embrionarios de ratón mitóticamente inactivados. Los fibroblastos inactivados generaban señales de pluripotencia a través de la secreción de factores de crecimiento, pero también a través de señales provenientes de la matriz extracelular que secretaban. A fin de evitar la utilización de los fibroblastos, Xu y colaboradores publicaron su experiencia con el cultivo en platos cubiertos con matrices extracelulares alternativas (Xu et al., 2001). Los autores estudiaron el efecto de crecer las CME sobre Matrigel (una matriz extracelular comercial derivada de tejido de sarcoma de rata descellularizado), laminina, fibronectina o colágeno y observaron que particularmente los dos primeros eran óptimos para el cultivo de CME. Pero los autores describieron en sus experimentos que era frecuente observar cómo células localizadas en la periferia de colonias de CME pluripotentes se diferenciaban espontáneamente, y entonces se observaba la aparición de células con un incremento de su citoplasma y ahusamiento de su morfología en comparación con las células pluripotentes lindantes. Si bien estos autores no caracterizaron esta población de células en este trabajo, es posible que esta sea la primera descripción de la existencia de células con un fenotipo mesenquimal que se diferenciaban a partir de CMP. Unos años después los mismos autores publicaron la posibilidad de sostener el cultivo de CMP sobre un co-cultivo de unas células similares, aunque obtenidas de manera diferente e inmortalizadas (Chunhui Xu et al., 2004). Los autores cultivaron las CMP en forma tridimensional por cuatro días en suero fetal bovino, en unas esferas en suspensión llamados cuerpos embrioides; posteriormente adherían las mismas y las cultivaban por 9 días más. En ese momento pasaban las células en estado unicelular hasta obtener un cultivo homogéneo de células con morfología de fibroblastos, y finalmente las inmortalizaban por medio de la infección con un virus conteniendo el gen hTERT. Los autores realizaron una caracterización de las células obtenidas y demostraron la presencia de marcadores de membrana usualmente presentes en CMM, incluyendo a CD29, CD44, CD71, y CD90, en niveles similares a los de CMM adultas. Estas células no expresaban los marcadores CD45 ni CD14. Además, presentaban capacidad de diferenciación osteogénica, aunque no de diferenciarse en adipocitos ni en condroblastos. De esta manera, los autores pudieron identificar la aparición de células con un fenotipo mesenquimal diferenciadas a partir de las CMP.

Poco tiempo después Barberi y colaboradores describieron más en detalle la aparición de una población mesenquimal a partir de las CMP (Barberi, Willis, Soggi, & Studer, 2005) . Estos autores desarrollaron un modelo de diferenciación a base de co-cultivo con una línea celular llamada OP9. Esta línea celular fue derivada del cráneo de un embrión de ratón, y posee un fenotipo mesenquimal (Gao et al., 2010). Luego de un co-cultivo extenso de 40 días, realizaron una separación por citometría de flujo para células positivas a CD73, un marcador de células mesenquimales. Posteriormente realizaron una extensa caracterización de las células, las cuales eran positivas para marcadores de estirpe mesenquimal (CD29, CD44, CD105, CD106, CD166, Stro-1, Vimentina y I-CAM). Además, encontraron que las células podían diferenciarse a adipocitos, condroblastos y osteoblastos. Por último, realizaron además una caracterización de la expresión genética por medio de un microarreglo y lo compararon con células madre mesenquimales de médula ósea (CMM-MO). Los autores encontraron una gran similitud entre los genes expresados

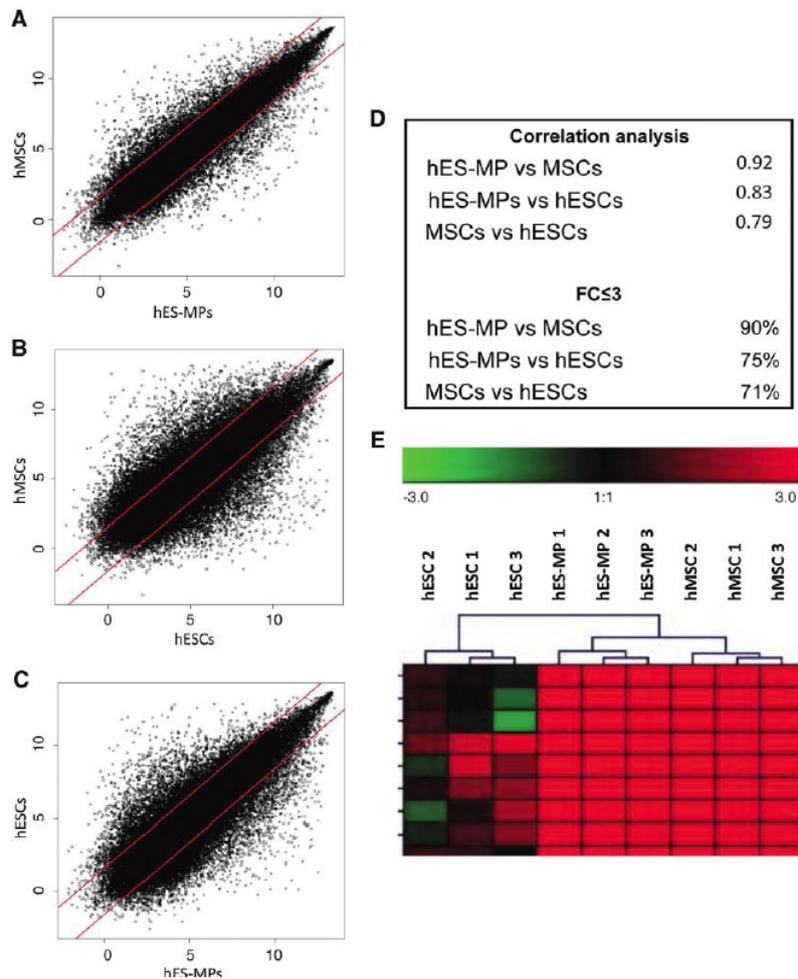


FIGURA 7: Correlación de la expresión génica entre las células madre pluripotentes y las células madre mesenquimales. Los paneles A, B y C demuestran gráficamente la correlación de la expresión de genes entre las CMP (hESCs), las CMM-DP (hES-MPs) y las CMM-MO (MSCs). El grado de correlación entre las CMM-DP y las CMM-MO es mucho mayor que entre estas mismas con las CMP, sugiriendo entonces que las CMM-DP presentan un fenotipo mesenquimal. Tomado de de Peppo et al., 2010.

en CMM-DP y las CMM-MO adultas. Además, un gran número de genes expresados por ambos tipos celulares se encontraban directamente relacionados a un fenotipo mesenquimal. En otra publicación realizada por de Peppo y colaboradores (de Peppo et al., 2010), la correlación de la expresión de genes entre las poblaciones de CMM-MO y CMM-DP fue significativamente mayor que la de las CME con cualquiera de las CMM (figura 7). Estos trabajos iniciales demostraban entonces que bajo ciertas condiciones, no muy exigentes, las CMP perdían las características de la pluripotencia y adquirían un fenotipo mesenquimal.

Un año más tarde una nueva técnica de generar las CMM-DP fue publicada, a la que los autores llamaron *raclure*, palabra que en francés se traduce como raspado" (Olivier, Rybicki, & Bouhassira, 2006). Básicamente, este método consistía en obtener las células diferenciadas a partir de un cultivo de células madre pluripotentes por medio de la sección mecánica de las células con un fenotipo mesenquimal. Los autores reportan que estas células presentaban características epiteliales en un principio, aunque esta aseveración no parece sustentada por ninguna evidencia.

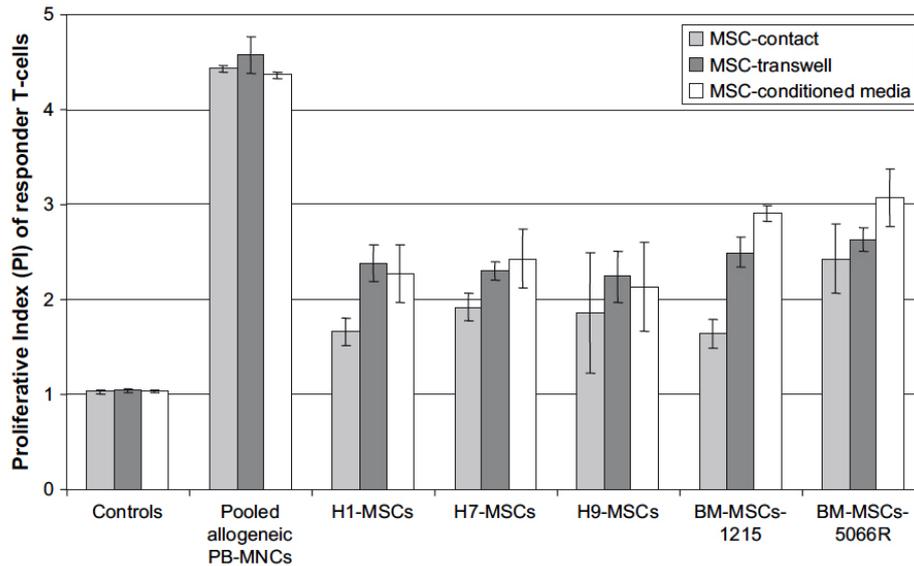


FIGURA 8: Capacidad de inmunomodulación de las CMM-DP. Los autores realizaron un ensayo de proliferación de linfocitos estimulados y fueron expuestos de diferentes maneras a las CMM-DP (contacto directo, separado por una membrana (transwell), o utilizando su medio condicionado). Como se observa, las CMM-DP derivadas de CMEh (H1, H7 y H9-MSCs) y las CMM-MO (BM-MSCs) generaron una disminución marcada y equivalente de la proliferación de linfocitos en cualquiera de las diferentes formas de exposición. Tomado de Trivedi & Hematti, 2008.

Posteriormente, las células se diferenciaban y adquirían características de CMM-DP, basado en los receptores de superficie y de la capacidad de diferenciación multipotente. Un par de años más tarde, una forma ligeramente diferente de lograr CMM-DP fue publicada por Trivedi y colaboradores (Trivedi & Hematti, 2008). Estos autores básicamente extendían la frecuencia del cambio de medio de cultivo a las CMP. Esto producía seguramente un agotamiento de los factores que mantienen en estado indiferenciado a estas células, y con los días aparecían células que eran posteriormente disecadas en forma manual y pasadas para su cultivo independiente de las CMP. Las células con el correr de los días se transformaban así en CMM-DP. Además, los autores demostraron por primera vez que estas células eran potentes inmunomoduladoras *in vitro*, tal como es ampliamente observado con CMM de otros orígenes (figura 8).

La descripción de estos procedimientos para la diferenciación de CMP en CMM llevó a que se desarrollen protocolos específicos y definidos para este procedimiento. En el campo de la investigación en CMP es habitual que los investigadores lleven adelante estudios en donde a partir del conocimiento de las señales involucradas en el desarrollo embrionario de los tejidos adultos se generen protocolos en donde se reproduzcan las condiciones embrionarias por medio de la incorporación de factores de crecimiento específicos o de inhibidores de la transducción de señales intracelulares. Además, el interés por la utilización de protocolos de diferenciación específicos también radica en la posibilidad de la no utilización de derivados de origen animal (por ejemplo, suero fetal bovino), y de componentes definidos en concentraciones definidas, condición muchas veces necesaria en procesos industriales. Es así que comenzaron a publicarse protocolos de diferenciación de CMP a CMM-DP que contienen factores de crecimiento tales como BMP4 o Activina-A, componentes activos y tempranos de la diferenciación a mesodermo. Uno de estos pri-

meros protocolos fue publicado por Kimbrel y colaboradores (Kimbrel et al., 2014). Estos autores utilizaron un procedimiento complejo que involucra primero el cultivo tridimensional (en forma de cuerpos embrioides) y posteriormente el pasaje a dos dimensiones, y el cultivo con un medio definido conteniendo los factores de crecimiento bFGF, VEGF, BMP4, y trombopoyetina suspendidos en un medio comercial sin componentes animales (Stemline II, Sigma). En otra publicación, Wu y colaboradores usaron un inhibidor de la quinasa Rho (conocido como inhibidor de ROCK Y-27632), los suplementos N2 y B27 (utilizados habitualmente para diferenciaciones neuronales), y bFGF (Wu et al., 2013). De manera más sofisticada y compleja, este protocolo demuestra que es posible la diferenciación de las CMP a CMM-DP utilizando un medio definido.

Las publicaciones existentes acerca de la diferenciación de las CMP en CMM-DP es amplia y puede ser consultada en el apéndice. Una revisión rápida de la lista de publicaciones evidencia que existen dos grandes períodos en la investigación de las CMM-DP. La primera comprende los artículos descritos anteriormente, en los cuales se describen diversas metodologías para la diferenciación de CMP en CMM-DP. En la segunda, correspondiente a los últimos años, se describen diferentes aplicaciones pre-clínicas de las CMM-DP. Estas aplicaciones se relacionan a diferentes modelos fisiopatológicos en animales, y emulan a la literatura desarrollada con células madre mesenquimales de otros orígenes. Los estudios describen en general efectos ampliamente positivos, y en algunos casos incluso con mayor eficacia que células madre mesenquimales de otros orígenes. Al momento, sin embargo, no se han reportado estudios clínicos con la utilización de las CMM-DP.

1.6. Uso de lisado de plaquetas como suplemento del medio de cultivo celular

La utilización de suplementos para el cultivo de células es de fundamental importancia en biología celular. Tradicionalmente, el suero fetal bovino (SFB) es la elección para el crecimiento de la mayoría de los cultivos celulares, incluso de aquellos derivados de cultivos celulares primarios humanos. El SFB provee factores de crecimiento y nutrientes necesarios para el crecimiento de las células. Sin embargo, este suplemento es de origen animal, y este hecho genera controversias al momento de su utilización en cultivos celulares que puedan posteriormente ser inyectados en seres humanos (Bieback, Kinzschbach, & Karagianni, 2011; Bieback, 2013). En primer lugar, el SFB puede ser transmisor de patógenos infecciosos, incluyendo en teoría la transferencia de priones generadores de la leucoencefalopatía espongiiforme. Además, se ha observado que las células humanas cultivadas en SFB pueden generar reacciones inmunológicas en el ser humano a partir de la modificación de las proteínas de la membrana celular. Por lo tanto, existe interés científico y comercial en el desarrollo de nuevos productos que suplanten el uso de SFB. Una manera habitual de hacerlo ha sido con la utilización de medios suplementados con compuestos definidos, como por ejemplo el ITS (insulina-trasferrina-selenio), pero estos tres elementos pueden ser insuficientes para proveer de señales de diferenciación a las CMP. Es más, se ha publicado que la insulina previene el desarrollo del mesodermo temprano en la diferenciación de CMP (Freund et al., 2008). Alternativamente, la utilización de sueros humanos puede plantearse, pero esto presenta obstáculos obvios para su uso masivo.

El interés entonces por el lisado de plaquetas (LP) para el cultivo de células proviene desde tiempo atrás. A principios de la década del '80 los efectos de este suplemento fueron analizados en

diferentes condiciones (Choi, Morris, & Sokoloff, 1980; Eastment & Sirbasku, 1980; Hara, Steiner, & Baldini, 1980). El lisado de plaquetas se obtiene de la homogenización de la ruptura de las plaquetas en proceso de descarte por vencimiento. No fue hasta el año 2005 que se publicó la utilización del LP en el cultivo de CMM. Doucet y colaboradores demostraron que la utilización de LP era una excelente alternativa al SFB (Doucet et al., 2005). Los autores encontraron que el LP puede mantener las condiciones de cultivo para las CMM, así como también preservar las capacidad de diferenciarse (multipotencia) y de inmunomodulación. Además, encontraron que las células crecían más rápido en un medio suplementado con LP que suplementado con SFB. Este trabajo inició una larga serie de publicaciones que demostró las propiedades positivas del cultivo de las CMM en medio de cultivo suplementado con LP (Ben Azouna et al., 2012; Bieback, 2013; Capelli et al., 2007; Copland, Garcia, Waller, Roback, & Galipeau, 2013; Flemming et al., 2011; Iudicone et al., 2014; Lohmann et al., 2012; Lucchini et al., 2010; Mojica-Henshaw et al., 2013; Rauch et al., 2011; Schallmoser et al., 2007). Actualmente, medios suplementados con LP ya han sido utilizados para crecer CMM que posteriormente fueron inyectadas en seres humanos en el marco de ensayos clínicos. Estos estudios no observaron efectos adversos importantes y por ende demostraron que las CMM crecidas en este suplemento eran seguras para su uso en estas condiciones (Bieback, Schallmoser, Klüter, & Strunk, 2008; Burnouf, Strunk, Koh, & Schallmoser, 2016; Capelli et al., 2007; Hanley et al., 2013; Mendicino, Bailey, Wonnacott, Puri, & Bauer, 2014; Sensebé et al., 2010; S. Wang, Qu, & Zhao, 2012).

Los beneficios probados con la utilización del LP como suplemento en el medio de cultivo están dados por la cantidad enorme de factores de crecimiento generados por la ruptura y liberación de gránulos de las plaquetas. Múltiples estudios han analizado los componentes del LP, y si bien este análisis es parcial, las comparaciones demuestran que las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento son mucho mayores que el suero fetal bovino y del suero humano (Copland et al., 2013; Doucet et al., 2005; Lohmann et al., 2012; Schallmoser et al., 2007; Trojahn Kølle et al., 2013). Como se ve en la figura 9, estas diferencias están en el orden de las decenas de veces. Este hecho tiene consecuencias directas en el crecimiento de las células, y ha sido reportado, por ejemplo, una mayor tasa de división celular que cuando se utiliza el SFB (figura 9), o efectos directos en la expresión y secreción de factores de crecimiento por parte de las células en cultivo (figura 10).

Como se mencionó anteriormente, las plaquetas contienen gránulos ricos en compuestos bioactivos. Estos gránulos son secretados luego de la activación plaquetaria. Se ha propuesto entonces la utilización de un medio de cultivo suplementado con el producto de la liberación de gránulos por parte de plaquetas activadas (Gruber et al., 2004; Kilian et al., 2004). Sin embargo, esta manera de producir un suplemento rico en las sustancias bioactivas contenidas en las plaquetas es menos utilizada que el lisado de plaquetas. En el lisado de plaquetas, la liberación de los compuestos bioactivos se debe a la destrucción total de las plaquetas, y por lo tanto, a la liberación de todos los contenidos internos de las mismas. Además, la destrucción de las plaquetas se logra por medio de un proceso simple, el cual consiste en sucesivos ciclos de congelado/descongelado de las bolsas conteniendo plaquetas (Burnouf et al., 2016; Schallmoser & Strunk, 2013). Las plaquetas liberan entonces su contenido, y posteriormente se centrifuga para reducir los restos celulares y de fibrina generados por la destrucción de las plaquetas. Este proceso logra la destrucción de la mayoría de las plaquetas, particularmente si se reitera en varias oportunidades.

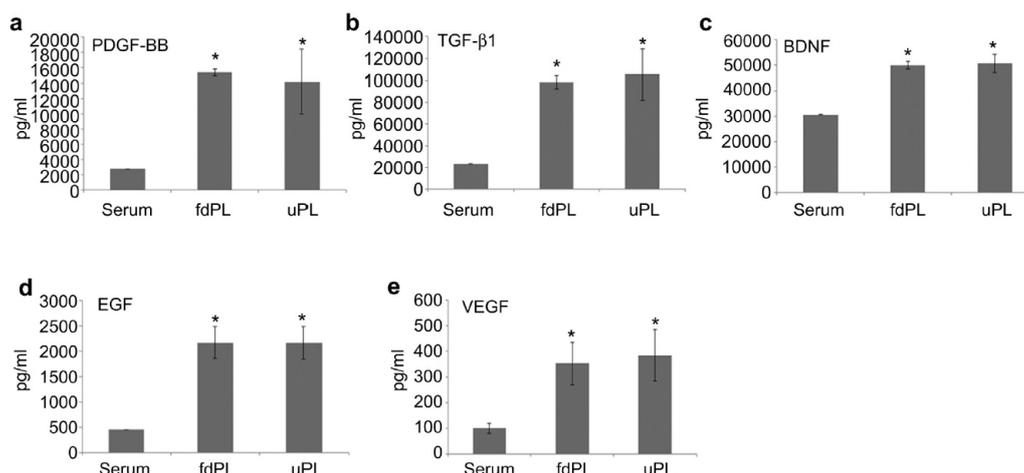


FIGURA 9: Concentración de diferentes factores de crecimiento presentes en el lisado de plaquetas. Se comparan las concentraciones de varios factores de crecimiento presentes en suero fetal bovino (serum), en lisado de plaquetas defibrinogeneizado (fdPL), y en lisado de plaquetas (uPL). Como se observa, la concentración de los factores de crecimiento es mucho mayor en los listados de plaquetas que en el suero fetal bovino, sin presentar diferencias en las dos maneras de preparación del lisado de plaquetas. Tomado de Copland et al., 2013.

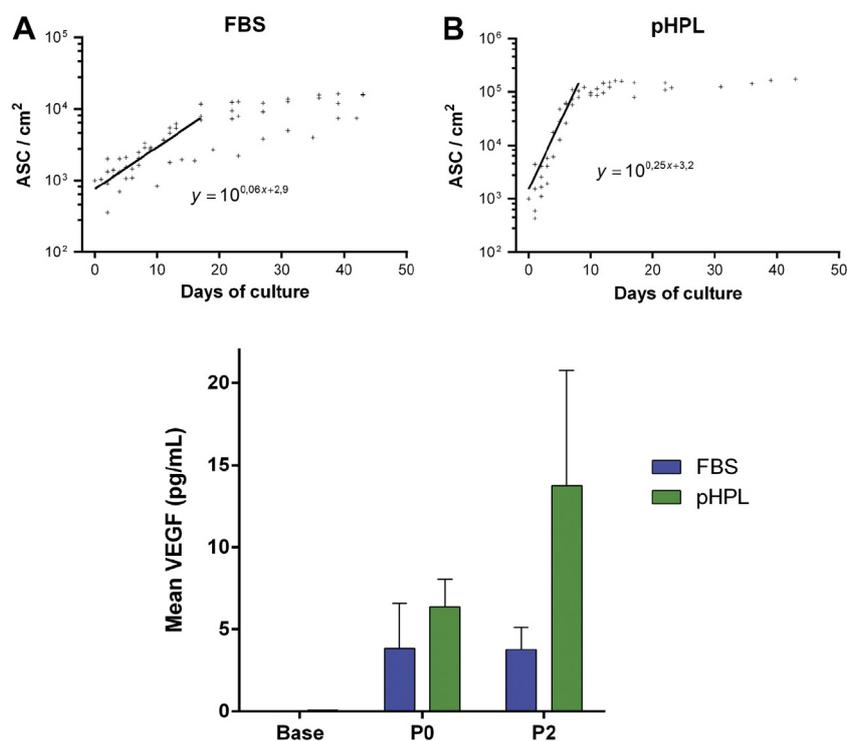


FIGURA 10: Efectos del lisado de plaquetas sobre las células en cultivo. En los paneles superiores (A y B) se observan la curva de crecimiento celular en CMM derivadas de tejido adiposo. Las células cultivadas en lisado de plaquetas (B) presentan una velocidad de crecimiento marcadamente mayor. En el panel inferior se observan los efectos del suero fetal bovino y del lisado de plaquetas sobre las mismas células con respecto a la secreción de VEGF al medio de cultivo. Como se puede observar, luego de dos pasajes las células cultivadas en lisado de plaquetas secretan una cantidad significativamente mayor de este factor de crecimiento. Tomado de Trojahn Kølle et al., 2013.

Los efectos del lisado de plaquetas sobre las células del cultivo han sido estudiados en múltiples investigaciones. Por ejemplo, Trojan-Kolle y colaboradores analizaron los efectos del LP sobre el crecimiento celular y la angiogenesis (Trojahn Kølle et al., 2013). Como se observa en la figura 10, las CMM cultivadas con LP presentaron una curva de crecimiento mucho mayor que las células cultivadas en suero fetal bovino. Además, los autores analizaron la secreción de VEGF por parte de las células expuestas a los dos suplementos. Luego de dos pasajes, se puede observar un efecto estimulante mucho mayor del LP sobre la secreción de VEGF.

El lisado de plaquetas puede ser utilizado de diferentes maneras. El que más nos interesa en esta discusión es si utilizarlo como suplemento de medio de cultivo, pero también existen publicaciones en donde el lisado es utilizado para producir una malla extracelular de fibrina para realizar cultivos celulares tridimensionales (Walenda et al., 2012). Con respecto a la utilización como suplemento de cultivo, se ha reportado la utilización del mismo entre un 5 a 10 %. Además, se han descrito alternativas en la producción, tal como la des-fibrinogenización del mismo por medio del agregado de la fibrina en suspensión (Copland et al., 2013).

Finalmente, cabe mencionar la potencial biocompatibilidad del lisado de plaquetas para ser utilizado en tratamientos celulares. Como se mencionó anteriormente, existen ensayos clínicos realizados con células madre mesenquimales utilizando como suplemento de cultivo al lisado de plaquetas, en sustitución del suero fetal bovino (Kuzmina et al., 2012; Lucchini et al., 2010; Perico et al., 2011). En ninguno de estos ensayos se han reportados efectos adversos atribuibles al suplemento de lisado de plaquetas. En el futuro es posible que las alternativas para el cultivo de células *ex vivo* que posteriormente sean inyectadas en seres humanos sean medios definidos (es decir, con compuestos totalmente sintetizados y sin derivados de origen animal) o medios suplementados con lisado de plaquetas. Este último presenta la ventaja de ser mucho menos costoso que la utilización de compuestos sintetizados y definidos.

2. Hipótesis y Objetivos

Las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse a células madre mesenquimales. En estudios previos se ha reportado que existen diversas maneras de lograr esta diferenciación. Por otro lado, el lisado de plaquetas es un suplemento de cultivo apropiado para el crecimiento de células madre mesenquimales. Como se mencionó, este suplemento tiene como ventajas potenciales la ausencia de contaminantes de origen animal, y de provenir además de una fuente biológicamente aceptable para la potencial aplicación clínica de una línea celular. Por lo tanto, se propone la hipótesis de que el agregado de un medio suplementado con lisado de plaquetas a las células madre pluripotentes es efectivo para inducir la diferenciación en células madre mesenquimales.

Basados en la hipótesis planteada, el objetivo general a desarrollar en este trabajo de investigación es el desarrollo de un protocolo de cultivo y diferenciación de células madre pluripotentes que incluya como suplemento del medio de cultivo el lisado de plaquetas. El resultado final deberá ser la obtención de manera consistente de una población celular con las características de una células madre pluripotente mesenquimal.

Para demostrar esta hipótesis y lograr el objetivo general, se propone realizar los siguientes objetivos particulares:

1. Generar lisado de plaquetas apto para utilizarlo como medio de cultivo.
2. Desarrollar un protocolo de diferenciación de CMP que induzca la aparición de CMM y que utilice el lisado de plaquetas como suplemento de cultivo.
3. Analizar el fenotipo de la célula diferenciada y determinar su característica mesenquimal.
4. Comparar las células generadas con células de origen mesenquimal.
5. Analizar características funcionales de las células diferenciadas (multipotencia, inmunomodulación) y observar si se corresponden con las características esperadas en las células madre mesenquimales.

3. Materiales y Métodos

3.1. Preparación del lisado de plaquetas

La preparación del lisado de plaquetas (LP) fue realizada según el método publicado por Schallmoser & Strunk, 2013. Se obtuvieron bolsas de plaquetas concentradas del Servicio de Hemoterapia de FLENI que se encontraban en proceso de descarte por vencimiento, el cual se produce 5 días posteriores a la extracción. Las plaquetas fueron obtenidas por medio de un proceso estándar de aféresis, y conservadas en agitación continua a temperatura ambiente. De no ser utilizadas, las bolsas son descartadas.

Para generar el LP se utilizaron dos protocolos ligeramente diferentes, ambos basados en la ruptura de las plaquetas por medio de un proceso de congelado/descongelado. En el primer protocolo, al momento de su expiración las bolsas de plaquetas fueron colocadas a -80°C por al menos 24 horas. Posteriormente fueron descongeladas a 37°C en baño térmico. Al menos diez unidades de cinco pacientes diferentes fueron mezcladas en condiciones estériles en un frasco único, el cual fue nuevamente colocado a -80°C por 24 horas y descongelado nuevamente a 37°C . En este punto se fraccionó la muestra en tubos de 50 mililitros y se centrifugó a 3,000 g por 30 minutos para decantar la fibrina formada. El sobrenadante fue congelado a -80°C hasta su utilización. Este proceso de congelado/descongelado sucesivo (en total de 3 veces) es suficiente para romper más del 75 % de las plaquetas presentes en la muestra.

La generación del LP de la manera descrita demostró contener importantes cantidades de fibrinógeno, no activado, durante la preparación del lisado. Este hecho fue evidente al momento de utilizar el LP como suplemento, ya que a pesar de agregar heparina al medio, el contacto con el medio rico en calcio generaba la activación y agregación del fibrinógeno, creando ocasionalmente una gelatina con el medio de cultivo. Este fenómeno no impedía el crecimiento y desarrollo de las células ya que pudo ser utilizado en los experimentos iniciales, pero la gelatinización entorpecía la manipulación de las células. Por tal motivo, se realizó una modificación al protocolo, descrita por Copland y colaboradores (Copland et al., 2013) (figura 11), en la cual se extrae la mayor cantidad de fibrina antes de suplementar el medio de cultivo. Los autores describen que no encontraron diferencias significativas entre las distintas formas de preparar el lisado de plaquetas, y en nuestro caso resultó ser indistinto para la generación de CMM-DP. En este protocolo básicamente se siguieron los pasos anteriores descritos, pero antes de congelar por segunda vez y hasta su utilización, se agregó cloruro de calcio 10 mM por 1 hora a 37°C . Luego se centrifugaron las muestras por una hora a 3,000 g, y se tomó el sobrenadante libre de restos de fibrina depositados en el fondo. Este procedimiento generó un suplemento que no gelatiniza al contacto con el medio.

3.2. Células

Los trabajos desarrollados para estas investigaciones fueron realizados con diferentes tipos celulares. Las células madre pluripotentes utilizadas fueron de dos tipos. En primer lugar, se utilizaron células madre embrionarias humanas (CMEh) compradas comercialmente. En la mayor parte de los casos se utilizó la línea H9 o WA09, comprada previamente por nuestro laboratorio en WiCell

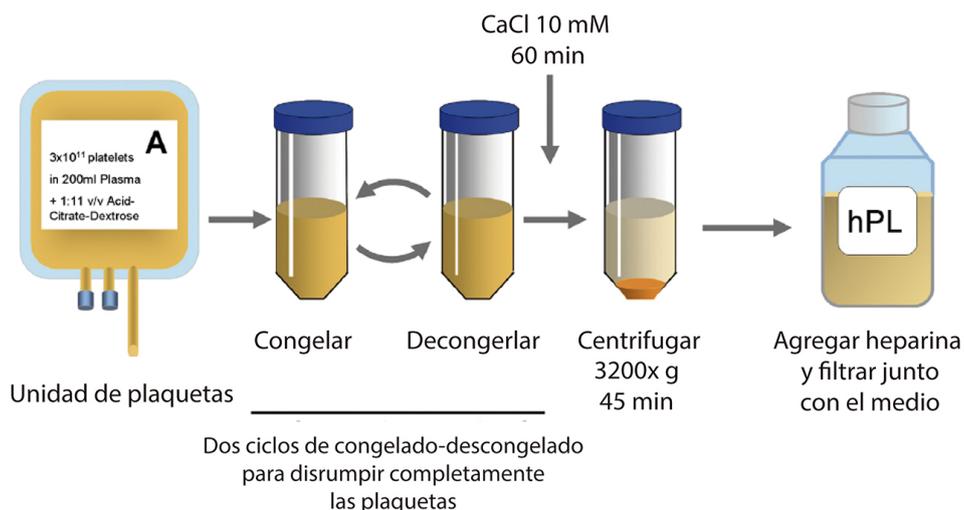


FIGURA 11: *Generación de lisado de plaquetas. Se obtuvieron bolsas de plaquetas en proceso de descarte, las cuales fueron mezcladas y congeladas sucesivamente como se describe en los métodos. Luego de tres ciclos de congelado/descongelado, se agregó cloruro de calcio para agregar la fibrina y se centrifugaron los tubos. El sobrenadante se congeló nuevamente hasta su utilización.*

Research Institute, Wisconsin, USA (www.wicell.com). También se utilizó, en menor medida, la línea HUES-5 generada en Harvard, USA y donadas previamente a nuestro laboratorio.

Por otro lado, utilizamos CMPi generadas a partir de fibroblastos humanos en nuestro laboratorio. Nuestro laboratorio cuenta con tres líneas totalmente caracterizadas, llamadas FN2.1, FH2.1 e IPS6.1; estos experimentos fueron realizados mayormente con la línea FN2.1 (García et al., 2013; Questa et al.). La generación de CMPi fue realizada previamente mediante la reprogramación con el lentivirus STEMCCA, cedido generosamente por Gustavo Mostovlaski (Sommer et al., 2009). Se utilizaron fibroblastos de prepucio aislados hace aproximadamente cinco años, bajo consentimiento informado obtenido en el Comité de Ética de FLENI. Estos fibroblastos primarios fueron infectados con el lentivirus que contiene los factores de transcripción Oct-4, Sox-2, Klf-4 y c-Myc. La infección con este virus generó colonias de células reprogramadas, las cuales fueron aisladas clonalmente y caracterizadas para determinar su pluripotencia. Para ello, se realizó PCR en tiempo real e inmunofluorescencia para determinar la expresión de marcadores de indiferenciación, incluyendo OCT-4, NANOG y Sox-2. Además, las CMPi fueron diferenciadas *in vitro* por medio de la generación de cuerpos embrioides y se confirmó la diferenciación en células adultas de las tres capas germinales. Finalmente, cuando las CMPi fueron inyectadas en ratones *nude* generaron tumores caracterizados histológicamente como teratomas. Todos estos elementos confirmaron las características presentes en una célula madre pluripotente inducida (García et al., 2013; Questa et al., 2016; Romorini et al., 2012, 2013; Scassa et al., 2011).

Como se mencionó, las líneas utilizadas en este trabajo fueron las H9 y la FN2.1, pero cabe destacar que la capacidad de generación de CMM-DP no difiere con cualquiera de las líneas de CMEh o CMPi utilizadas.

Los fibroblastos obtenidos de prepucio fueron también utilizados como control de células adultas terminalmente diferenciadas. Además, un segundo control fueron las células madre mesenquimales aisladas de cordón umbilical (CMM-CU). Los cordones umbilicales fueron obtenidos en la maternidad del Hospital Español de La Plata. El procesamiento de los mismo fue realizado bajo

condiciones de esterilidad, disecando la capa externa del cordón y accediendo a la gelatina de Wharton, separando el paquete vascular. La gelatina fue cortada en pedazos de aproximadamente 1 a 2 milímetros, y colocada en platos de cultivo en atmósfera húmeda a 37 °C con 5 % de CO₂. Con el correr de los días se observó el crecimiento de células a partir de los pedazos. Se expandió la masa de células y se congeló en pasaje bajo (p2). EL medio utilizado para la derivación y expansión fue DMEM suplementado con SFB 10 % o LP 10 %.

3.3. Cultivo celular

El cultivo de las células madre pluripotentes se realiza habitualmente en nuestro laboratorio de manera estandarizada. Las CMP son cultivadas en colonias de células pluripotentes, indiferenciadas, las cuales crecen en forma radial y tridimensional, y necesitan ser pasadas con cierta regularidad para evitar la diferenciación. El crecimiento se realiza en co-cultivo con fibroblastos embrionarios de ratón inactivados (*inactivated mouse embryonic fibroblasts, iMEF*) con irradiación, los cuales proveen de factores de crecimiento y matriz extracelular para el mantenimiento del estado indiferenciado. El medio de cultivo para las células pluripotentes consiste en DMEM/F12 suplementado con Knock-out Serum Replacement (KSR) al 10 %, factor de crecimiento fibroblástico β (bFGF) 8 ng/ml, aminoácidos no esenciales (1x), L-glutamina 2 mM, y β -mercaptoetanol 0.1 mM (todos los compuestos de Life technologies, USA). Las células crecen en la incubadora a 37°C, con atmósfera humidificada conteniendo CO₂ 5 %. Aproximadamente cada 5 a 7 días las colonias son pasadas a nuevas iMEF utilizando una separación enzimática con colagenasa IV 1 mg/ml (Life Technologies, USA) durante 60 minutos a 37°C en la incubadora.

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) son aislados y crecidos rutinariamente en nuestro laboratorio. Los fibroblastos primarios se aíslan a partir de ratonas preñadas en día 12,5 de gestación. Bajo esterilidad y luego de sacrificar el animal por dislocación cervical, se extraen los embriones por disección y se lavan en forma abundante con PBS. Posteriormente, bajo observación por lupa se extirpan las vísceras y el encéfalo, conservando el resto del cuerpo. Estos restos son seccionados en pedazos de aproximadamente 1 mm y se los incuba con Tripsina/EDTA 0,25 % (Life Technologies, USA) durante 30 minutos en incubadora de cultivo celular. Luego de este tiempo los restos disgregados son colocados en DMEM suplementado con SFB10 % para inactivar la tripsina y centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante es descartado y los pequeños trozos de tejido conectivo son colocados en platos de cultivo hasta observarse el crecimiento de células fibroblásticas. Estas células son posteriormente expandidas por un pasaje y congeladas. Los MEF inactivados son utilizados para co-cultivo de células madre pluripotentes en pasaje 4 a 6. Para ello, se expanden hasta este pasaje, y al momento de ser utilizados se resuspenden en un tubo de 15 mililitros para ser irradiados. La irradiación se realiza con rayos gamma (40-80 Gy) en la empresa Cebirsa, Buenos Aires. Esta dosis de radiación genera una inactivación de la división celular, pero mantienen vitalidad como para seguir secretando factores de crecimiento al medio de cultivo. Una vez irradiados, los iMEF son congelados para uso posterior o cultivados inmediatamente. El cultivo se realiza en platos cubiertos previamente con gelatina 0.1 % (Sigma-Aldrich, USA) durante 60 minutos, en DMEM suplementado con SFB 10 % (Natocor, Argentina).

Los fibroblastos humanos fueron cultivado en DMEM suplementado con SFB al 10 % (Natocor, Argentina) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomomicina μ g/ml; Pen-Strep, Life Techno-

logies, USA). Para los experimentos, las CMM-CU se cultivaron en DMEM suplementado con lisado de plaquetas al 10 %.

Se utilizaron diferentes enzimas para generar el estado unicelular de las células y pasarlas cuando el plato en que se encontraban alcanzara una confluencia de 80-90 %. Se probó la utilización de tripsina, Triple (una tripsina recombinante de Life Technologies, USA), y colagenasa. Sin embargo, los mejores resultados se hallaron con una mezcla de enzimas llamada Accutase (Life Technologies, USA), de la cual se desconoce exactamente su composición, pero es una mezcla de colagenasas y enzimas proteolíticas de actividad similar a la de tripsina, pero con menor potencia y agresión para las células. Por lo tanto, en el protocolo de diferenciación de CMP en CMM-DP se utilizó esta enzima para el pasaje de las células.

La densidad de comienzo de células indiferenciadas fue ajustada para el mejor aprovechamiento del protocolo. Se utilizó una densidad de aproximadamente 10,000 a 20,000 células por cm^2 . La curva de crecimiento de las células hace que concentraciones mayores alcancen muy rápidamente la confluencia, y genera problemas en la logística del manejo de las células. Por lo tanto, se adoptó esta concentración aproximada para el desarrollo del protocolo.

3.4. Cuantificación del crecimiento de la población celular

El crecimiento del número de células fue realizado por medición directa con el citómetro de flujo de nuestro laboratorio (BD Accuri, USA). Este equipamiento permite la medición del número de células en suspensión, ya que presenta una bomba peristáltica de precisión para impulsar la suspensión celular. Según el diseño experimental, las células fueron cultivadas y despegadas por medio de Tripsina/EDTA 0.25 % por 3 a 5 minutos. Una vez resuspendidas, se centrifugó la muestra y se resuspendió nuevamente en un volumen conocido de PBS suplementado con albúmina de suero bovino 0.1 % (PBS/BSA, Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente se contaron con el citómetro la concentración de células en 50 μl .

La curva de crecimiento celular fue realizada a partir de mediciones seriadas durante la diferenciación de las CMP a CMM, partiendo de una población indiferenciada de 1.5×10^5 células. Las células fueron inicialmente cultivadas en un pocillo de una placa de 6 *multiwells*. Las células fueron cultivadas siguiendo el protocolo de diferenciación de CMP a CMM-DP desarrollado, utilizando suplemento de LP 10 % en comparación con SFB 10 %.

3.5. Microscopía fluorescente

Las células adherentes a analizar fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % por 45 minutos a temperatura ambiente, y lavadas posteriormente tres veces con PBS/BSA 0.1 %. Posteriormente se permeabilizó las células con una solución de PBS/BSA más suero de cabra 10 % y Triton 0.1 % durante 45 minutos, y nuevamente se lavó tres veces con PBS/BSA. Luego las muestras se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario deseado. Los siguientes anticuerpos fueron utilizados, ambos contra factores de transcripción relacionados con la pluripotencia: anti-Oct-4 (clon C-10, Santa Cruz, USA), anti-NANOG (clon D73G4, Cell Signalling, USA). Ambos anticuerpos fueron utilizados en una concentración de 1:200 resuspendidos en PBS más suero de cabra al 10 %. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS/BSA y posteriormente se incubaron

por 45 minutos con el anticuerpo secundario (anti-IgG-AlexaFluor-488 para ratón y anti-IgG-AlexaFluor-555 para conejo respectivamente, ambos en una concentración de 1:100, ambos de Life-Technologies, USA) más DAPI 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Finalmente, las muestras se lavaron extensamente tres veces con PBS/BSA, y se observaron bajo un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-S. Las fotografías se obtuvieron con el software Eclipse Net.

3.6. Citometría de flujo

Las células adherentes fueron incubadas por aproximadamente 5 a 10 minutos a 37°C con la enzima Accutase (Life Technologies, USA) hasta observar que se desprendían del plato, resuspendidas en PBS/BSA y fraccionadas en un volumen final de 50 μl . Esta enzima es efectiva en resuspender las células en forma unicelular sin destrucción de las mismas como con la Tripsina. Las células despegadas fueron centrifugadas y alicuotadas en 50 μl por muestra, y se incubaron con el respectivo anticuerpo primariamente conjugado, a oscuras y a temperatura ambiente, por 30 minutos. Luego las muestras se resuspendieron en PBS/BSA hasta 1 mililitro y se centrifugaron a 3200 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 200 μl . Posteriormente se analizaron las células en el citómetro de flujo (BD Accuri, USA). Se contaron al menos 5,000 eventos por muestra, seleccionadas previamente en una región de interés correspondiente a las células sin contaminación con debris. Para las muestras con múltiples fluoróforos, se realizó la compensación correspondientes utilizando muestras marcadas individualmente con cada uno de los anticuerpos primariamente conjugados. El análisis de las muestras y los gráficos correspondientes se realizaron con el software del equipo. En la siguiente Cuadro 1 se describen los anticuerpos utilizados.

3.7. Reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (qPCR)

Se utilizó la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (qPCR) para medir la expresión de diferentes genes. En primer lugar, se realizó la extracción de ARN total utilizando Trizol (Life Technologies, USA). Para ello, se descartó el medio sobrenadante, se lavó con PBS, y se resuspendió a las células en aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de Trizol durante unos 3 a 5 minutos, realizando una agitación suave con la pipeta. Las muestras de ARN fueron congeladas a -80°C hasta su procesado.

El procesamiento de la muestra de Trizol se realizó agregando 200 μl de cloroformo por cada mililitro de Trizol, agitando vigorosamente por 15 segundos, e incubando a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos aproximadamente. Posteriormente se realizó una centrifugación a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C. Se obtuvieron así tres fases, en donde la superior, acuosa, contiene el ARN. Posteriormente se transfirió esta fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf y se agregó 0,5 ml de isopropanol por cada un mililitro de Trizol. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la precipitación del ARN. Posteriormente se realizó una centrifugación de 10 minutos a 12,000 g a 4°C, luego de los cuales se observa un precipitado blanco tipo gel correspondiente al ARN. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 mililitro de etanol 75 % por cada 1 mililitro de Trizol utilizado. Se realizó un homogeneizado con vortex y se centrifugó a 7,500 g durante cinco minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se dejó secar por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió el *pellet* en 30 μl de agua libre de RNAsas y se preservó el ARN purificado a -80°C.

CUADRO 1: *Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.*

Antígeno	Nombre	Fluoróforo	Especie	Clon	Compañía
CD4	~	PerCP	ratón	SK3	BD
CD8	~	APC	ratón	SK1	BD
CD11b/Mac1	~	PE	ratón	ICRF44	BD
CD14	~	FITC	ratón	M5E2	BD
CD19	~	FITC	ratón	H1B19	BD
CD29	integrin β 1	PE	ratón	Mar4	BD
CD34	~	FITC	ratón	581	BD
CD44	~	APC	ratón	F10-44-2	Invitrogen
CD45	~	FITC	ratón	H130	BD
CD49a	integrin α 1	PE	ratón	SR84	BD
CD49d	integrin α 4	PE	ratón	9F10	BD
CD49e	integrin α 5	PE	ratón	HA1	BD
CD49f	integrin α 6	PE	ratón	GoH3	BD
CD51/CD61	integrin α V/ β 3	PE	ratón	23C6	BD
CD56	~	APC	ratón	MEM-188	Invitrogen
CD73	~	PE	ratón	AD2	BD
CD79a	~	PE	ratón	HM47	BD
CD90	Thy-1	PE	ratón	5E10	BD
CD98	~	FITC	ratón	MEM-108	BD
CD105	Endogлина	PerCP-Cy5.5	ratón	266	BD
CD117	c-kit	FITC	ratón	104D2	Invitrogen
CD133	AC133	PE	ratón	AC133	Miltenyi
CD144	VE-cadherina	APC	ratón	16B1	Invitrogen
CD146	EndoCAM	FITC	ratón	P1H12	Invitrogen
CD166	ALCAM	PerCP-Cy5.5	ratón	3A6	BD
CD172a/b	SIRPa/b	PE-Cy7	ratón	SE5A5	Biologend
CD271	NGFR	AF-647	ratón	C40-1457	BD
CD309	KDR, Flk1	PE	ratón	89106	BD
CD324	e-cadherina	APC	ratón	67A4	Invitrogen
CD325	n-cadherina	PE	ratón	8C11	Invitrogen
CD326	EpCAM	PE	ratón	VU-1D9	Invitrogen
HLA-DR	~	FITC	ratón	TU36	BD
integrin β 7	~	APC	rata	FIB504	BD
SSEA-4	~	AF-488	ratón	MC813-70	Invitrogen
Tra-1-60	~	AF-647	ratón	Tra-1-60	BD

Al momento del análisis, se realizó la retrotranscripción del ARN para generar el ADN complementario (ADNc). Se cuantificó el mismo utilizando un NanoDrop, y se resuspendió 1 μg de ARN en agua MiliQ. Cada muestra se incubó a 65°C por 5 minutos en un termociclador (Eppendorf, Alemania) para desnaturalizar el ARN. Luego, se agregaron 10 μl de la mezcla de retrotranscripción, compuesta por: agua MiliQ 2 μl , dNTP 25 mM 0.8 μl , random primers 0.2 μl , DTT 2 μl , buffer 4 μl , y la retrotranscriptasa RT-MMLV 1 μl (todos de Life Technologies, USA, excepto RT-MMLV de Promega, USA). Esta mezcla se incubó por 50 minutos a 37°C, tiempo suficiente para generar el ADNc. La mezcla finalmente se inactivó incubándose a 70°C por 15 minutos.

A partir del ADNc generado se realizó la qPCR. El Cuadro 2 identifica los pares de primers específicos utilizados para cada gen. El gen RPL7 fue utilizado como control. Los primers fueron diseñados con el programa Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Además, el diseño se realizó considerando la no complementación con el AND murino para evitar contaminación de las iMEF, y se diseñaron complementando dos exones diferentes y en simultáneo a fin de evitar que se amplifique el ADN genómico. La temperatura de fusión (T_m) al momento del diseño de los primers fue de 60°C. La solución para la reacción de termociclado fue preparada en 20 μl , conteniendo: 10 μl de SYBR-Green master mix (Life Technologies, USA), 0,4 μl de ROX (Life Technologies, USA), 3,6 μl de primer forward, 3,6 μl de primer reverse, y 2 μl de ADNc. El análisis de la muestra se realizó en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystem, USA) utilizando un programa con las siguientes características: 10 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 60°C, 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 58°C, y 40 segundos a 72°C. Los datos fueron analizados por medio del cálculo del $\Delta\Delta CT$, ajustando los valores según la expresión de RPL7.

3.8. Diferenciación y análisis de las células madre mesenquimales

La determinación de la multipotencia de las CMM-DP fue realizada utilizando suplementos de cultivo *ad hoc*. Estos medios son precondicionados para la diferenciación de CMM en adipocitos, condroblastos y osteocitos (StemPro Adipogenesis Differentiation Kit, StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit y StemPro Osteogenesis Differentiation Kit; Life Technologies, USA). De los mismos no se conoce la composición, pero los medios de diferenciación a estos fenotipos están compuestos por elementos conocidos por su capacidad de inducir la diferenciación de las CMM. Para la diferenciación a adipocitos, los medios contienen habitualmente dexametasona,

CUADRO 2: *Primers utilizados en qPCR.*

Gen	Secuencia del primer forward	Secuencia del primer reverse
OCT-4	GCTGGAGAAGGAGAAGCTGG	GCTAAGCTGCAGAGCCTCAA
NANOG	AAAGAATCTTCACCTATGC	GAAGGAAGAGGAGAGACA
Laminina-C1	GGCCAGGATGTCAAAGATG	TGTTCTCTACATGGGCACG
Fibronectina	AAGACCAGCAGAGGCATAAGG	CACTCATCTCCAACGGCATAATG
Colágeno	GCCAAGTATCTCACCTGGATCA	GGA CTACCTGGAACAAAAGGG
Vimentina	GAGTGCAAGCCCAAGTGAC	GCCATCGTCATAGACCGTGT
Snai2	TCAAGGACACATTAGAACTCAC	CTACACAGGAGCCAGATTC
T/Brachyury	TCCCAGGTGGCTTACAGATGA	GGTGTGCCAAAGTTGCCAAT
Zeb2	GGAGACGAGTCCAGCTAGTGT	CCACTCCACCCTCCCTTATTTT
RPL7	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC

isobutylmethylxanthine e indometacina. Para la diferenciación a condroblastos, habitualmente contienen TGF- β , dexametasona, y BMP-2 o BMP-6. Finalmente, para inducir la diferenciación en osteoblastos los medios habitualmente contienen dexametasona, fosfato de glicerol, y ácido ascórbico.

La diferenciación fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la diferenciación a adipocitos, las células fueron cultivadas con una densidad inicial de 1×10^4 células por cm^2 , y se las incubó por 14 días en el medio. Para la diferenciación a osteoblastos, las células fueron cultivadas con una densidad inicial de 5×10^3 por cm^2 , y se cultivaron por 21 días en el medio específico. Finalmente, para la diferenciación a condroblastos, se concentraron células en suspensión (16000 células por microlitro) y se colocaron gotas de $5 \mu\text{l}$ en diferentes partes del plato, y se dejó adherir las células por 6 horas. Posteriormente se agregó el medio específico y se cultivaron los agregados celulares por 21 días.

Una vez concluido el período de diferenciación se realizaron tinciones para determinar la generación de adipocitos, condroblastos y osteoblastos. Para detectar la diferenciación a adipocitos, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con una solución saturada de negro de Sudán diluida en etanol al 70%, y finalmente se lavaron extensamente con etanol 70%. Para determinar la diferenciación a condroblastos, se realizó una tinción con azul Alcían al 1% diluida en una solución normal al 0.1 de hipoclorito de sodio. Para la determinación de la diferenciación en osteoblastos, se realizó una tinción con rojo Alzarín al 2% en un pH de 4.2 durante 3 minutos a temperatura ambiente, y luego lavado extensamente con agua destilada. Finalmente, las muestras fueron observadas en microscopio invertido con luz directa (Nikon Eclipse TE2000-S) y se adquirieron imágenes de las tinciones utilizando el software Eclipse Net.

3.9. Evaluación de la capacidad de inmunomodulación

Las CMM han sido extensamente estudiadas en su capacidad de alterar la respuesta inmunológica. Las maneras de analizar este fenómeno son variadas, pero la más utilizada ha sido la prueba de reacción mixta de linfocitos y sus variantes (Lyons, Blake, & Doherty, 2013; Muul et al., 2011; Parish, Glidden, Quah, & Warren, 2009; Quah, Warren, & Parish, 2007; Wallace et al., 2008; Witkowski, 2008). Este procedimiento se basa en activar linfocitos *ex vivo* utilizando estimuladores inespecíficos (fitoaglutinina, concavalina-A, etc.) o específicos (interleukina-2, anti-CD3). La estimulación esta basada en la activación de los linfocitos de manera inespecífica, es decir, no contra un antígeno en particular. En nuestro caso elegimos activar los linfocitos con concanavalina-A y con un anticuerpo anti-CD3. Ambos compuestos dimerizan espontáneamente el receptor CD3 y activan los linfocitos.

El protocolo fue desarrollado sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP), la cual contiene la fracción de linfocitos y monocitos. Para aislar las CMSP se realizó una extracción de 10 mililitros de sangre por vena antecubital en jeringa heparinizada. La sangre fue procesada de inmediato. Se diluyó la muestra en una proporción 1:1 con PBS (sin calcio ni magnesio). Posteriormente se colocó la mezcla sobre una solución de Ficoll (Sigma-Aldrich, US), cuidando de que la sangre no se mezcle con el Ficoll en la parte inferior. La relación sangre + PBS/Ficoll fue 1,5:1. Posteriormente se realizó la centrifugación diferencial a $800g$ durante 30 minutos a 4°C .

Este proceso hace que los eritrocitos atraviesen la capa de Ficoll y se depositen en el fondo. La capa de Ficoll queda conteniendo los leucocitos polimorfonucleares, y en la capa superior queda una suspensión de plasma con plaquetas. Entre el Ficoll y la capa superior queda una nube de células mononucleares, compuesta por linfocitos y monocitos, la cual se extrae manualmente por succión. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS (sin calcio ni magnesio) centrifugando a 200 g. En este punto las CMSP fueron utilizadas inmediatamente en los experimentos de inmunomodulación, o congeladas de manera estándar para ser utilizadas posteriormente.

Para la reacción linfocitaria mixta, las CMSP fueron cultivadas en RPMI-1640 suplementado con SFB 10%. Antes de comenzar el experimento, un número apropiado de CMSP fueron teñidas con el colorante CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) (Life Technologies, USA) como ha sido descrito previamente (Quah, Warren, & Parish, 2007). Luego las CMSP fueron preestimuladas con Concanavalina-A (Sigma-Aldrich, USA) por 24 horas, luego de lo cual las células fueron lavadas con PBS y co-cultivadas con las CMM-DP por 96 horas en RPMI-1640 suplementado con SFB 10%, anticuerpo anti-CD3 (clon UCHT1) 10 ng/ml (R&D Systems, USA), e interleuquina-2 300 UI/ml (R&D Systems, USA). Luego de este tiempo las células fueron lavadas y se realizó una tinción para los antígenos CD4 y CD8 utilizando el protocolo de tinción descrito anteriormente. Finalmente, las células fueron analizadas por citometría de flujo, demarcando las regiones de interés apropiadas para analizar CMSP, y de ella, las células CD4(+) o CD8(+) (ver figura 32).

3.10. Análisis del estado de metilación del promotor de Oct-4

Para determinar el estado de metilación de la zona promotora del gen de Oct-4 se realizó la conversión con bisulfito del ADN genómico de las células y posterior cuantificación de las bases cambiadas para así inferir el grado de metilación original. El procedimiento se basa en la grado de protección que le da la metilación de las bases de citosina a la conversión en uracilo por parte del bisulfito. Todas las bases demetiladas, en presencia de bisulfito, son convertidas en uracilo. Una vez realizada esta conversión se realiza una amplificación por termociclado de las regiones de interés, lo cual genera secuencias de ADN convertido por bisulfito, las que posteriormente son secuenciadas. En estas secuencias las bases citosina no metiladas en el ADN genómico se encuentran reemplazadas por timidina. La comparación de las secuencias esperadas con el resultado real en las secuenciadas expresa el número de bases en estado metilado originalmente. Este ensayo representa entonces el estado de activación/inactivación epigenética del gen de la pluripotencia Oct-4 por medio de la metilación/demetilación de su promotor (Freberg, Dahl, Timoskainen, & Collas, 2007; Orkin & Hochedlinger, 2011). Este cambio del estado de metilación es utilizado por la células para regular epigenéticamente la expresión de un gen específico.

Para el análisis, se aisló el ADN genómico utilizando un kit comercial en primer lugar (Wizard Genomic DNA kit, Promega, USA). Se levantaron las células con tripsina, se centrifugaron a 14,000 g durante 30 segundos, y se realizó un lavado posterior en en PBS. Se resuspendió el pellet en 200 μ l de PBS y se agregó 600 μ l de la solución de lisis nuclear, agitando hasta lograr una solución homogénea más 17.5 μ l de una solución de proteinasa K a 20 mg/ml (Promega, USA). La solución se incubó durante la noche a 55°C y en agitación continua. Posteriormente se agregaron 200 μ l de solución precipitante de proteínas, se agitó y se colocó en hielo por 5 minutos, para luego centrifugarlo a 14,000 g durante 5 minutos. El sobrenadante, libre de proteínas, fue

entonces pasado a otro tubo y resuspendido en 600 μl de isopropanol a temperatura ambiente y mezclado hasta lograr que el ADN enturbie la solución. Posteriormente se centrifugó a 14,000 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 600 μl de etanol a temperatura ambiente, se mezcló la solución y se centrifugó nuevamente a 14,000 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, se invirtió el tubo y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 15 minutos. Finalmente se agregaron 100 μl de solución de hidratación de ADN y se incubó durante 1 hora a 65°C, con agitaciones intermitentes. El ADN finalmente se almacenó en heladera hasta su utilización.

Posteriormente se realizó la conversión del ADN usando un kit comercial de bisulfito (EZ DNA Methylation Gold kit, Zymo Research, USA). Este cambio consiste en convertir todas las citosinas en uracilos. Para ello se colocaron 200 ng de ADN en 20 μl de agua más 130 μl del agente de conversión, y se incubó en termociclador (98°C por 10 minutos, seguido de 64°C por 150 minutos). Luego se dejó por un día a 4°C. Posteriormente la solución se cargó en una columna conteniendo 600 μl del buffer de ligado. La columna entonces se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos, y se descartó la solución. Se realizó un lavado de la columna y posterior centrifugado en las mismas condiciones. Se realizaron tres centrifugados sucesivos agregando 200 μl del buffer de desulfonización. Finalmente, se colocó la columna en un tubo eppendorf y se le agregó 10 μl del buffer de elusión, centrifugando por 30 segundos a 10,000 g. El ADN bisulfitado entonces se congeló a -20°C hasta su análisis.

Utilizando el ADN bisulfitado se amplificaron las islas de CpG localizadas en el promotor de Oct-4. Estas islas fueron seleccionadas a partir de una publicación previa utilizando los primers publicados y descritos en el cuadro 3 (Freberg et al., 2007), y se localizan entre el *Transcription Starting Site* (TSS, sitio de inicio de la transcripción) y el primer exón del gen. El termociclado se realizó en una solución de 25 μl conteniendo: 2,5 μl de buffer de PCR (Tris-HCL 200 mM mas KCl 500 mM a pH 8.4), 1 μl de cloruro de magnesio 50 mM, 0,5 μM de dNTP (Life Technologies, USA), 2,5 μl de *primer forward* a 20 mM, 2,5 μl de *primer reverse* a 20 mM, 0,2 μl de TAQ DNA polimerasa (Life Technologies, USA) a 5 U/ μl , 2 μl de ADN bisulfitado, y 13,8 μl de agua libre de ADNasas. Las condiciones del programa de termociclado fueron 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de un minuto a 95°C, 50/55/58°C por un minuto (dependiendo del primer) y un minuto a 72°C, con un ciclo final de 72°C durante 10 minutos. El producto amplificado fue entonces purificado con el kit comercial ExoSAP-IT (Affymetrix, USA). Se colocaron 5 μl del producto del termociclado más 2 μl del reactivo ExoSAP-IT y se incubó la solución a 37°C por 15 minutos, seguido de una incubación a 80°C por 15 minutos. La muestra finalmente fue enviada a secuenciar a Macrogen (<http://www.macrogen.com>).

Una vez obtenidos los resultados de secuenciación los datos fueron analizados con dos programas diferentes (BiQ Analyzer, Max Planck Institute for Informatics, Alemania y BioEdit, Ibis Biosciences, USA). Se analizaron las secuencias de ADN nativo y se compararon con las de ADN bisulfitado. En aquellos casos en que se encontraba la presencia de una base timidina donde correspondía una citosina, se consideró que la región estaba originalmente demetilada. El grado de demetilación determinó el porcentaje asignado. Se construyó un *heatmap* con los datos obtenidos utilizando el *software* R (www.r-project.org).

CUADRO 3: *Primers utilizados en el análisis del estado de metilación de la zona promotora del gen Oct-4.*

Región (relativo al TSS)	Secuencia del primer forward	Secuencia del primer reverse
-2609 a -2417	TTAGGAAAATGGGTAGTAGGGATTT	TACCCAAAAACAAATAAATTATAA AACCT
-2344 a -2126	ATTTGTTTTTTGGGTAGTTAAAGGT	CCAACTATCTTCATCTTAATAAC ATCC
-2136 a -1721	GGATGTTATTAAGATGAAGATAG TTGG	CCTAAACTCCCCTTCAAATCTATT
-1755 a -1574	AATAGATTTTGAAGGGGAGTTTAGG	TTCTCCTTCTCTAAAAACTCA
-1014 a -720	GAAGGGGAAGTAGGGATTAATTTT	CAACAACCATAAACACAATAACCAA
-567 a -309	TAGTTGGGATGTGTAGAGTTGAGA	TAAACCAAACAATCCTTCTACTCC
-215 a -29	AAGTTTTTGTGGGGGATTTGTAT	CCACCCACTAACCTTAACCTCTA

4. Resultados

4.1. Células madre pluripotentes: caracterización del cultivo celular

En primer lugar se caracterizó la identidad de las células en cultivo a través de la detección de la presencia de marcadores típicos de células pluripotentes. La figura 12 muestra la expresión de marcadores de pluripotencia (Oct-4, Tra-1-80 y SSEA4) en colonias de CME, rodeadas por iMEF negativas para estos marcadores.

4.2. Efectos del lisado de plaquetas sobre colonias de CMP indiferenciadas

Se determinó cuáles eran los efectos del lisado de plaquetas en las CMP indiferenciadas. La presencia de múltiples factores de crecimiento en el medio era posible que determinara un cambio en las células madre pluripotentes. Para analizar estos efectos, se incubaron las CMP de manera estándar, es decir con iMEF y en medio conteniendo KSR y bFGF. Este medio mantuvo las células de manera habitual, sin cambios morfológicos de las colonias (Figura 13, hilera superior). Como puede apreciarse, las colonias crecen en forma radial y generan un cúmulo de células con poco citoplasma y se agrupan densamente en el centro de la colonia. El cambio de las condiciones de cultivo, reemplazando el KSR y bFGF por LP, generó cambios morfológicos a las 24 horas (figura 13, hilera inferior). Se puede observar que gradualmente las células de las colonias cambian de morfología, adquiriendo un mayor contenido de citoplasma. A 96 horas de haber realizado el cambio, el LP generó unas colonias con células morfológicamente muy diferentes y aberrantes.

Los cambios morfológicos marcados y muy tempranos podrían significar cambios en el estado de pluripotencia. Para determinarlo, se realizó un análisis de qPCR para los marcadores de estado indiferenciado Oct-4 y Nanog, dos genes maestros para el mantenimiento de la pluripotencia. Se tomaron muestras de células crecidas en forma estándar y muestras expuestas al LP por 96 horas. Se observó una caída de la expresión de Oct-4 a 0.63 ± 0.13 veces al valor de referencia, y a 0.26 ± 0.11 para Nanog (figura 14).

Finalmente, se realizó una inmunomarcación (figura 15) de fluorescencia para los mismos factores de transcripción de la pluripotencia. Los resultados demostraron que a 96 horas las colonias reducían drásticamente la expresión de ambos factores de transcripción, concordante con la pérdida de la morfología típica de colonias de CMP indiferenciadas.

4.3. Utilización del lisado de plaquetas para la diferenciación de las CMP

A partir de ensayos preliminares, se desarrolló un protocolo de diferenciación de las CMP a CMM-DP en dos etapas diferentes. La primera etapa consiste en la transición epitelio-mesenquimal de las CMP. En esta etapa, se observó que las CMP transitan lentamente a la diferenciación a células mesenquimales, y paulatinamente pierden las características de CMP. Por lo tanto, en esta etapa con los requerimientos de cultivo de las CMP, que incluyeron:

- Suplemento de inhibidor de ROCK (iROCK), para evitar la muerte en cada pasaje celular.

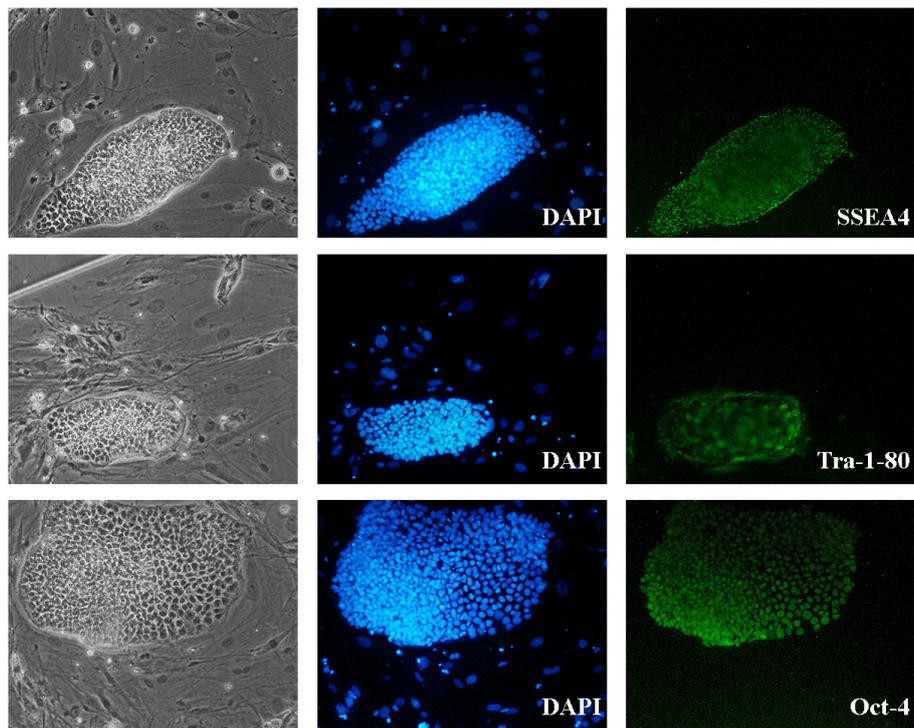


FIGURA 12: *Expresión de marcadores de indiferenciación en células madre pluripotentes. Las CMP fueron cultivadas sobre iMEF y se realizó una inmunomarcación fluorescente para SSEA-4, Tra-1-80 y Oct-4, los cuales se expresan de manera marcada en estas células. El núcleo fue teñido con DAPI.*

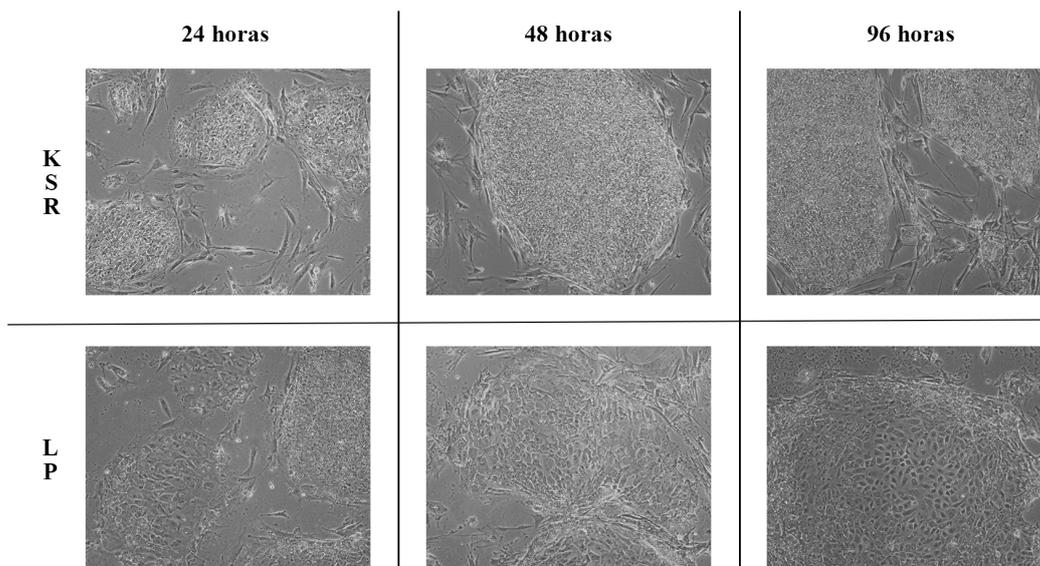


FIGURA 13: *Efectos del lisado de plaquetas sobre las células madre pluripotentes. Las colonias de CMP fueron cultivadas rutinariamente con el suplemento KSR, o con lisado de plaquetas (LP). Como se observa, rápidamente las colonias adquieren una morfología heterogénea cuando son expuestas al LP, lo que indica la pérdida de la pluripotencia.*

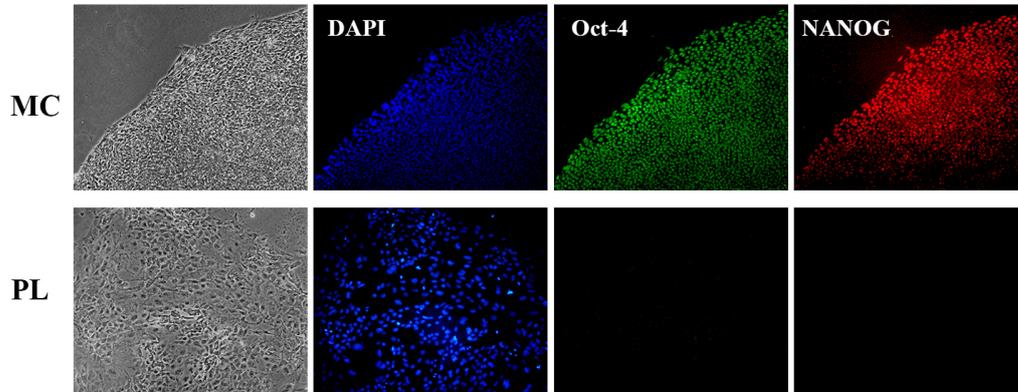


FIGURA 14: Inmunomarcación de células madre pluripotentes expuestas a lisado de plaquetas. Las CMP fueron cultivadas en medio condicionado (MC) o sobre lisado de plaquetas (PL) y sobre una matriz extracelular (Geltrex). Se realizó una tinción para Oct-4 y Nanog, ambos marcadores de pluripotencia. Como se observa, luego de 96 horas se observó una caída marcada en la expresión de ambas proteínas.

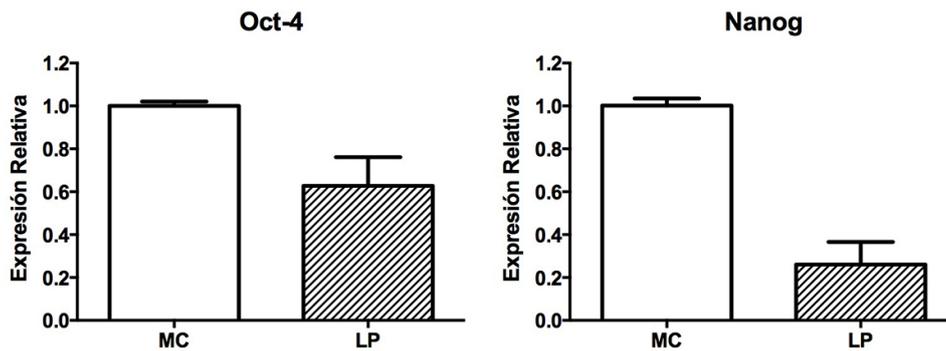


FIGURA 15: Expresión por qPCR de marcadores de pluripotencia en células madre pluripotentes expuestas a lisado de plaquetas. La exposición al LP provoca una caída de la expresión de los genes de pluripotencia. MC: Medio Condicionado; LP: Lisado de Plaquetas. Para ambos genes, los valores se normalizaron a MC. Para Oct-4, LP presenta una caída de 0.63 ± 0.27 ; para Nanog fue de 0.26 ± 0.21 . Los valores se expresan en media \pm desvío estándar.

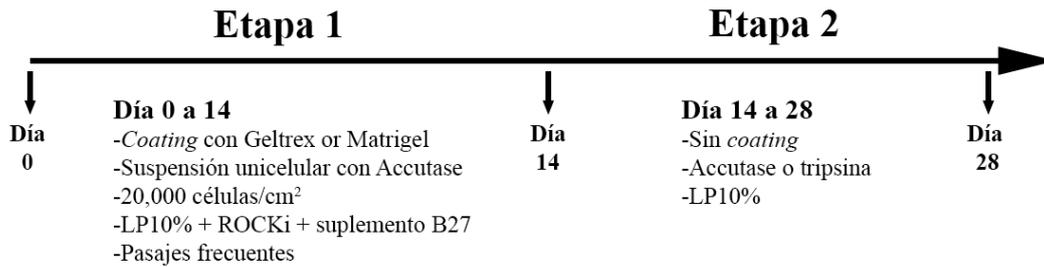


FIGURA 16: Descripción esquemática del protocolo de diferenciación de CMP a CMM-DP. En este esquema se resumen los pasos generados a partir de los experimentos realizados para el desarrollo del protocolo de diferenciación. El protocolo comprende dos etapas diferentes. En la primera, las células conservan requerimientos de las CMP, tales como el uso de una matriz extracelular como coating, o la incubación con *iROCK*. En la segunda etapa, las células terminan de adquirir las características mesenquimales, y dejan de lado los requerimientos de las CMP.

- Un suplemento de cultivo de CMP conocido comercialmente como B27 (Life Tehcnologies, USA).
- *Coating* del plato de cultivo con una matriz extracelular llamada Geltrex (Life Technologies, USA). Se probaron diferentes *coatings* para el protocolo, incluyendo gelatina bovina, concentrados de matrices extracelulares (Matrigel (BD, USA) o Geltrex). La gelatina no mostró ser de utilidad ya que se observó que las mismas no sobrevivían, como ha sido demostrado previamente (C Xu et al., 2001). En cambio, el Matrigel y el Geltrex demostraron ser aptos para la adherencia y la supervivencia inicial de las CMP. Por cuestiones de disponibilidad y de facilidad de manejo, se eligió al Geltrex como el compuesto a utilizar.

Luego de repetidos intentos, se desarrolló un protocolo el cual se compone de una primera etapa, que por la experiencia desarrollada requiere aproximadamente 14 días, los cuales se basaron en la evidencia de la necesidad de los requerimientos de cultivo. Posteriormente a estos días de diferenciación, las células fueron mantenidas de manera habitual como si fueran CMM adultas o fibroblastos.

Los experimentos preliminares llevaron al desarrollo del protocolo como se muestra en la figura 16. La puesta a punto de este protocolo presentó los inconvenientes que llevaron a la definición de los suplementos empleados para que sea viable. El análisis de los cambios morfológicos al microscopio demostró una progresión en el incremento del citoplasma. Las células indiferenciadas típicamente presentan una relación citoplasma/núcleo baja, pero se incrementó con la diferenciación. Se puede observar este cambio, que sucede inmediatamente en los primeros días de diferenciación, cuando las células son expuestas al medio suplementado con LP. Con el paso de los días, las células tomaron una forma más alargada, más similar a las células mesenquimales. Además, las células comenzaron a separarse unas de otras, lo que se interpreta como secundario a la caída de la expresión de las uniones intercelulares. A medida que pasaron los días de diferenciación, las células fueron adquiriendo la morfología típica de las células mesenquimales. A 28 días de diferenciación, las células llegaron a conformar una monocapa de células. Es de destacar que este protocolo necesitó de pasajes frecuentes, ya que la velocidad de crecimiento de las células hizo que las mismas alcanzaran rápidamente la confluencia.

4.4. Caracterización del fenotipo de las células mesenquimales diferenciadas

Luego del proceso extenso de diferenciación descrito en la sección anterior se caracterizó el fenotipo de las células diferenciadas. Para tal fin se realizó un análisis extenso de los marcadores de superficie expresados por estas células.

Las células fueron diferenciadas utilizando el suplemento con lisado de plaquetas por 28 días, punto en el cual se realizó la marcación para receptores en la membrana celular. Para caracterizar la población, se eligieron antígenos de superficie que representen los siguientes grupos.

4.4.1. Marcadores de superficie de células madre mesenquimales

Se realizó un análisis de los marcadores que han sido descritos en la superficie de las CMM. En la figura 17 se puede observar un panel representativo de la expresión de estos marcadores en las CMM-DP generadas según el protocolo desarrollado. El análisis de las células se realizó luego de 28 días de diferenciación muestra la alta expresión de los marcadores típicos de células madre mesenquimales, incluyendo a CD90, CD73, CD105, CD166 y CD44. Otros marcadores descritos en las CMM son algunos receptores de integrinas. Se observó que las CMM-DP expresan altamente los receptores CD29, CD49a, CD49d, CD49e, CD49f y CD51/61. Otros marcadores típicos de CMM como CD271 y CD172a son expresados por esta población, pero en menor intensidad. Finalmente, los marcadores descritos en la literatura para CMM SSEA-3 y Stro-1 fueron negativos en esta población.

4.4.2. Marcadores de superficie de células madre hematopoyéticas

A continuación se analizó la presencia de marcadores de superficie de la serie hematopoyética en las CMM-DP, a fin de determinar que las CMM no se encontraran contaminadas con otros tipos celulares. Se realizó entonces la inmunomarcación para marcadores hematopoyéticos: CD45 (antígeno común leucocitario), CD14 (presente en monocitos), CD79a (presente en linfocitos B), CD34 (presente en células madre hematopoyéticas y células endoteliales), CD19 (presente en linfocitos pre-B y B), CD11b-Mac1 (presente en células mononucleares y polimorfonucleares), CD133 (presente en células madre hematopoyéticas, aunque también en las CMP), la integrina $\beta 7$ (presente en linfocitos T), HLA-R (presente en células presentadoras de antígenos) y CXCR4 (receptor de quemoquinas presente en algunas células hematopoyéticas tales como los linfocitos). La figura 18 muestra un panel representativo de estos marcadores. Como se observa, todos estos marcadores fueron negativos.

4.4.3. Marcadores de superficie de células endoteliales

Posteriormente se realizó una marcación para antígenos de superficie de células endoteliales. Se utilizaron anticuerpos para CD309 (KDR), CD146, y CD144 (VE-Caderina). En todos los casos la marcación fue negativa (figura 19). Cabe aclarar que CD309 (VEGFR-2) también se encuentra expresado en células madre pluripotentes.

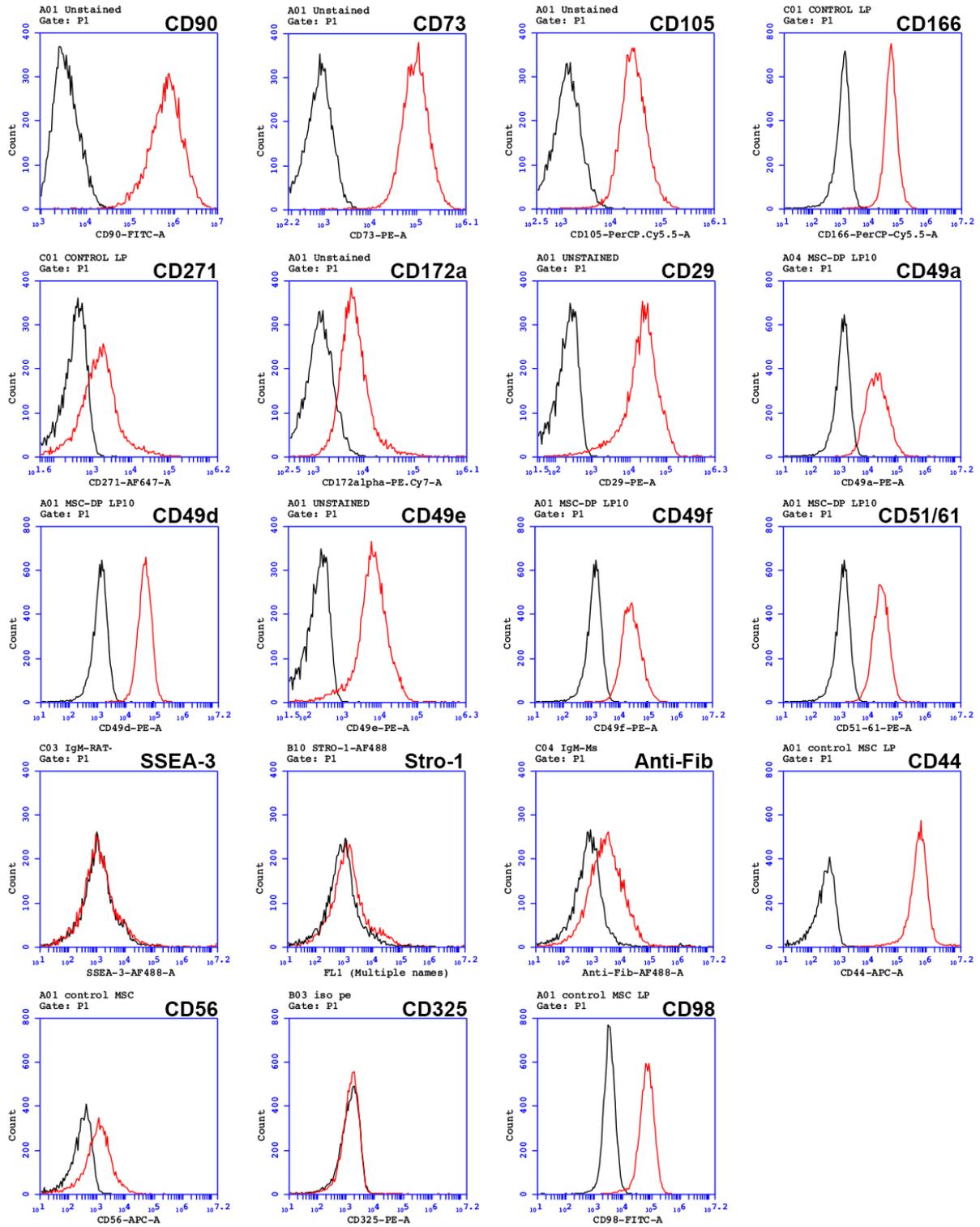


FIGURA 17: Análisis de la expresión de marcadores de células madre mesenquimales de las CMM-DP generadas. La citometría de flujo muestra que los marcadores clásicos de células madre mesenquimales se encuentran expresados en las células generadas. Algunos de ellos sin embargo, tales como SSEA-3 y Stro-1, no fueron detectados.

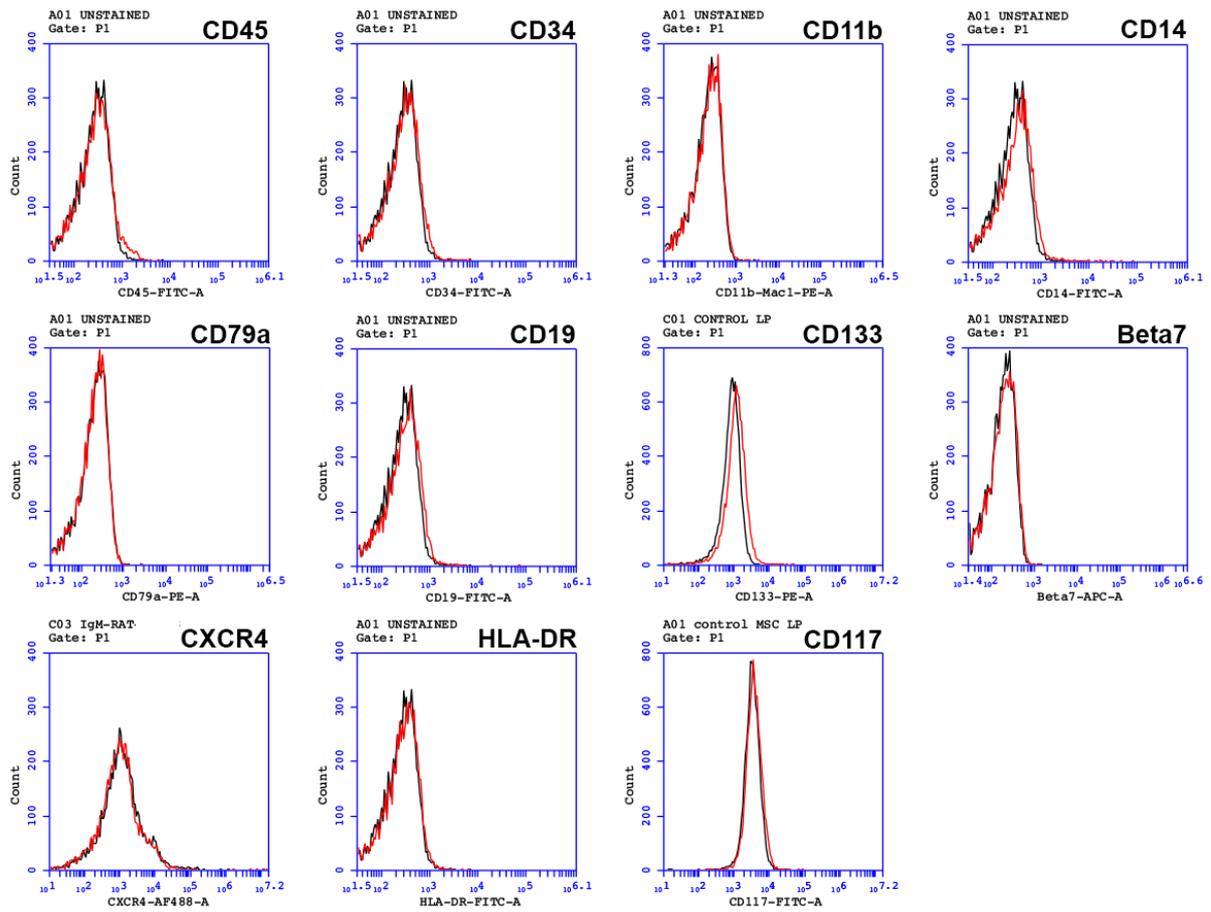


FIGURA 18: Análisis de la expresión de marcadores de células hematopoyéticas de las CMM-DP generadas. Ninguno de los marcadores hematopoyéticos analizados son expresados por las CMM-DP.

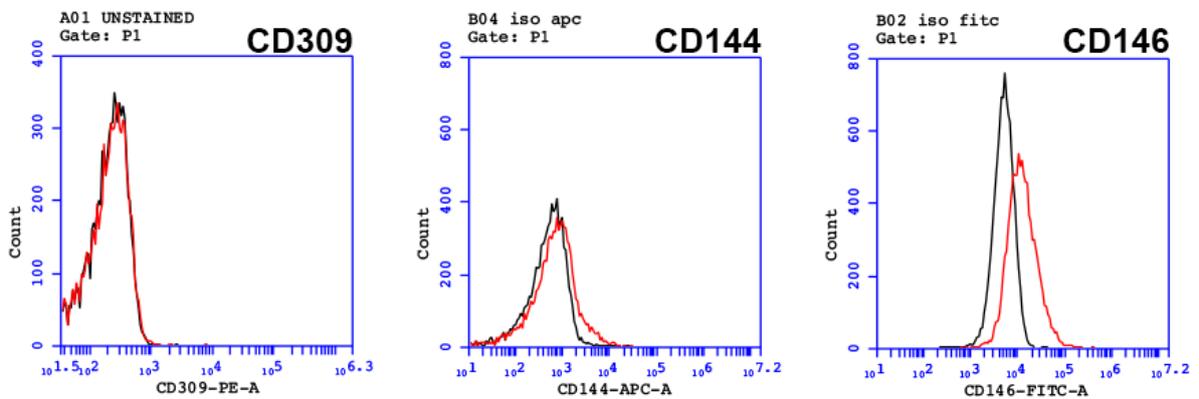


FIGURA 19: Análisis de la expresión de marcadores de células endoteliales de las CMM-DP generadas. El análisis de estos marcadores muestra que no presentan un fenotipo endotelial, aunque presentan una ligera expresión de CD146.

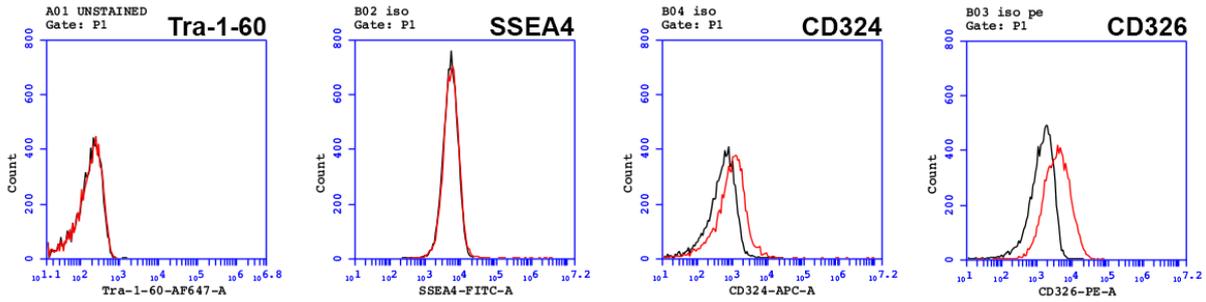


FIGURA 20: Análisis de la expresión de marcadores de células madre pluripotentes de las CMM-DP generadas. Las CMM-DP no presentan expresión de marcadores de células madre pluripotentes, aunque presentan una ligera expresión de CD326.

4.4.4. Marcadores de superficie de células madre pluripotentes

Finalmente, se realizaron tinciones para SSEA-4, Tra-1-60, ambos específicos de células pluripotentes y una tinción para e-Cadherina (CD324) y EpCAM (CD326), ambos marcadores no específicos de células pluripotentes pero presentes en estas células en su estado indiferenciado. En todos los casos se observó una ausencia de estos marcadores, evidenciando la completa diferenciación hacia un fenotipo mesenquimal (figura 20).

4.5. Análisis comparativo de las diferentes poblaciones celulares

Las CMM-DP se originan a partir de las CMP. Los rasgos fenotípicos entre estas células son necesariamente diferentes. Además, algunas de las CMP fueron originadas a partir de fibroblastos, los cuales son de origen mesenquimal. Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos para determinar similitudes y diferencias entre las diferentes poblaciones celulares. Por lo tanto, se realizaron diferentes ensayos para determinar el fenotipo de las CMM-DP. Para estos experimentos, la diferenciación de las CMM-DP se llevó a cabo con medio suplementado de dos maneras diferentes: con LP10 % o con SFB 10 %. Estos ensayos incluyeron análisis de expresión génica, análisis de marcadores de superficie, y análisis de la metilación del promotor de Oct-4.

4.5.1. Expresión de genes asociados a células madre mesenquimales

En primer lugar, se analizó la expresión de genes asociados a células mesenquimales. Estas células típicamente son productoras de componentes de la matriz extracelular, por lo que se analizó la expresión de fibronectina, laminina B1 y colágeno IV. Además, es característico de estas células expresar la proteína del citoesqueleto vimentina. La expresión de estos marcadores en CMM-DP generadas en LP se comparó con otras células, incluyendo a fibroblastos primarios de prepucio, células pluripotentes (CMPi), CMM-DP generadas en suero fetal bovino, y CMM derivadas de cordón umbilical. Los resultados fueron relativizados al valor hallado en las CMP.

Como se puede observar en la figura 21, el perfil de expresión de genes analizados difiere notablemente entre los grupos. En todos los casos, la expresión de los marcadores mesenquimales fue mucho mayor en los derivados mesenquimales que en las células madre pluripotentes. Estas últimas, en base a lo hallado, no tienen una expresión marcada de genes relacionados con

proteínas de la matriz extracelular. En cambio, todos los grupos mesenquimales presentan una alta expresión de estos marcadores, particularmente los fibroblastos. Finalmente, la vimentina, marcador citoesquelético de las células mesenquimales, se encuentra significativamente expresado en todo el linaje mesenquimal en comparación con las CMP. Además de las diferencias entre las CMP y el resto de las poblaciones celulares, es de notar que los niveles de expresión de genes entre las células de origen mesenquimal son más similares entre sí que con los fibroblastos.

4.5.2. Marcadores de superficie celular

De la misma forma que se analizó la expresión de genes relacionados con células mesenquimales, se realizó un análisis de marcadores de superficie en los mismos tipos celulares. Se estudiaron los mismos fenotipos, incluyendo las CMM-DP derivadas en lisado de plaquetas, las CMM-DP derivadas en suero fetal bovino, fibroblastos, CMM-CU y células madre pluripotentes.

Para el análisis de los marcadores de superficie se divide a los mismos en tres paneles. En el primero, se incluyeron anticuerpos contra antígenos conocidos por ser expresados en células mesenquimales tales como CD90, CD73, CD105, CD166, CD172a, y CD271 (figura 22). Como resultado se encontró que todas las células mesenquimales (CMM-DP derivadas en plaquetas y en suero fetal bovino, y células madre mesenquimales de cordón umbilical) expresaron estos marcadores. En las células madre pluripotentes, el marcador CD90 se encontró altamente expresado, tal como en las células mesenquimales. El marcador CD271 también se encuentra expresado levemente en células pluripotentes, pero no difiere de la expresión en CMM. Este conjunto de marcadores nos manifiesta la identidad diferente de las CMM de las células pluripotentes, así como también cierta similitud en la expresión de marcadores de superficie entre las células mesenquimales.

En el segundo panel se estudió la expresión de diferentes integrinas en la superficie de las células (figura 23). Este análisis reveló que las células mesenquimales, en su conjunto, expresan las diferentes formas de integrinas; sin embargo, las células madre pluripotentes expresan algunas de las integrinas, pero no expresan CD49a, CD49d y CD51-61.

Finalmente, en el último panel se incluyeron aquellos marcadores de superficie que han sido previamente identificados en células pluripotentes (figura 24). En todos los casos, estos marcadores fueron positivos en las células pluripotentes y negativos en las células mesenquimales de diferentes orígenes. Algunos de estos marcadores son exclusivos de células pluripotentes (Tra-1-60 y SSEA-4); CD133, molécula de superficie característica de células madre hematopoyéticas pero que ha sido descrita en células madre pluripotentes (e-cadherina) presente en las células epiteliales, y finalmente CD309 (KDR), el cual también ha sido reportado en células madre pluripotentes.

El cuadro 4 resume los hallazgos realizados en diferentes células pluripotentes. Como puede observarse, existe una clara distinción entre los marcadores de superficie presente en las células madre pluripotentes y las células madre mesenquimales, sean ellas derivadas de pluripotentes o de cordón umbilical. Además, los fibroblastos presentan una expresión muy similar a las de las diferentes células mesenquimales. Estos fibroblastos, vale destacar, son los utilizados para generar las mismas células madre pluripotentes inducidas.

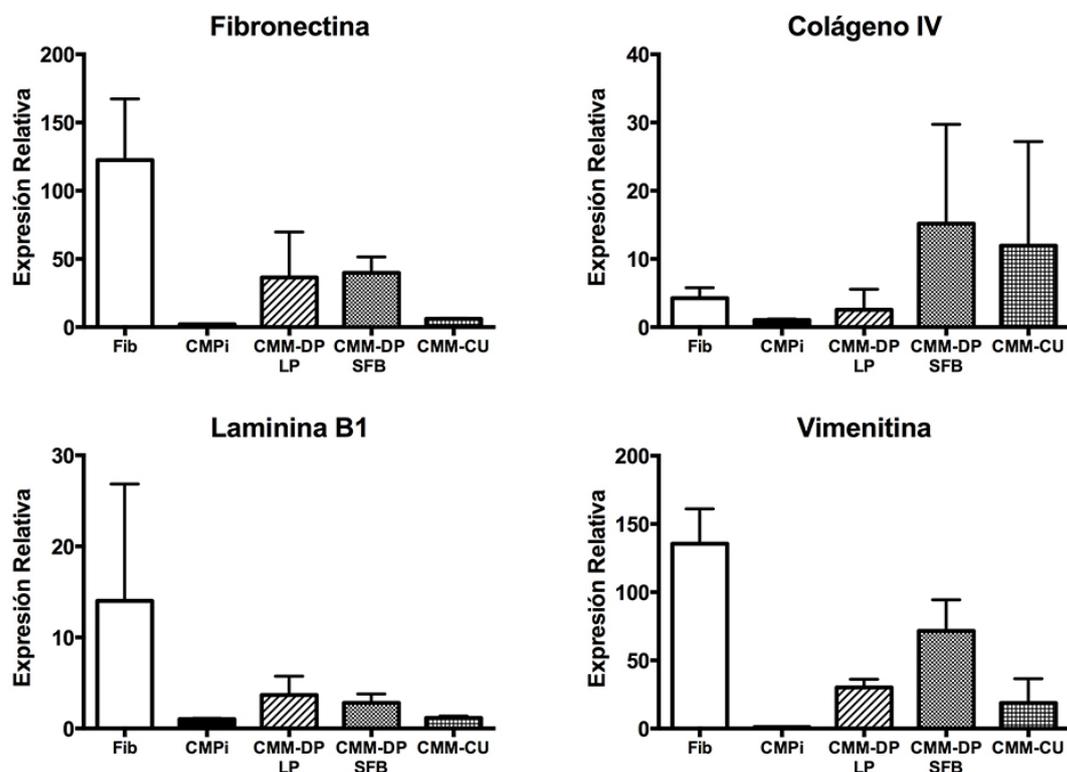


FIGURA 21: Análisis comparativo por qPCR de la expresión de genes relacionados con células mesenquimales en diferentes poblaciones celulares. Se realizó un análisis de la expresión de genes de matriz extracelular (firbonectina, colágeno, y laminina) y de la proteína mesenquimal del citoesqueleto vimentina. La relativización se realizó con las CMP. Como se observa, todos los fenotipos mesenquimales presentan una mayor expresión, más marcada en los fibroblastos. Entre las células mesenquimales, no presentan diferencias en general, pero se observa a una mayor expresión en fibroblastos de alguno de los genes analizados. Todos los valores están normalizados a 1, correspondiendo al grupo CMPi; para Fibronectina, los valores relativos de expresión fue de 122.5 ± 45 en fibroblastos, para $CMP-DP_{LP}$ 36.3 ± 33 ; para $CMP-DP_{SFB}$ 39.7 ± 12 , y para $CMM-CU$ 6.1 ± 0.3 ; para Colágeno IV fue de 4.2 ± 1.5 en fibroblastos, para $CMP-DP_{LP}$ 2.6 ± 3 ; para $CMP-DP_{SFB}$ 15.1 ± 14.5 , y para $CMM-CU$ 11.9 ± 15.2 ; para laminina B1 14 ± 13 en fibroblastos, para $CMP-DP_{LP}$ 3.7 ± 2 ; para $CMP-DP_{SFB}$ 2.8 ± 0.9 , y para $CMM-CU$ 1.15 ± 0.2 ; para Vimentina 135.5 ± 26 en fibroblastos, para $CMP-DP_{LP}$ 30.1 ± 6 ; para $CMP-DP_{SFB}$ 71.6 ± 23 , y para $CMM-CU$ 18.7 ± 18 . Los valores expresan media \pm desvío estándar

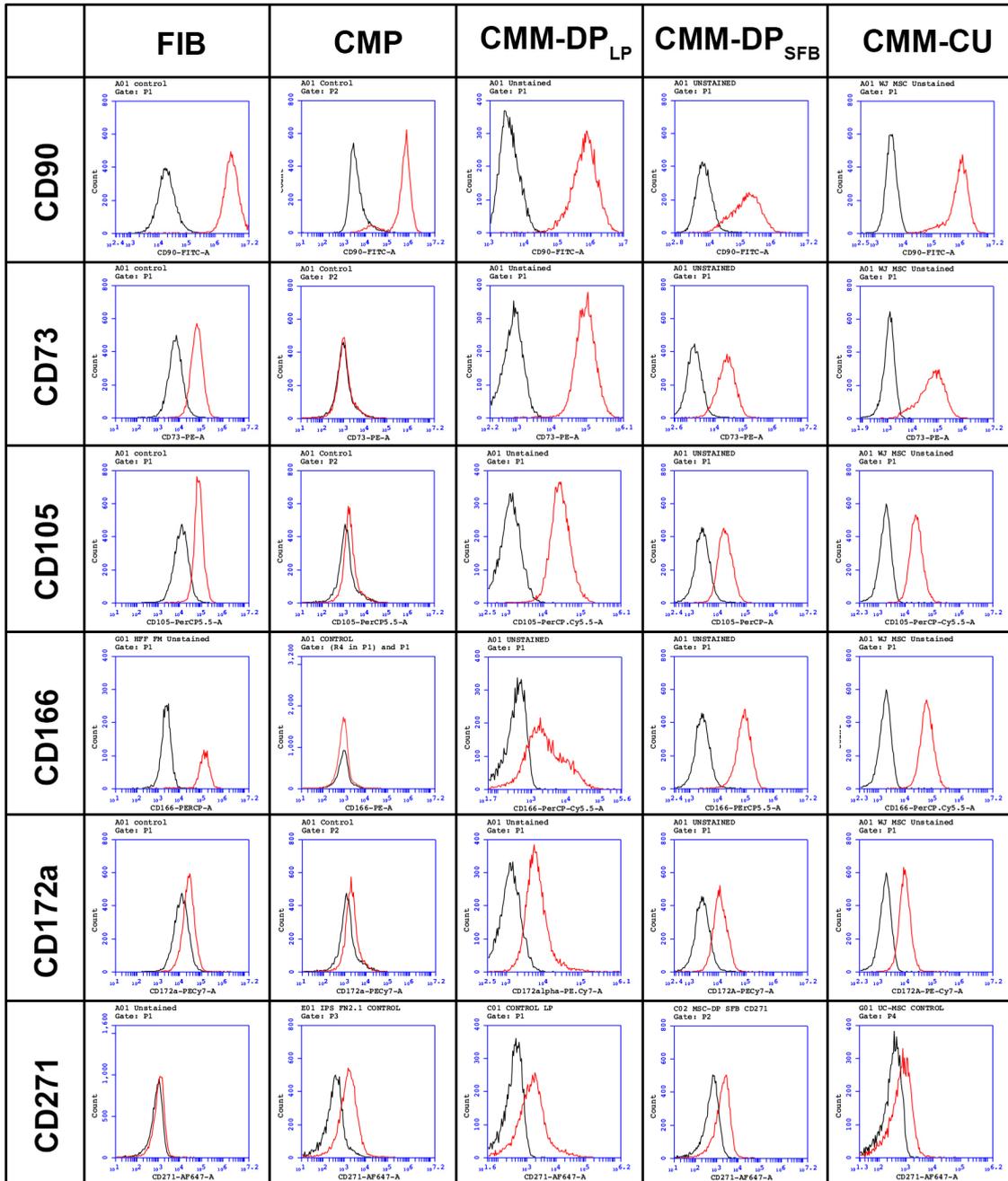


FIGURA 22: Análisis por citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie mesenquimales en diferentes poblaciones celulares. El análisis de la expresión de los marcadores mesenquimales demuestra la similitud entre los fibroblastos, las CMM-DP (derivadas en lisado de plaquetas o en suero fetal bovino) y las CMM-CU.

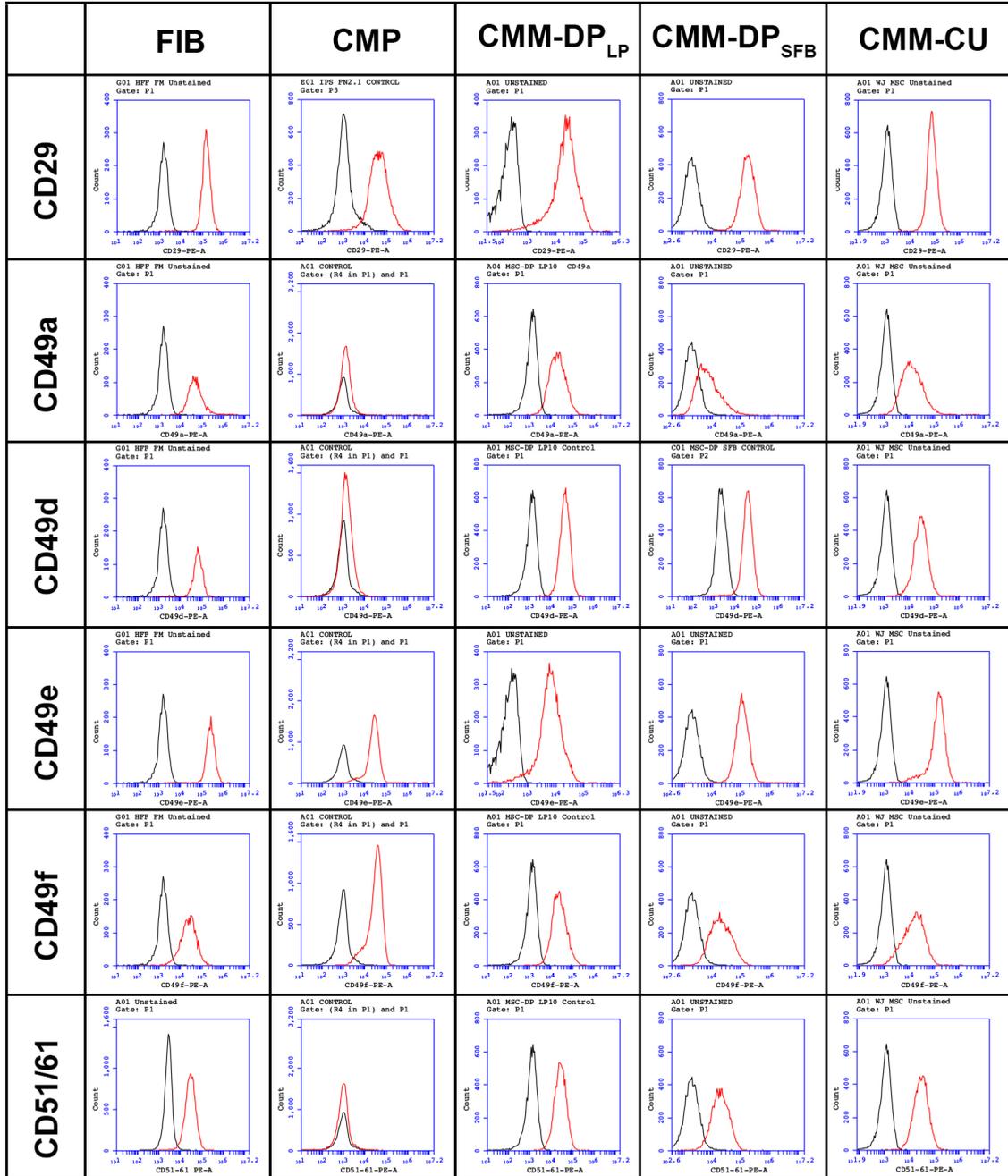


FIGURA 23: Análisis por citometría de flujo de la expresión de integrinas en diferentes poblaciones celulares. Nuevamente, la expresión de las integrinas en las células con un fenotipo mesenquimal es similar, con algunas diferencias marcadas (CD49a, CD49d y CD51/61) en las CMP.

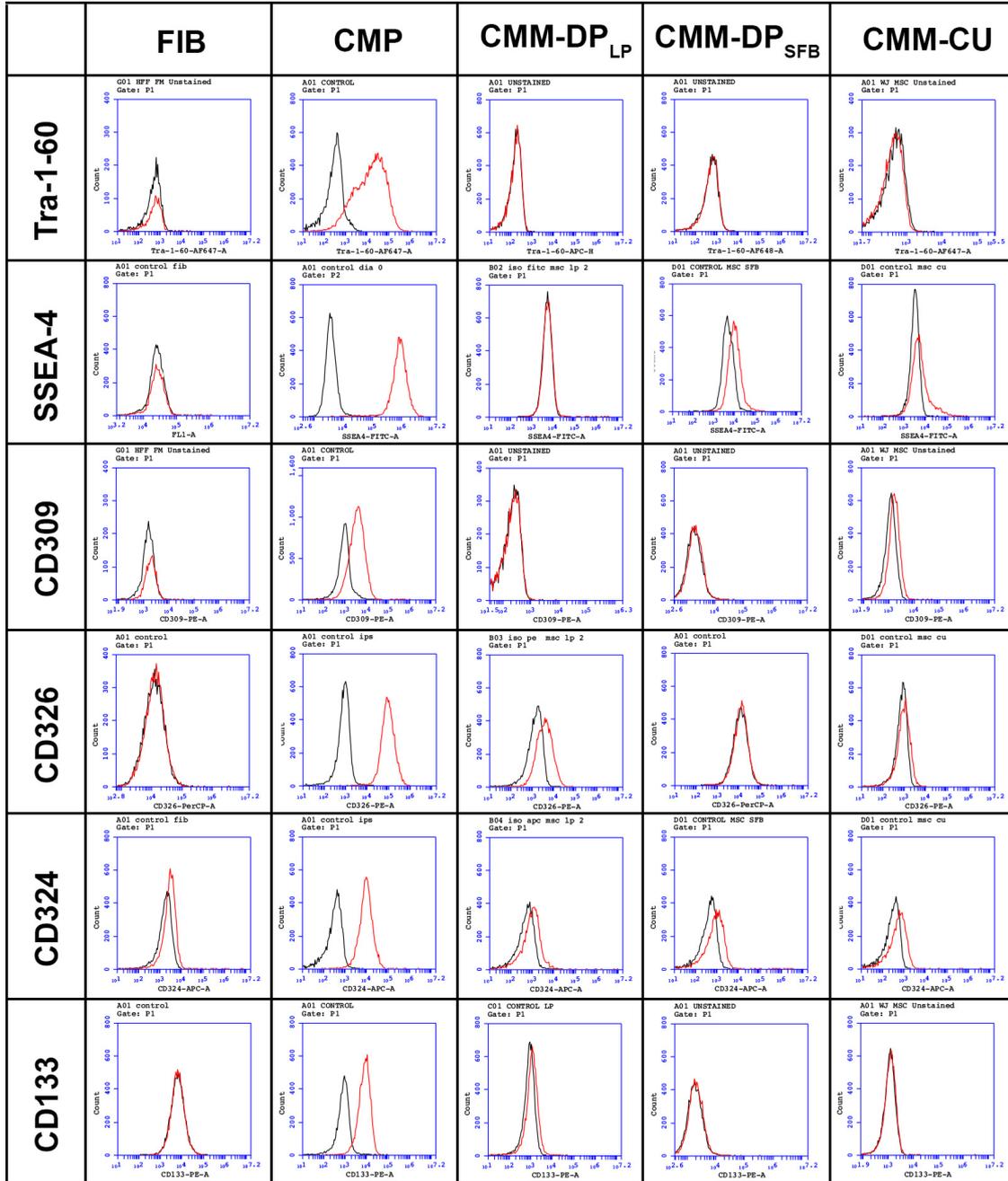


FIGURA 24: Análisis por citometría de flujo de la expresión de marcadores de pluripotencia en diferentes poblaciones celulares. Los marcadores de células madre pluripotentes sólo son expresado en las CMP.

CUADRO 4: Valoración semi-cuantitativa de la expresión de los diferentes marcadores de superficie en las diferentes poblaciones celulares analizadas.

Grupo	Marcador	Fibroblastos	CMP	CMM-DP _{LP}	CMM-DP _{sfb}	CMM-CU
Mesenquimal	CD90	+++	+++	+++	+++	+++
Mesenquimal	CD73	+++	-	+++	+++	+++
Mesenquimal	CD105	+++	-	+++	+++	+++
Mesenquimal	CD166	+++	-	+++	+++	+++
Mesenquimal	CD172a/b	+++	-	+++	+++	+++
Mesenquimal	CD271	+++	+	+++	+++	+++
Integrina	CD29	+++	+++	+++	+++	+++
Integrina	CD49a	+++	-	+++	+++	+++
Integrina	CD49d	+++	-	+++	+++	+++
Integrina	CD49e	+++	+++	+++	+++	+++
Integrina	CD49f	+++	+++	+++	+++	+++
Integrina	CD51/61	+++	-	+++	+++	+++
Pluripotente	Tra-1-60	-	+++	-	-	-
Pluripotente	SSEA-4	-	+++	-	-	-
Pluripotente	CD309	-	++	-	-	-
Pluripotente	CD133	-	+++	-	-	-
Pluripotente	CD325	-	++	-	-	-

4.5.3. Metilación del promotor de Oct-4

Oct-4 es un gen regulador maestro de la pluripotencia. Su regulación epigenética, por lo tanto, es una manera habitual de evidenciar el estado de pluripotencia de la célula analizada. En este experimento se buscó entonces evidenciar las modificaciones en el grado de metilación de las islas CpG de la región promotora del gen y correlacionar este hallazgo con el fenotipo celular. Se identificaron siete regiones con alto contenido de islas CpG (Freberg et al., 2007), y las mismas fueron analizadas en su grado de metilación. Para cada isla CpG se promedió el porcentaje de demetilación. Como se observa en la figura 25, las líneas mesenquimales analizadas muestran un porcentaje medio de demetilación mucho menor (alrededor del 30 %) en comparación al porcentaje presente en las células pluripotentes (alrededor del 70 %). Además, se observa una gran similitud en el porcentaje de demetilación entre todas las líneas mesenquimales analizadas, expresión de la regulación epigenética negativa de este gen en estas células.

4.6. Crecimiento de las células madres mesenquimales derivadas de pluripotentes

Para determinar el grado de crecimiento celular durante la diferenciación, llevamos adelante ensayos de diferenciación de CMP a CMM-DP comparando los efectos de utilizar LP en comparación con SFB. Partiendo de un número inicial de 150,000 células pluripotentes por grupo, las células comenzaron la diferenciación en forma paralela. Como se puede observar en la figura 26, los grupos comenzaron la diferenciación en forma aproximadamente similar, pero con el correr de los pasajes y la diferenciación, el número de células totales fue significativamente mayor cuando las células fueron cultivadas con DMEM con suplemento de LP 10 %. Es de notar que la curva de crecimiento parece separarse luego de 7 a 10 días de la diferenciación. Es posible que el efecto preferencial del LP sobre la tasa de crecimiento celular sea particularmente a partir de la adquisición de las características mesenquimales. Por lo tanto, en nuestro sistema de diferenciación encontramos evidencias similares a las observadas previamente con el uso de LP como suplemento de cultivo,

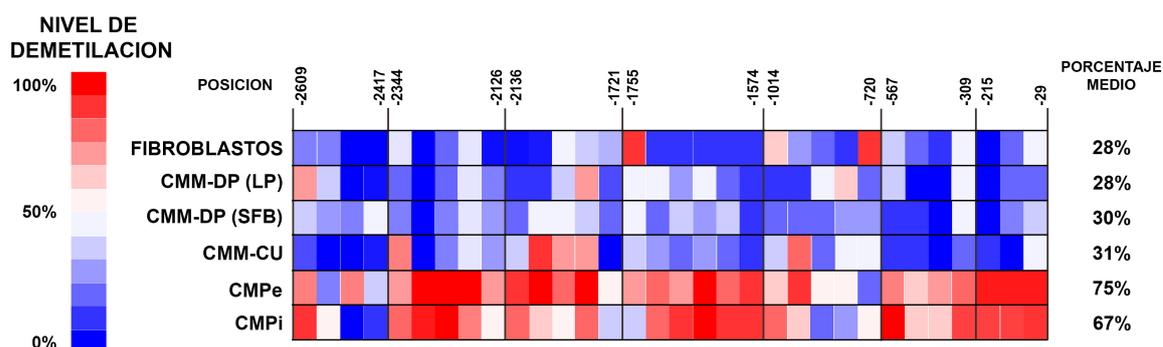


FIGURA 25: Análisis del estado de metilación/demetilación de la zona promotora del gen *Oct-4*. El análisis de las distintas islas CpG en el promotor del gen *Oct-4* muestra un grado alto de demetilación en las CMP (*CMEh* y *CMPi*), que se invierte cuando las células son diferenciadas a CMM-DP (tanto en suero fetal bovino como en lisado de plaquetas), las cuales a su vez son similares a las células mesenquimales analizadas (*fibroblastos* y *CMM-CU*).

en las cuales se describe un aumento de la proliferación celular probablemente debido a la gran cantidad de factores de crecimiento estimulantes.

4.7. Evidencias y dinámica de la transición epitelio-mesenquimal en la diferenciación de las células madre pluripotentes

La demostración de la formación de células madre mesenquimales a partir de las células madre pluripotentes necesita un tiempo de maduración significativo en nuestra experiencia y en otros protocolos publicados. Si se considera que las neuronas y los cardiomiocitos necesitan entre 7 y 10 días para generarse en protocolos de diferenciación, llama la atención que lograr estas células mesenquimales demore al menos unas tres semanas. Para confirmar esta observación y estudiar la dinámica de la diferenciación, se decidió realizar diferentes experimentos para estudiar la transición epitelio-mesenquimal y la maduración de las CMP en células mesenquimales.

4.7.1. Evaluación dinámica por qPCR de la caída de la expresión de los genes de pluripotencia

En primer lugar, se analizaron por medio de qPCR la expresión de dos genes de pluripotencia, *Oct-4* y *Nanog*, ambos factores de transcripción determinantes en mantener las CMP en estado indiferenciado. Los genes fueron medidos sucesivamente durante la diferenciación a CMM-DP. Como se observa en la figura 27, existe una disminución progresiva en la expresión de ambos factores de transcripción. En ambos casos, la expresión disminuyó a valores mínimos luego de 3 semanas de diferenciación en medio suplementado con lisado de plaquetas.

Cuantificación de Células Totales

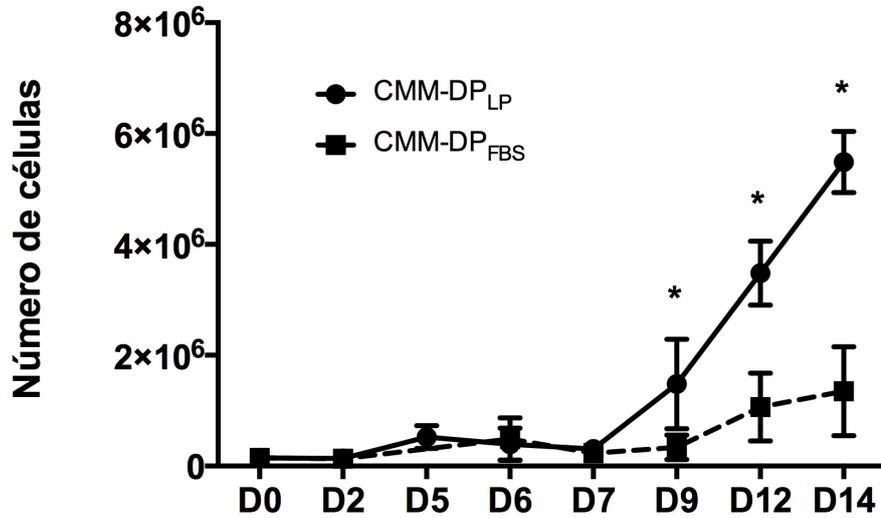


FIGURA 26: Evaluación de la proliferación celular por medio de la cuantificación del número de células totales. El lisado de plaquetas presenta un efecto positivo sobre la proliferación celular durante la diferenciación de las CMP a CMM-DP (CMM-DP_{LP}), en comparación con las células derivadas en SFB (CMM-DP_{SFB}). Este efecto se pone en evidencia a partir del día 9 de la diferenciación, lo que podría deberse a un efecto positivo sobre las células que ya adquieren un fenotipo mesenquimal. Los siguientes fueron los valores encontrados, expresados en millones de células \pm desvío estándar. El punto 0 corresponde a 0.15×10^6 . Para CMM-DP_{LP}, D2: $0.14 \times 10^6 \pm 0.04$; D5: $0.52 \times 10^6 \pm 0.21$; D6: $0.4 \times 10^6 \pm 0.29$; D7: $0.31 \times 10^6 \pm 0.11$; D9: $1.5 \times 10^6 \pm 0.81$; D12: $3.5 \times 10^6 \pm 0.58$; D14: $5.5 \times 10^6 \pm 0.56$. Para CMM-DP_{SFB}, D2: $0.13 \times 10^6 \pm 0.28$; D6: $0.49 \times 10^6 \pm 0.38$; D7: $0.23 \times 10^6 \pm 0.11$; D9: $0.34 \times 10^6 \pm 0.22$; D12: $1.1 \times 10^6 \pm 0.61$; D14: $1.35 \times 10^6 \pm 0.8$.

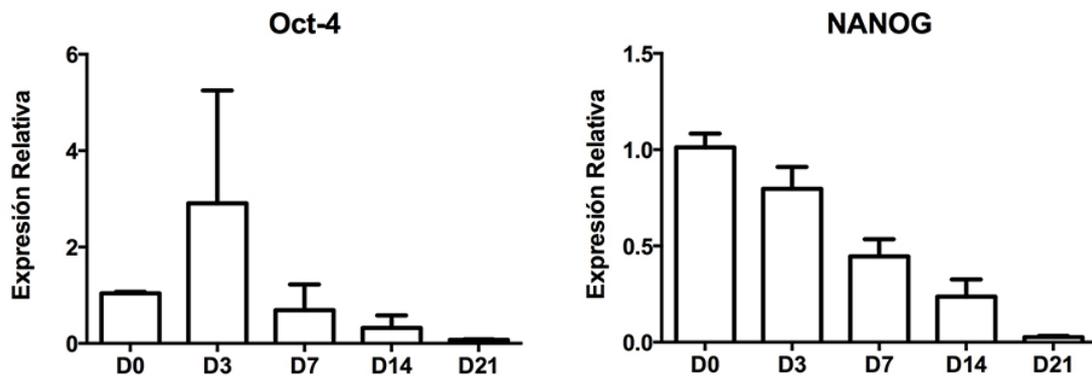


FIGURA 27: Análisis por qPCR de la expresión de genes de pluripotencia a lo largo de la diferenciación. Los genes de pluripotencia Oct-4 y Nanog disminuyen en su expresión a lo largo del protocolo de diferenciación de CM a CMM-DP. Lo valores se normalizaron al Día 0. Para Oct-4, el análisis arrojó los siguientes valores: Día 3: 2.9 ± 3.3 ; Día 7: 0.69 ± 0.75 ; Día 14: 0.32 ± 0.36 ; Día 21 0.07 ± 0.01 . Para Nanog se observaron los siguientes resultados: Día 3: 0.79 ± 0.28 ; Día 7: 0.45 ± 0.21 ; Día 14: 0.23 ± 0.22 ; Día 21 0.03 ± 0.02 . Los resultados se expresan en media \pm desvío estándar.

4.7.2. Evaluación dinámica por qPCR de la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesenquimal

Posteriormente, para determinar la transición epitelio-mesenquimal y en paralelo a la disminución en la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia, se analizó la expresión de genes relacionados con la TEM. En primer lugar, se midieron dos marcadores clásicos de la TEM, *Zeb-2* y *Snai2*. Ambos factores de transcripción han sido extensamente relacionados con este proceso, particularmente en células neoplásicas. Como se observa en la figura 28, en ambos casos la expresión aumenta progresivamente hasta el día 21 de la diferenciación. Además de estos marcadores, se realizó la medición de *T/Brachyury*, un gen relacionado con la morfogénesis temprana del mesodermo. Típicamente, durante la diferenciación a mesodermo este gen aumenta, regulando los primeros pasos de este proceso, pero posteriormente disminuye. Como se puede observar en la figura 28, en nuestro modelo de diferenciación la expresión de *T/Brachyury* se comportó de esa manera, con un marcado aumento en la expresión y disminución posterior. Finalmente, se realizó la medición de vimentina, una proteína del citoesqueleto típica de las células de estirpe mesenquimal, y frecuentemente medida para determinar la TEM. Como se ve en la figura, la expresión de vimentina aumentó dramáticamente con los días de diferenciación, y particularmente en forma tardía como expresión de diferenciación terminal.

4.7.3. Evaluación dinámica por citometría de flujo de los marcadores de superficie relacionados con la transición epitelio-mesenquimal

La transición epitelio-mesenquimal puede ser evaluada por cambios característicos en la expresión de marcadores de membrana. Particularmente en la literatura de células tumorales, la TEM se caracteriza por una disminución de e-cadherina y un aumento en la expresión de n-cadherina. Por lo tanto, se realizó una tinción para estos marcadores en diferentes puntos a lo largo de la diferenciación y se realizó una evaluación por citometría de flujo (figura 29). Como puede observarse, la expresión de e-cadherina cayó levemente, y la expresión de n-cadherina aumentó en forma más marcada. Estos datos confirman por medio de marcadores clásicos la presencia de TEM en este modelo.

4.7.4. Evaluación dinámica por citometría de flujo de los marcadores de superficie de células madre mesenquimales

La caracterización de las CMM-DP generadas y de las CMP mostró diferencias en la expresión de los marcadores de superficie, en muchos casos en aquellos marcadores relacionados con las células madre mesenquimales. Como pudimos observar en experimentos anteriores, el desarrollo final de las CMM-DP lleva cierto tiempo. Para determinar fehacientemente cuál es este tiempo se realizó una medición de la aparición de los marcadores de superficie relacionados con las CMM (figura 30). Se realizaron varias marcaciones, eligiendo los antígenos de superficie de acuerdo a los datos recogidos previamente en la expresión en las CMP y CMM-DP y a la disponibilidad de anticuerpos conjugados con diferentes fluoróscoros para realizar citometría de flujo a varios colores. Los resultados muestran que a lo largo del tiempo las células pierden los marcadores de superficie de células pluripotentes y ganan los marcadores de células mesenquimales. Así,

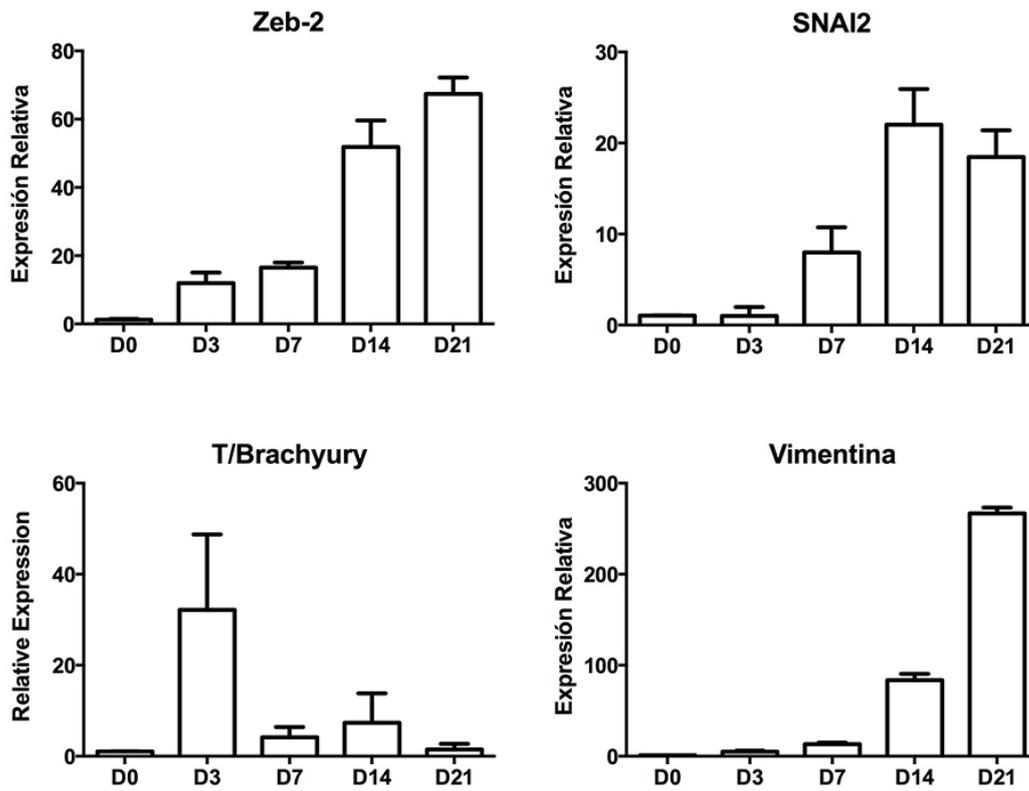


FIGURA 28: Análisis por qPCR de la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesenquimal. Se realizó un análisis de genes relacionados con la diferenciación a mesodermo. Zeb-2 y SNAI2, dos genes involucrados con la transición epitelio-mesenquimal, presentan un incremento paulatino en su expresión. T/Brachyury, un factor de transcripción crítico en las etapas tempranas de la formación de mesodermo, presenta un aumento temprano y luego disminuye. Este patrón es el que se describe clásicamente para este factor. Finalmente, vimentina, una proteína del citoesqueleto de las células mesenquimales, presenta un progresivo aumento en su expresión hasta la diferenciación. Los valores se normalizaron con respecto al Día 0. Los análisis de Zeb-2 arrojaron los siguientes valores: Día 3: 12 ± 6.9 ; Día 7: 16.4 ± 3.6 ; Día 14: 51.8 ± 19.1 ; Día 21 67.3 ± 10.8 . Para SNAI2 los siguientes resultados fueron registrados: Día 3: 1 ± 1.7 ; Día 7: 8 ± 4.8 ; Día 14: 22 ± 6.8 ; Día 21 18.5 ± 5.1 . Para el gen T/Brachyury se observaron los siguientes valores: Día 3: 32.1 ± 28.7 ; Día 7: 4.2 ± 3.9 ; Día 14: 7.3 ± 11.2 ; Día 21 1.5 ± 2.1 . Finalmente, para el gen Vimentina se registraron los siguientes valores: Día 3: 4.9 ± 2.1 ; Día 7: 13.3 ± 2.7 ; Día 14: 83.6 ± 11.9 ; Día 21 266.8 ± 11 . Los resultados expresan la media \pm desvío estándar

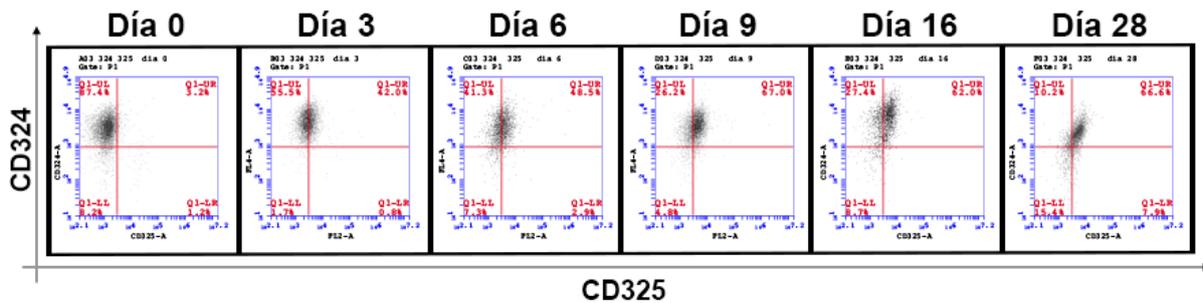


FIGURA 29: Evaluación por citometría de flujo de la expresión de CD324 y CD325 durante la diferenciación. A lo largo de la diferenciación de CMP a CMM-DP se observa una caída de la expresión de CD324 (e-cadherina) y un aumento de la expresión de CD325 (n-cadherina).

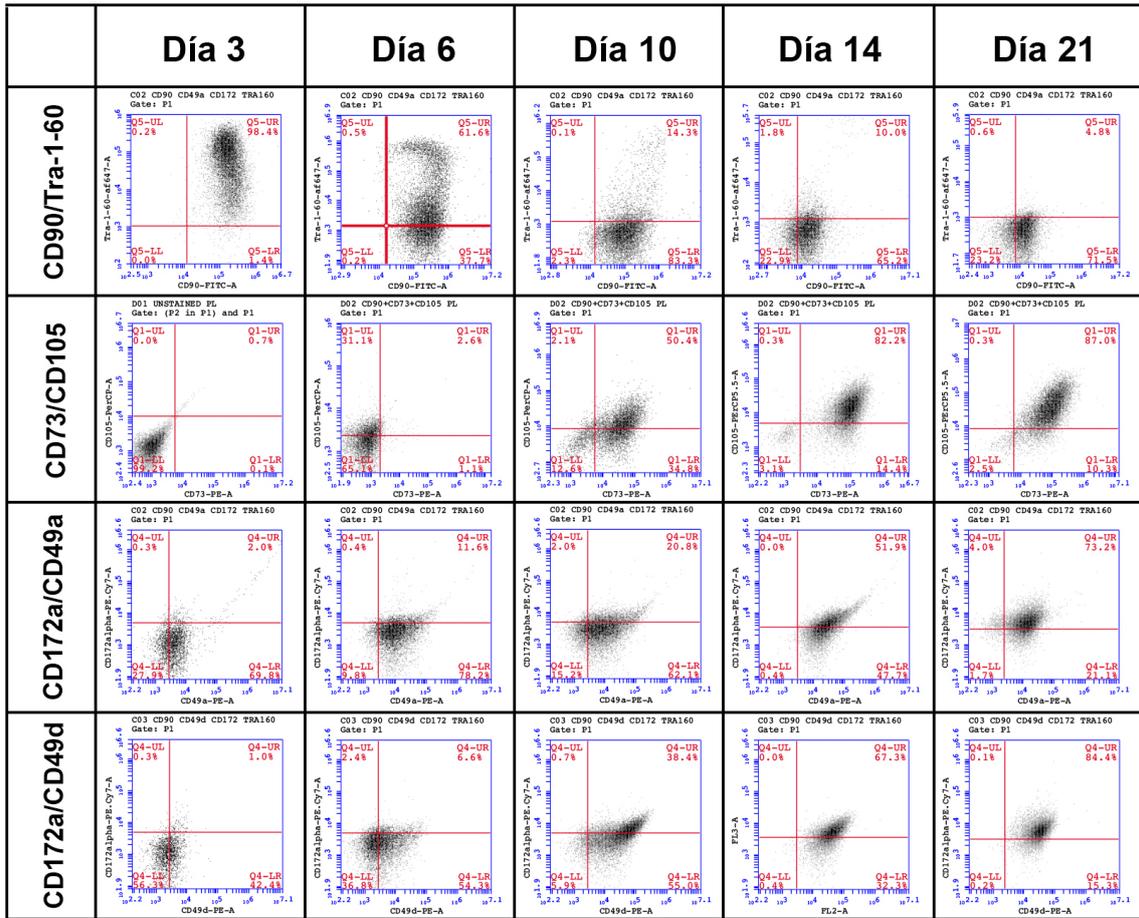


FIGURA 30: Análisis por citometría de flujo de la expresión evolutiva de diferentes marcadores de superficie. Se realizaron diferentes doble tinciones para marcadores de superficie celular y se realizó un análisis temporal de la expresión de los mismos. En la primera hilera se observa como CD90 cae ligeramente en su expresión durante la diferenciación, y Tra-1-60 se negativiza. En la segunda hilera se observa como las células se vuelven doblemente positivas para CD73 y CD105. En la tercera y cuarta fila se observa como las células se vuelven positivas para CD172a y las integrinas CD49a y CD49d.

en la primera hilera se observa la caída de la expresión del marcador Tra-1-60, mientras que el marcador CD90 cae ligeramente en su expresión, pero se mantiene positivo en los dos fenotipos. En la segunda hilera se observa como las células doblemente negativas para CD73 y CD105 (ambos marcadores de CMM) se tornan paulatinamente positivas. Aproximadamente al día 14 las células son doble positivas para este marcador, lo cual se condice con la experiencia relatada en el desarrollo del protocolo, en la cual se observó una pérdida de las características de la pluripotencia aproximadamente a este tiempo de desarrollo. Finalmente, en la tercera y cuarta hilera se observa los cambios en la expresión de dos integrinas no presentes en las CMP (CD49a y CD49d) más el marcador CD172a/b. Como se observa en la figura, nuevamente las células se vuelven doblemente positivas para los marcadores de CMM aproximadamente al día 14 de la diferenciación.

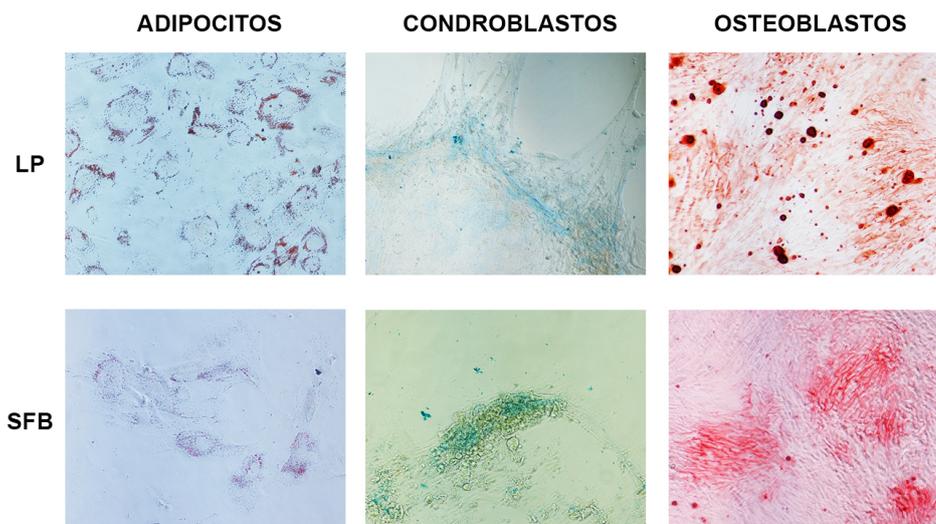


FIGURA 31: Análisis de la capacidad de diferenciación multipotente de las CMM-DP. Las CMM-DP, ya fueron crecidas en lisado de plaquetas o en suero fetal bovino, demuestran capacidad de diferenciación a adipocitos, condroblastos y osteoblastos al presentar estructuras celulares específicas de cada tejido.

4.8. Características funcionales de las células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes: Multipotencia

Las CMM han sido caracterizadas por la capacidad de diferenciarse en células de tejido conectivo, incluyendo a osteoblastos, condroblastos y adipocitos. Para determinar entonces la multipotencia de las células generadas por medio del protocolo desarrollados, se incubaron CMM-DP con medios específicos comerciales para cada uno de los tejidos (figura 31). Luego de semanas de diferenciación, se puede observar que las células mesenquimales (tanto las CMM-DP como un control realizado en CMM-CU) presentan una tinción positiva para proteínas de la matriz extracelular característicamente secretadas por condroblastos y osteoblastos, así como también se pudo detectar la presencia de gotas lipídicas intracitoplasmáticas características de los adipocitos.

4.9. Características funcionales de las células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes: Inmunomodulación

Una característica destacada de las células madre mesenquimales es la de inmunomodular la respuesta inmunológica. Esta propiedad ha sido extensamente estudiada en las CMM adultas, y es actualmente el sustento para muchos ensayos clínicos que se están realizando con estas células. Para evaluar si las CMM-DP reproducían esta característica, se desarrolló un protocolo de evaluación de la capacidad de inmunomodulación.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) que contienen la fracción linfocitaria de las células hematopoyéticas. Se realizó una estimulación con concanavalina-A por 24 horas, y posteriormente con anti-CD3. Esto produce una reacción linfocitaria intensa *in vitro*, la cual ocasiona una rápida proliferación de los mismos. Para observar la proliferación se realizó una tinción con CFSE, el cual se pierde paulatinamente con el paso de las divisiones celulares, ya que

se adhiere a las proteínas intracitoplasmáticas y se distribuyen por partes iguales entre las dos células hijas. Como se puede observar en la figura 32, la pérdida de la intensidad de fluorescencia ocasiona la aparición de sub-poblaciones con más o menos divisiones celulares.

Los resultados muestran que una vez estimulados, la fracción linfocitaria de las CMSP rápidamente se activa y prolifera. Luego de 4 días se observa que aproximadamente el 80 % de las CMSP tuvo al menos una división celular, alcanzando cuatro divisiones un 20 % de las células. La figura 33 muestra que el co-cultivo con CMM-DP resultó en una pronunciada caída en el número de divisiones celulares de la muestra. En la figura puede observarse que en el ejemplo mostrado el 55 % de las CMSP no presentaron ninguna división celular. Un fenómeno similar ocurrió cuando la inmunomodulación se realizó con CMM-DP derivadas en suero fetal bovino. En el análisis realizado no parece haber diferencias si la diferenciación fue realizada en lisado de plaquetas o en suero fetal bovino.

4.10. Hacia una teoría unificada de la diferenciación mesenquimal de las células madre pluripotentes

A lo largo de estas investigaciones fue observado que la diferenciación de las CMP en CMM-DP ocurre de manera consistente con el uso del lisado de plaquetas como suplemento de cultivo. Además, en algunos experimentos el LP fue substituido por SFB como control sin observarse cambios significativos en el resultado final de la diferenciación. En el contexto de los experimentos iniciales en busca del desarrollo del protocolo con LP, se realizaron experimentos con otros suplementos de medios de cultivo, los cuales son útiles al momento de formular nuevas hipótesis a pesar de no estar debidamente completos.

Ante la consistencia de la diferenciación tanto en LP como en SFB, se realizó una diferenciación en medios con otros suplementos definidos. En la figura 34 se observa que las CMP adquieren una morfología similar al utilizarse medios de cultivo suplementados de manera completamente diferente. Se comparó la utilización de LP, SFB y la utilización de un reemplazo biosintético de suero (*Knock-out Serum Replacement*, KSR) al 20 % suplementado o bien con un inhibidor específico de TGF- β (SB-431542) o con un combinación de factores de crecimiento (Activina-A, BMP-4) y un inhibidor de GSK-3 β (cloruro de litio). Estos suplementos de cultivo han sido ya utilizados en publicaciones previas para la derivación de CMM-DP (Mahmood et al., 2010; N.-T. Tran, Trinh, Lee, & Han, 2012; W. Chen et al., 2013). Las CMP con el correr de los días adoptan una morfología mesenquimal en todos los grupos, con separación de las uniones intercelulares y una disminución de la relación núcleo/citoplasma.

En diferentes tiempos realizamos qPCR para genes de diferenciación mesenquimal en tres de estos grupos (LP, SFB y KSR-SB). Como se puede observar en la figura 35, los resultado confirman, más allá de diferencias relativas, que en todos los grupos hay una diferenciación con adquisición de un fenotipo mesenquimal. En conclusión si bien estos experimentos son preliminares permiten esbozar la hipótesis que en la diferenciación de CMP a CMM-DP depende críticamente de otros factores que no corresponden necesariamente al suplemento del medio de cultivo.

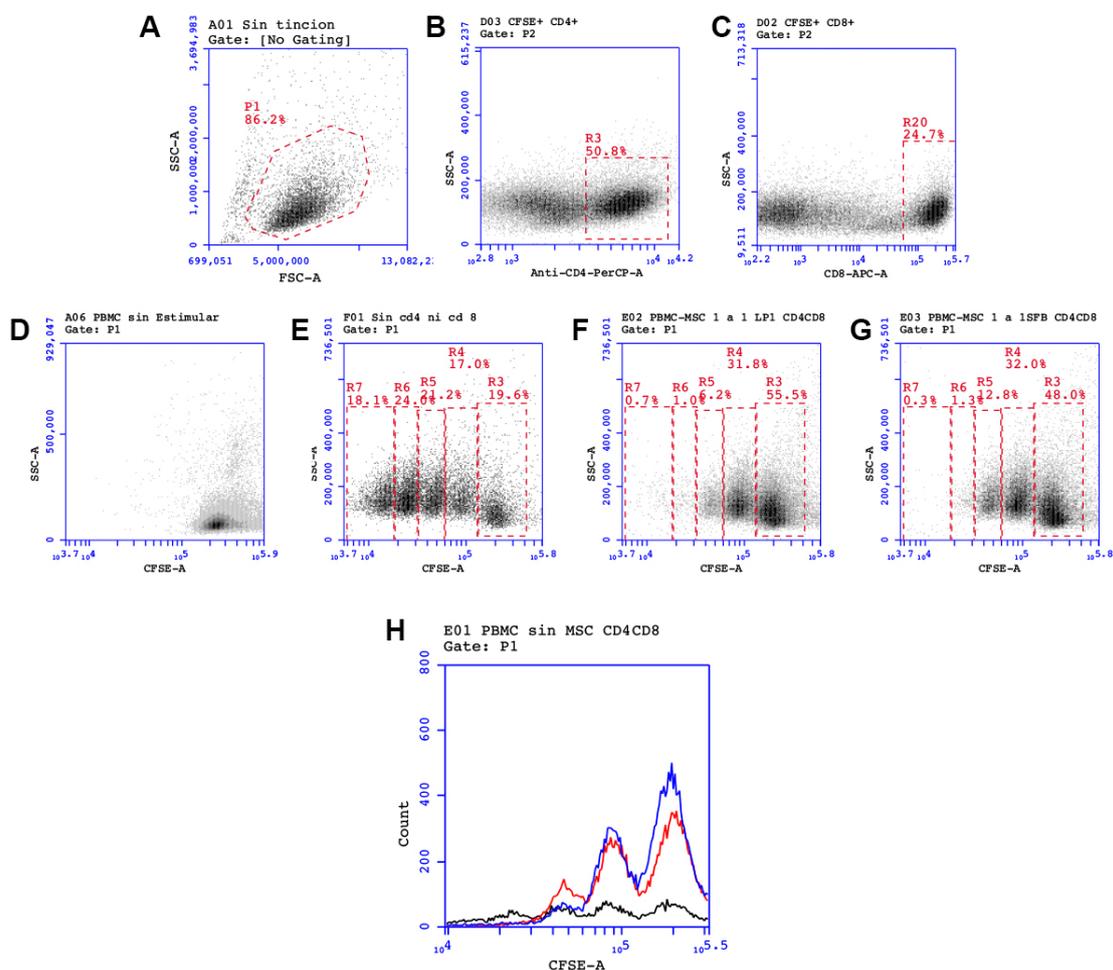


FIGURA 32: Metodología para la evaluación de la inmunomodulación por parte de las CMM-DP. En la primera hilera se observan los pasos para el análisis de los linfocitos estimulados. En el panel A se observa como se marca la región de interés que contiene la población linfocitaria. En los paneles B y C se recuadra la región de interés que contiene, dentro de la población marcada en A, a los linfocitos CD4(+) (panel B) o CD8(+) (panel C). Posteriormente se analiza en el canal FL1, correspondiente al rango de fluorescencia del CFSE, el grado de proliferación logrado en la muestra. Como se ve, en el control (panel D), los linfocitos no estimulados no presentaron proliferación, y por lo tanto mantienen una alta fluorescencia. En el panel E se observa la proliferación de los linfocitos sin estar expuestos a CMM-DP, como lo fueron en los paneles F (CMM-DP derivadas en lisado de plaquetas) y G (CMM-DP derivadas en suero fetal bovino). Como se observa en los paneles E, F y G se realizan recuadros para cuantificar el porcentaje de células que presentó división celular luego de la estimulación. Como se ve, la exposición a las CMM-DP disminuye marcadamente el número de células que presentan más proliferación (representadas por las células recuadradas hacia la izquierda). Finalmente, en el panel H se representa de manera distinta los efectos de las CMM-DP sobre la proliferación de linfocitos. En negro se marca la proliferación sin CMM-DP total, en azul la proliferación de linfocitos CD4+ y en rojo la proliferación de los linfocitos CD8+. Cada pico se corresponde con la proliferación.

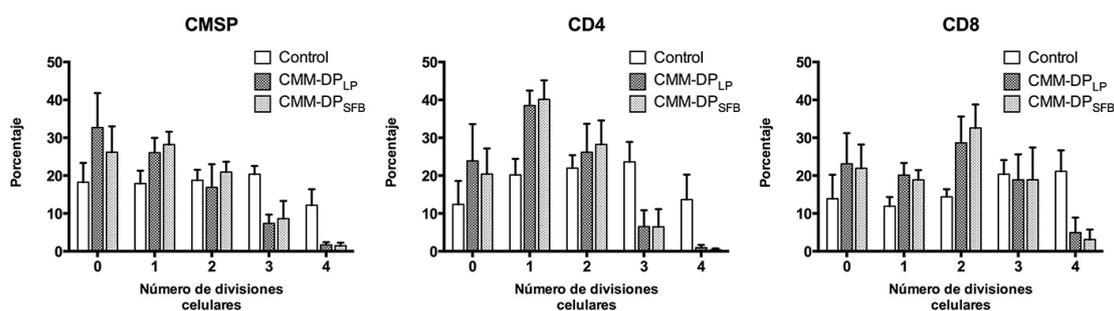


FIGURA 33: Análisis de la inmunomodulación producida por las CMM-DP. En los gráficos de barra se expresan los porcentajes de linfocitos según el número de divisiones celulares observadas, tanto en el total de las células (CMSP) o en los linfocitos CD4(+) o CD8(+). Se observa como en ausencia de CMM-DP_{LP} (barras gris oscuro) o de CMM-DP_{SFB} (barras gris claro) las células presentan un perfil con mayor número de divisiones celulares (barras blancas). En cambio, cuando se incuban con CMM-DP, ya sea derivadas en lisado de plaquetas o en suero fetal bovino, presentan menos número de divisiones celulares e inclusive el número de células arrestadas se incrementa. Los resultados arrojaron los siguientes valores de divisiones celulares, expresados en porcentaje \pm desvío estándar. Para CMSP, Control 0: 18 ± 10 ; 1: 18 ± 6 ; 2: 19 ± 5 ; 3: 20 ± 4 ; 4: 12 ± 8 ; CMM-DP_{LP} 0: 33 ± 20 ; 1: 26 ± 9 ; 2: 17 ± 14 ; 3: 7 ± 5 ; 4: 2 ± 2 ; CMM-DP_{SFB} 0: 26 ± 15 ; 1: 28 ± 8 ; 2: 21 ± 6 ; 3: 9 ± 10 ; 4: 1 ± 2 ; Para CD4(+), Control 0: 12 ± 11 ; 1: 20 ± 7 ; 2: 22 ± 6 ; 3: 24 ± 9 ; 4: 14 ± 11 ; CMM-DP_{LP} 0: 24 ± 19 ; 1: 39 ± 8 ; 2: 26 ± 15 ; 3: 7 ± 9 ; 4: 1 ± 1 ; CMM-DP_{SFB} 0: 20 ± 14 ; 1: 40 ± 10 ; 2: 28 ± 13 ; 3: 6 ± 9 ; 4: 0 ± 1 ; Para CD(8+), Control 0: 14 ± 11 ; 1: 12 ± 4 ; 2: 14 ± 3 ; 3: 20 ± 6 ; 4: 21 ± 10 ; CMM-DP_{LP} 0: 23 ± 16 ; 1: 20 ± 6 ; 2: 29 ± 14 ; 3: 19 ± 13 ; 4: 5 ± 8 ; CMM-DP_{SFB} 0: 22 ± 13 ; 1: 19 ± 5 ; 2: 33 ± 12 ; 3: 19 ± 17 ; 4: 3 ± 5 .

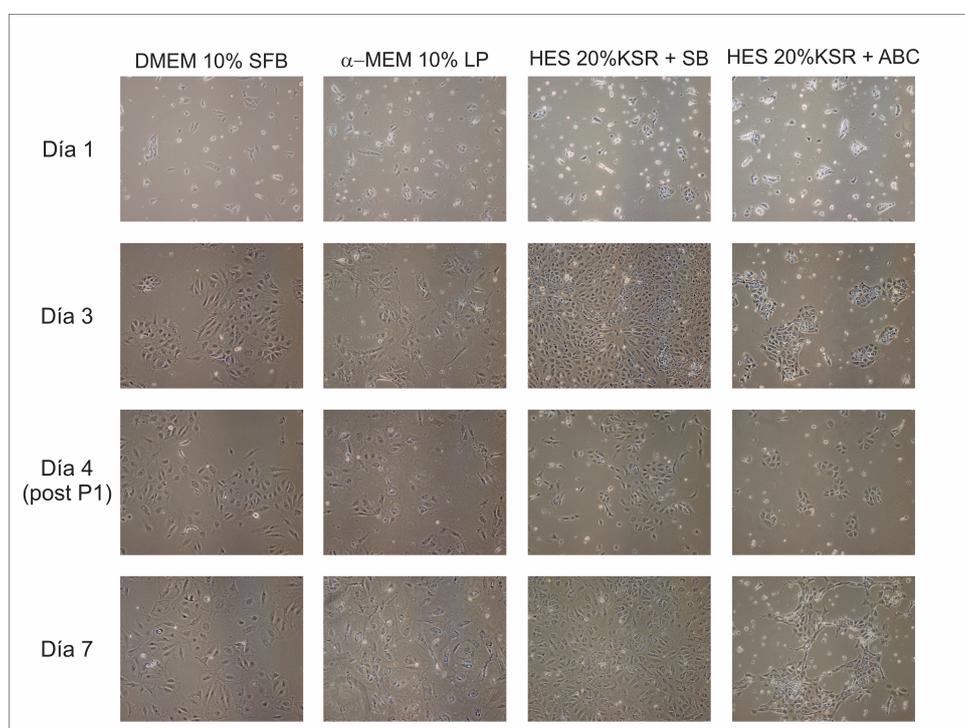


FIGURA 34: Imágenes de la diferenciación de CMP a CMM-DP utilizando diferentes suplementos. A pesar de utilizarse diferentes suplementos de cultivo la morfología de las células en diferenciación es similar, presentando rasgos de diferenciación mesenquimal.

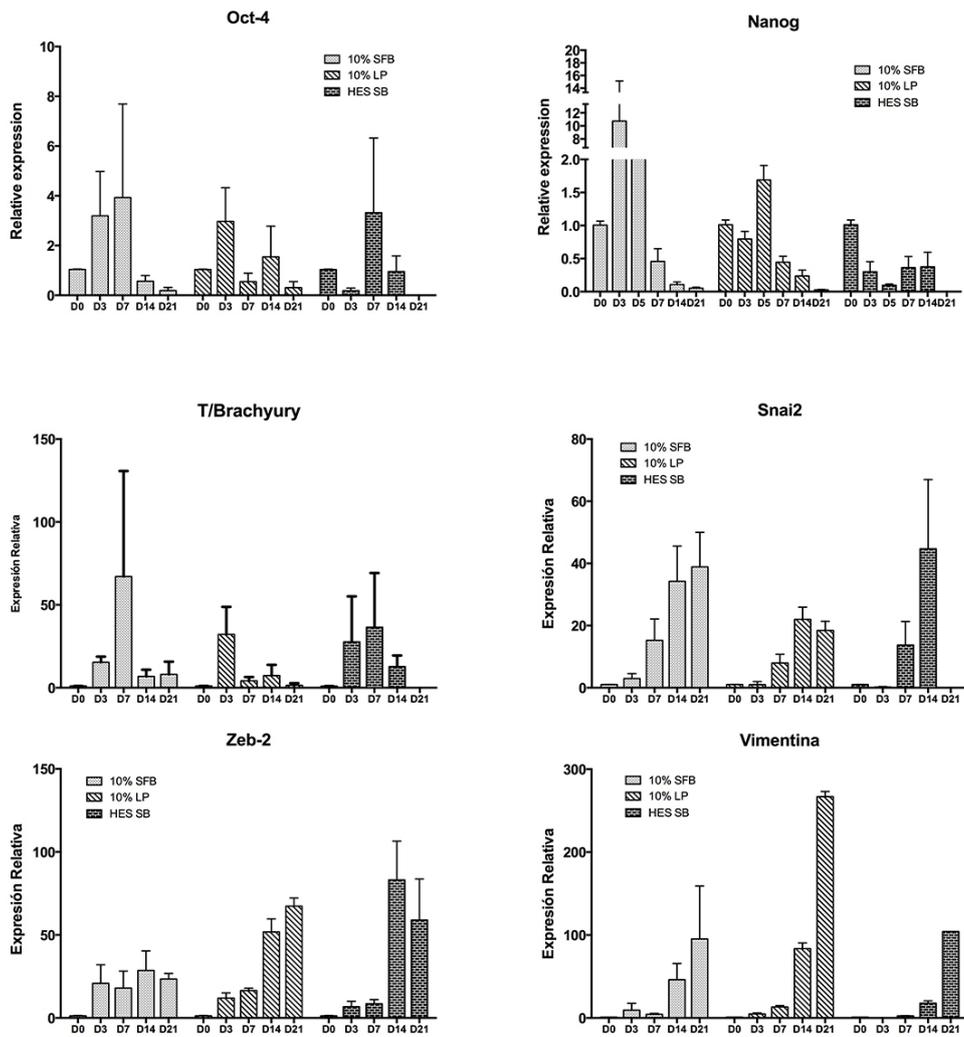


FIGURA 35: Análisis por qPCR de la diferenciación de CMP a CMM-DP utilizando diferentes suplementos. Se realizó un análisis de la expresión de genes de pluripotencia y mesenquimales en protocolos de diferenciación de CMP en CMM-DP utilizando diferentes suplementos de cultivo. El perfil de expresión de estos genes se comporta de manera similar en los diferentes protocolos.

5. Discusión

Las células madre pluripotentes presentan la capacidad de generar todos los tipos posibles de células diferenciadas. La pluripotencia, característica primaria de estas células, se expresa en la capacidad extrema de formar tejidos correspondientes a las tres capas germinales. Esto es demostrable a través de diversos ensayos de laboratorio, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el primero de los casos, las células son agrupadas forzosamente en suspensión, formándose una estructura tridimensional en la cual las señales intercelulares y los componentes del medio inducen la aparición de células adultas con fenotipos diferentes. Estas estructuras tridimensionales, llamadas cuerpos embrioides, son la analogía *in vitro* del ensayo de formación de teratomas *in vivo*. En este último ensayo, las CMP son inyectadas en ratones inmunocomprometidos, en los cuales luego de semanas aparecen formaciones tumorales. Como los teratomas humanos, estas formaciones presentan estructuras tisulares correspondientes a las tres capas germinales. Las células utilizadas en esta tesis presentan la capacidad de generar tanto cuerpos embrioides como teratomas (Questa et al., 2016). La demostración por antonomasia de la pluripotencia de estas células es posible utilizando células de origen animal. Con CMP de ratón se han realizados ensayos de complementación diploide y tetraploides (Boland et al., 2009; L. Kang, Wang, Zhang, Kou, & Gao, 2009; Zhao et al., 2009). En el primer caso, las CMP son inyectadas en la masa interna de un blastocisto de ratón en desarrollo. Este blastocisto es luego implantado de manera intrauterina. La caracterización posterior en el animal desarrollado a término demuestra la presencia de células en todos los órganos originadas tanto del blastocisto primario como de las células inyectadas. En el caso de la complementación tetraploide, el ensayo se realiza al fusionar las dos primeras células hijas del cigoto, y así se genera una mórula de células tetraploides. Esta mórula puede generar los tejidos extra-embrionarios de manera efectiva, pero no los embrionarios. Utilizando este artilugio, se realiza el ensayo por medio de la inyección de CMP dentro de la mórula tetraploide. El animal crecido a término presenta en este caso todas las células de su cuerpo generadas a partir de las CMP inyectadas. Estos estudios se han realizado con CMP murinas y no en humanas por razones obvias, pero demuestran la pluripotencia de manera definitiva.

Las células madre pluripotentes crecen en colonias, densamente agrupadas y en condiciones de cultivo específicas para evitar la diferenciación. Tradicionalmente, el cultivo de esas células se realiza sobre fibroblastos embrionarios de ratón inactivados (*inactivated mouse embryonic fibroblast*, iMEF) por irradiación. Cuando las colonias de células crecen lo hacen en forma radial y tridimensional. Con el tiempo es necesario pasar las colonias para evitar que la acumulación de células en el centro hagan que estas se diferencien y pierdan la pluripotencia. Alternativamente, las colonias pueden ser crecidas sobre placas cubiertas previamente con Matrigel, Geltrex, o laminina, y cultivadas en un medio condicionado de iMEF. Esto presenta ventajas en algunas circunstancias, como por ejemplo cuando se quiere evitar la contaminación con ARN mensajero de ratón, pero es algo más dificultoso en el trabajo diario y presentan mayor tendencia a la diferenciación. Finalmente, existen medios específicos para el cultivo de las CMP, pero su utilización es de costo elevado. En este trabajo se utilizaron células mayormente provenientes de cultivos sobre iMEF, aunque ocasionalmente se utilizaron células crecidas sobre Geltrex y medio condicionado de iMEF. El origen del cultivo primario no modificó el resultado de los experimentos. En nuestro laboratorio hemos caracterizado extensamente el cultivo de las CMP (García et al., 2013; Questa et al., 2016; Romorini et al., 2012, 2013; Scassa et al., 2011). En estas publicaciones validamos

las características pluripotentes de este cultivo celular. Utilizamos ensayos *in vitro* a través de la generación de cuerpos embrioides observamos la expresión de marcadores de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Además, hemos inyectado las células pluripotentes en ratones inmunodeficientes y hemos observamos que las mismas forman teratomas *in vivo*, lo que demuestra que estas células tienen la capacidad de generar células de cualquier tejido adulto. Este trabajo habitual del laboratorio confirma el punto de partida de los experimentos. El cultivo de las células y la demostración de la pluripotencialidad de las mismas ha sido validado y publicado previamente en nuestro laboratorio. Estas células fueron nuestro punto de partida para la diferenciación en CMM-DP.

Si las CMP pueden generar todo tipo de células adultas, no es de extrañar entonces que sean capaces de generar CMM. La revisión de la literatura avala ampliamente el concepto incluso que las CMP generan por medio de diferentes protocolos de diferenciación, una población celular similar a las CMM adultas. El trabajo de esta tesis demuestra que es posible la obtención de una población de células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes utilizando como principal componente inductor de la diferenciación el lisado de plaquetas. Se desarrolló un protocolo por el cual al cabo de aproximadamente 28 días se obtienen un número considerable de CMM de manera fácil y eficaz. Este protocolo puede dividirse arbitrariamente en dos etapas: en la primera, las CMP paulatinamente pierden la pluripotencia, y lentamente dejan los requerimientos específicos de cultivo que necesitan para sostener este estado de indiferenciación. Así, las células en esta primera etapa deben ser pasadas de manera similar a las CMP, como por ejemplo con el uso de inhibidor de Rock, ya que de no hacerlo la células entran rápidamente en apoptosis. Las células en esta etapa tienden a agruparse y mantenerse unidas, formando pequeñas colonias. Cuando son disociadas a un estado unicelular, las células entran rápidamente en apoptosis, en una forma que algunos autores han llamado *blebbing* por su forma y mecanismo (Chen, Hou, Gulbranson, & Thomson, 2010; Ohgushi & Sasai, 2011; Ohgushi et al., 2010; Samuel & Olson, 2010). Este fenómeno sucede cuando las CMP son separadas entre sí por medios enzimáticos, particularmente con tripsina. La unicelularidad produce que la CMP se adhieran al plato, independientemente del *coating* que se utilice, pero con el transcurrir de las horas la células comienzan a presentar prolongaciones en forma de burbujas a partir de su membrana celular, seguido de apoptosis. A gran aumento esto se observa como burbujas en la superficie de las células (*blebbing*). No es claro por qué se produce este efecto en las CMP, aunque pareciera que existe una activación de señales de apoptosis dependientes de la Rho quinasa y de RAC1 desencadenadas por la falta de adherencia intercelular entre, posiblemente, e-cadherina y diferentes conexinas. Hace algunos años atrás se ha publicado que la utilización de inhibidores de la proteína asociada a Rho (iROCK) son efectivos para reducir la apoptosis cuando las CMP humanas son pasadas en forma unicelular. Por lo tanto, los inhibidores de ROCK se han popularizado en el cultivo de estas células. En nuestras primeras experiencias, se encontró que las CMP, en los primeros pasos de la diferenciación con suplementos de LP, entraban en apoptosis de manera extensa y marcada una vez que eran pasadas de manera unicelular. Por lo tanto se incorporó al medio de cultivo del protocolo un iROCK, Y-327632, para contra-arrestar esta tendencia pro-apoptótica.

En una segunda etapa del protocolo de diferenciación, los requerimientos iniciales dejan de ser necesarios. Claramente las células adoptan una morfología mesenquimal. Esta segunda etapa es considerada como una maduración de las células, pero esta definición es arbitraria. Inclusive, no existe consenso en el campo de las células madre acerca de una definición de cual es o son los

criterios de una célula mesenquimal madura. Ciertamente, las células al final del protocolo se comportan como las células mesenquimales de control (CMM-CU). En este trabajo se realizó una completa caracterización de las células formadas, incluyendo la caracterización de los marcadores de superficie, la expresión de genes relacionados con la diferenciación mesenquimal, la capacidad de diferenciarse en células adipoblásticas, osteoblásticas y condroblásticas, y la capacidad de inmunomodular en un ensayo de cultivo mixto de linfocitos. En base a los resultados, en las próximas páginas se discutirán los hallazgos en base a los conocimientos actuales en la materia.

5.1. Identidad de las células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes (CMM-DP)

Un primer punto a considerar es la identidad de las células generadas a través del protocolo de diferenciación descrito. Más allá del hecho de que esta tesis se basó primariamente en la utilización del lisado de plaquetas, las células generadas presentan una probable similitud con otras células mesenquimales derivadas de pluripotentes y con otras células mesenquimales adultas. En este trabajo se compararon las CMM-DP con CMM-CU y con fibroblastos, sin encontrarse diferencias realmente significativas entre ellas, pero sí con las CMP. La primera consideración a realizar, sin embargo, debe centrarse en la metodología utilizada para comparar las poblaciones celulares. Los análisis realizados involucran, por ejemplo, la expresión de marcadores de superficie por medio de citometría de flujo. Nuestros hallazgos confirman la expresión de los marcadores más reconocidos de CMM. Además, observamos la ausencia de marcadores de superficie de CMP, de células hematopoyéticas o de células endoteliales. La relación entre las células mesenquimales y las células endoteliales es confusa. Si bien las CMM no tienen las características funcionales de las células endoteliales, existen publicaciones que hablan de cierta capacidad de trans-diferenciación de las CMM en células endoteliales (Aguilera et al., 2014). Por lo tanto, en esta etapa del trabajo se realizó una extensa determinación de la expresión de los marcadores de superficie presentes en las células madre mesenquimales derivadas de pluripotentes. Este análisis revela la presencia de células con un fenotipo mesenquimal, con ausencia de expresión de marcadores de otros linajes celulares. Es de desatacar que en algunos casos, como se observó en nuestros resultados, la expresión de los marcadores de superficie se superpone entre las poblaciones. Por lo tanto, se debe considerar la presencia de una serie de marcadores específicos como expresión de un perfil, y no la presencia o ausencia de algún marcador individual.

Si bien el análisis de marcadores de superficie por medio de citometría de flujo puede demostrar diferencias groseras, es posible que no sea suficiente para encontrar diferencias más específicas. Para ello, algunos investigadores han realizado experimentos utilizando análisis tipo *genome-wide*, es decir, análisis de la expresión génica total en una población celular por medio de la secuenciación masiva (Barberi et al., 2005; de Peppo et al., 2010). Estos ensayos sí han encontrado diferencias entre los grupos, pero también es cierto que la capacidad de discernimiento de este tipo de análisis supera la posibilidad de unificar criterios de definición. Así, un análisis de *genome-wide* que compare CMM de dos fuentes diversas (por ejemplo, médula ósea y tejido graso) es altamente probable que identifique diferencias significativas, pero estas diferencias pueden ser poco relevantes en el momento de definir a una célula como mesenquimal o no. Inclusive, la relación entre un fibroblasto derivado de la piel y una célula madre mesenquimal es debatida según el ensayo con que se analice (Alt et al., 2012; Halfon, Abramov, Grinblat, & Ginis, 2011;

Phinney, 2008). De todos modos, recientemente fue publicado un análisis extenso de las *omics* de las CMM-DP versus CMM-MO (Billing, 2016). En este trabajo los autores realizaron RNA-seq y proteómica de estas dos poblaciones celulares y encontraron diferencias mayores entre las CMEh y ambos tipos de células mesenquimales, pero también algunas diferencias entre las células madre mesenquimales (figura 36). Si bien la similitud entre las células mesenquimales es evidente, estas diferencias encontradas avalan según los autores, que las CMM-DP son una población de características independientes a las CMM-MO.

Esta aproximación de la identidad por las diferencias con otras poblaciones no es sin embargo la única. También se puede abordar la identidad de las células a partir de una deducción embriológica de la diferenciación. Si las CMP representan *in vitro* a una masa interna de blastocisto es de esperar que las CMM-DP logradas sean parte de un programa de diferenciación que incluye a células de tejido conectivo, las cuales abundan en el embrión en desarrollo. La inclusión en este trabajo de CMM-CU tuvo el sentido de incluir una célula de control que más se asemeje a un tejido conectivo embrionario, y que por razones obvias fuera fácilmente accesible para el trabajo. Sin embargo, se debe destacar que las CMM-CU son células mesenquimales de un tejido extraembrionario, y que las CMP tienen ciertas limitaciones al momento de generar células de este origen ya que derivan de la masa interna del blastocisto. En estos experimentos nuevamente las CMM-DP difieren en poco o nada de las CMM-CU por los métodos analizados. La demostración de esta hipótesis requiere, sin embargo un trabajo difícil y probablemente deba incluir células y animales de experimentación lejos del alcance de esta tesis.

5.2. ¿Por qué es tan fácil derivar células madre mesenquimales de células madre pluripotentes?

La diferenciación de una CMP en una célula adulta específica es un proceso complejo de realizar *in vitro*. Por ejemplo, la diferenciación en cardiomiocitos involucra la utilización de medios específicos con factores de crecimiento en concentraciones adecuadas (Burrige et al., 2012). Esta diferenciación se lleva a cabo en etapas, diferenciando primero a las CMP en células progenitoras mesodérmicas y posteriormente diferenciándolas en células progenitoras cardíacas. Lo mismo sucede cuando se quieren obtener neuronas, u otros tipos celulares terminalmente diferenciados. Entonces, es válido preguntar por qué solamente con incubar las células en un medio rico en factores de crecimiento es suficiente para lograr una población de CMM-DP. Más aún, realizamos experimento preliminares, los cuales son avalados por la bibliografía, en donde observamos que no importa el suplemento utilizado en el cultivo (es decir, específicos o inespecíficos) las células se diferenciarán en CMM-DP (ver sección 12.10). Sin embargo, sí importan otras condiciones. En primer lugar, el cultivo en dos dimensiones, en vez de tridimensional, parece ser relevante. Si las células son cultivadas en la forma de cuerpos embrioides (tridimensionalmente) en suspensión, se obtienen células específicas adultas derivadas de las tres capas germinales (Koike, Sakaki, Amano, & Kurosawa, 2007; Kurosawa, 2007). Habitualmente este ensayo se realiza con un medio suplementado con SFB. En cambio, al cultivarlas con el mismo medio (o con LP u otros medios) en dos dimensiones, observamos una consistente diferenciación a CMM-DP, sin la aparición de células adultas con otro fenotipo. Esto es importante destacarlo: la única célula que aparece luego de la diferenciación es de tipo mesenquimal. Además, no se observa en el cultivo un proceso de marcado de apoptosis, y por ende de selección, que explique la ausencia de otros fenotipos. Es

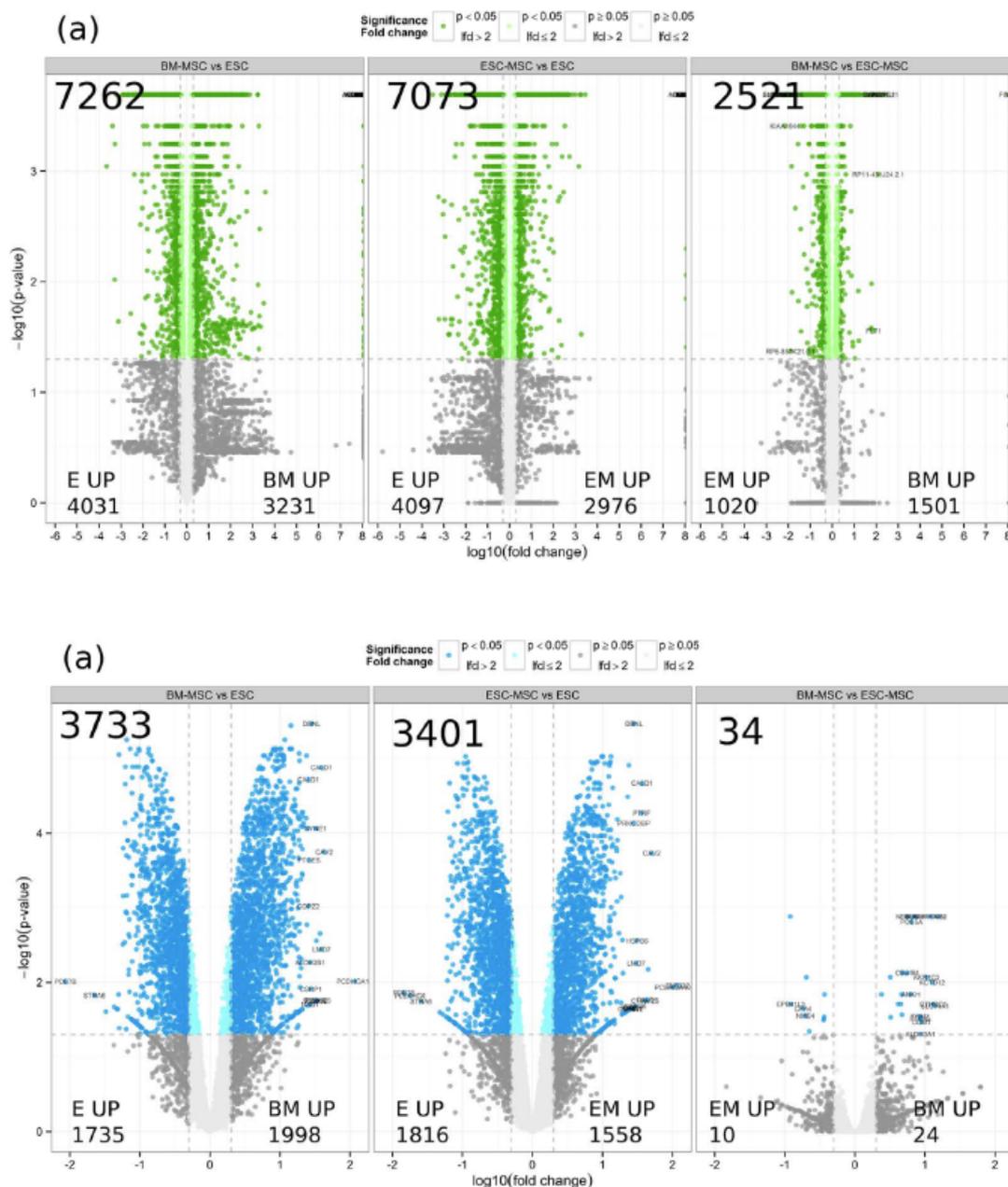


FIGURA 36: Diferencias entre CMEh y CMM en la expresión de ARN y de proteínas analizadas por secuenciación y proteómica. La figura muestra en el panel superior los datos de secuenciación de ARN en CMEh, CMM-DP y CMM-MO en forma de volcano plots. A la izquierda y en el centro, se muestran las diferencias de expresión de RNAs entre las CMM-MO vs. CMEh. Como se observa en estos dos paneles, las diferencias en la expresión de ARNs entre CMM-MO vs. CMEh (izquierda) y entre CMM-DP y las CMEh (centro) son marcadas (puntos verdes). En cambio, a la derecha se observa la comparación entre ambas CMM. Como se puede apreciar, los puntos verdes en este caso son menos frecuentes y menos dispersos. Los mismos resultados, aun más marcados, se observan en los resultados del análisis de la proteómica. En este caso, la caída en la diferencia de proteínas expresadas es aun mayor, siendo de 34 entre mesenquimales contra 3733 y 3401 en las otras comparaciones. Tomado de Billing y colaboradores (Billing, 2016)

de destacar que en otros modelos de diferenciación específicos, la selección por apoptosis es un fenómeno frecuente. Por otro lado, en algunos protocolos de diferenciación cardíaca se puede evidenciar la aparición de células mesenquimales asociadas a la aparición de cardiomiocitos. En nuestro laboratorio habitualmente observamos que un gran número de las células que aparecen luego de un protocolo de diferenciación cardíaca no presentan un fenotipo cardíaco pero si una morfología mesenquimal. Este hallazgo fue estudiado en detalle por Wei y colaboradores quienes describieron este fenómeno (H. Wei et al., 2012). Por lo tanto, se puede enunciar la hipótesis que en determinadas condiciones las células pluripotentes, por defecto, sufren una transición epitelio-mesenquimal y se diferencian en CMM-DP. Estas condiciones, en principio, podrían corresponderse con la exposición uniforme a señales extracelulares derivadas del medio de cultivo, ya que se encuentran en crecimiento en adherencia. De esta forma, las células evitarían la señalización paracrina entre ellas en sus estadios iniciales de diferenciación cuando son crecidas en forma tridimensional.

Una segunda hipótesis a considerar que puede ser relevante en la diferenciación de las CMP en CMM-DP es la continua ruptura de las uniones intercelulares entre las CMP por medio de los sucesivos pasajes, lo cual podría desencadenar señales compatibles con la TEM. La TEM implica cambios substanciales en la morfología y polaridad celular. En este proceso se observa una pérdida de las uniones intercelulares, con separación del clásico epitelio firmemente unido. De hecho, una de las características más reconocidas de la TEM es la caída en la expresión de e-cadherina con aumento de la expresión de n-cadherina (Eastham et al., 2007; Kalluri & Weinberg, 2009). En nuestro caso, sin embargo, observamos que existe una caída leve en la expresión de la e-cadherina (CD324), con un aumento significativo de n-cadherina (CD325). No es claro el por qué de la discrepancia entre los datos presentados en esta tesis y los publicados previamente. Sí esta claro que a lo largo de los días de diferenciación, con pasajes frecuentes (cada 4-5 días aproximadamente), se establece una separación mecánica de las uniones intercelulares de las CMP, la que podría desatar un estímulo para la TEM. No existen evidencias descritas en la literatura acerca de que éste sea un mecanismo inductor de la TEM, pero algunas observaciones indirectas lo avalan. Por ejemplo, Hawkins y colaboradores encontraron que la reducción de la expresión de e-cadherina reducía la expresión de nanog, un gen fundamental en la pluripotencia (Hawkins, Mohamet, Ritson, Merry, & Ward, 2012). Este efecto, sin embargo, podía ser reemplazado por la expresión de n-cadherina. Otros autores describen que la expresión de e-cadherina es necesaria para lograr la reprogramación celular, es decir, la e-cadherina es necesaria para la TME (T. Chen et al., 2010). Además, la separación de las células desencadena una respuesta proapoptótica, mediada por la activación de Rac1 (Ohgushi & Sasai, 2011). Este fenómeno, más la evidencia de que las uniones intercelulares ayudan en el mantenimiento del estado indiferenciado de las CMP (M.-H. Kim & Kino-oka, 2014), dan fundamento a la hipótesis de que la separación de estas uniones genera la diferenciación mesenquimal de las células. Finalmente, en otro estudio, la inhibición química o por medio de shRNA de connexina-43 resultó en la pérdida de la pluripotencia y la expresión de marcadores de diferenciación (Todorova, Soria, & Quesada, 2008). Por lo tanto, es posible que la separación mecánica reiterada de las CMP genere señales de diferenciación en el modelo desarrollado en esta tesis, y que las mismas induzcan a la diferenciación homogénea de una célula mesoendodermal a través de la inducción de la transición epitelio-mesenquimal.

En conclusión, es posible que exista cierta conexión directa entre las CMP y las CMM. La diferenciación rápida y eficaz de una células pluripotente en una célula mesenquimal con plasticidad

en la diferenciación, capacidad de migración y producción de matriz extracelular es de esperar para un desarrollo embriológico apropiado.

5.3. Lisado de Plaquetas

El cultivo de células eucariotas *in vitro* requiere de la incubación en condiciones adecuadas, como la combinación del medio de cultivo y el suplemento elegido. El suero fetal bovino ha sido tradicionalmente usado como suplemento ya que contiene elementos necesarios para el crecimiento de las células, incluyendo a factores de crecimiento en concentraciones variables. Alternativamente se han desarrollado suplementos sintéticos, con componentes específicos que aportan los requerimientos necesarios para algunos tipos celulares específicos (Bottenstein & Sato, 1979; G. Chen et al., 2011; X. Q. Xu et al., 2008). Por ejemplo, en muchas líneas celulares se puede utilizar la combinación de insulina-transferrina-selenio. Existen publicaciones acerca del uso de medios definidos, es decir, medios con compuestos y suplementos sin componentes de origen animal y con concentraciones definidas, pero suelen ser caros para su uso extenso y cotidiano.

El uso de lisado de plaquetas fue descrito hace algunos años. Los atractivos para su utilización son varios. En primer lugar, el costo es nulo, ya que es frecuente que los bancos de sangre descarten bolsas de plaquetas luego de su fecha de vencimiento, que es de sólo 5 días. Estas bolsas de plaquetas contienen aproximadamente entre 100 y 200 ml, o incluso hasta 500 ml según su modo de preparación. Durante la preparación del lisado de plaquetas se mezclan bolsas provenientes de diferentes donantes para homogeneizar las concentraciones esperadas de factores de crecimiento y nutrientes. Esto genera habitualmente que en cada preparación del suplemento se generen aproximadamente 1 a 1,5 litros. Esta cantidad, a un costo mínimo, es suficiente para un número importante de experimentos. Por otra parte, su preparación es muy sencilla. El lisado se realiza por medio de congelación/descongelación, lo cual rompe las membranas celulares de las plaquetas y se liberan los contenidos al exterior. En nuestros experimentos observamos una gran tendencia a la formación de fibrina. Este hecho no afectó la diferenciación de las células, pero nos encontramos en algunas circunstancias con la gelatinización del medio de cultivo (por su contenido de calcio), lo cual dificulta el trabajo diario. Por ello, adoptamos la metodología de Copland y colaboradores (Copland et al., 2013). Estos autores sumaron un paso adicional en la generación del lisado de plaquetas y que consiste en la agregación del fibrinógeno con cloruro de calcio, y posteriormente centrifugando a alta velocidad para decantar la fibrina. Estos autores demostraron que no afecta a los contenidos de factores de crecimiento, ni al cultivo de las células. En nuestra experiencia este método facilitó el trabajo sin variar los resultados.

Un hecho a destacar es que el LP presenta niveles de factores de crecimiento mayores a los del suero fetal bovino (Schallmoser et al., 2007; Shih & Burnouf, 2015). Ha sido reportado que el uso de LP genera una mayor tasa de crecimiento celular (Doucet et al., 2005). Nuestros datos coinciden (ver figura 26), con la particularidad que el fenómeno observado incluye la diferenciación de las CMP. No es claro en los experimentos de esta tesis si este efecto beneficioso es debido a un incremento de la tasa de división celular, a una reducción de la apoptosis espontánea que pueda suceder en cultivo, o a ambos efectos. Sin embargo, durante el desarrollo del protocolo no se observó una muerte celular importante. Por el contrario, las células presentaron una alta proliferación sin figuras apoptóticas. De cualquier modo, el uso de LP genera un número mayor

de células en menos tiempo, lo que facilita el trabajo del investigador.

El LP ha sido utilizado como suplemento de cultivo en varios estudios clínicos con uso de células madre mesenquimales. El uso de SFB en células que posteriormente son inyectadas en pacientes ha sido realizado, pero se esgrimen algunos problemas con esta práctica. En primer lugar, el uso de productos bovinos en humanos es criticado por las posibilidades de transmisión de enfermedades zoonóticas. Si bien las enfermedades comunes (por ejemplo brucelosis) son descartadas en el proceso de fabricación del suero, el énfasis se pone en la posibilidad de la transmisión de la leucopatía espongiiforme bovina (Carpenter, Frey-Vasconcells, & Rao, 2009; Gee, 2009; Schallmoser et al., 2007). Un segundo problema con su uso es la sensibilización a los productos animales. Algunos componentes de origen animal son reconocidos por el sistema inmune humano, y a pesar de los lavados que puedan realizarse sobre las células para evitar la contaminación, se ha observado que el suero fetal bovino puede inducir cambios en las glicoproteínas de membrana de las células en cultivo, tornándolas inmunogénicas, y que la fracción Apolipoproteína-B100 de la albúmina bovina puede ser inmunogénica (Martin, Muotri, Gage, & Varki, 2005; Sakamoto et al., 2007). Estos cambios pueden desencadenar una respuesta humoral, y se ha observado clínicamente la aparición de anticuerpos contra las células madre mesenquimales luego de su inyección reiterada, e inclusive reacciones alérgicas (Mackensen, Dräger, Schlesier, Mertelsmann, & Lindemann, 2000; Selvaggi, Walker, & Fleisher, 1997; Tuschong, Soenen, Blaese, Candotti, & Muul, 2002). Finalmente, se ha reportado que la respuesta inmune a la inyección de CMM no es contra aloantígenos presentes en las células, sino a proteínas derivadas del suero fetal bovino (Sundin et al., 2007). El alcance patológico de este fenómeno no se conoce, pero de ser necesario tratamientos con infusiones reiteradas de CMM podría ser que aparezcan complicaciones clínicas relacionadas a la respuesta celular.

En resumen, el lisado de plaquetas es una excelente alternativa para el cultivo celular. En esta tesis se observa que además este suplemento de cultivo puede ser utilizado en la diferenciación de CMP a CMM-DP. La facilidad del protocolo utilizado, el bajo costo comparado con cualquier otro método, y su biocompatibilidad por carecer de compuestos animales, hacen que su utilización sea atractiva en potenciales tratamientos clínicos, como se verá a continuación.

5.4. Alcances potenciales biotecnológicos y clínicos de los hallazgos de esta investigación

En los últimos años ha existido una intensa actividad de investigación en células madre, cuyo resultado es la descripción de dos grandes campos: las células madre pluripotentes como fuente de todo tipo celular para medicina regenerativa y las células madre mesenquimales como células con capacidad inmunomoduladora. En el primer caso, la investigación transita actualmente por estudios básicos y preclínicos, pero la experimentación en humanos es muy limitada. Solamente se han reportado algunos estudios que utilizan células progenitoras derivadas de CMP para reparar tejidos, ya sea médula ósea o el epitelio pigmentario de la retina, o incluso para reemplazar las células β del páncreas endócrino (Kimbrel & Lanza, 2015). Con respecto a las CMM, en cambio, los protocolos clínicos desarrollados en estos últimos años son numerosos. Indiscriminadamente se ha postulado que estas células podrían ser utilizadas en cualquier proceso patológico que implique inflamación y reparación de tejidos. Se postula que las CMM presentan capacidad de regular una reacción cicatrizal, y cambiarla por una reacción regenerativa, y que los mecanismos involucrados

dependerían de la capacidad de inmunomodulación por parte de estas células. A pesar de los múltiples estudios en diferentes fases clínicas, la realidad es que los tratamientos con las CMM aun no han demostrado eficacia clínica en casi ninguna enfermedad como para ser aprobados por las autoridades regulatorias, a excepción de su utilización en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped refractaria, luego de un trasplante de médula ósea pediátrico (Amorin et al., 2014).

La derivación de células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes puede significar un gran avance en el desarrollo de esta rama de la medicina regenerativa. Las células transplantadas al momento en los estudios clínicos son derivadas en su gran mayoría de la médula ósea o de tejido graso. Algunos estudios comienzan a utilizar a las CMM-CU, las cuales representan una alternativa interesante, aunque potencialmente incompatible inmunológicamente (D. Wang et al., 2011). Sin embargo, el uso de las CMM-DP puede representar un paso adelante. En primer lugar, la fuente de origen de las CMM-DP puede ser una célula autóloga, reprogramada a CMPi, la cual es luego diferenciada. En este caso, la CMPi se convierte en un banco permanente de células, potencialmente inagotable, y que además puede ser derivado a otros tipos celulares. En el futuro, este hecho puede significar una gran ventaja al momento de la aplicación clínica de tratamientos de medicina regenerativa. Por otro lado, las CMM-DP demuestran un gran potencial en inmunomodulación (Kimbrel et al., 2014; X. Wang et al., 2014). Si bien existe un sesgo en cada publicación relacionada a este tema por el cual en muchas ocasiones se sobrevaloran los efectos positivos del tipo celular en estudio, publicaciones recientes dan cuenta de que estas células presentan una gran actividad inmunomoduladora, e inclusive por encima de otros tipos celulares similares. Este hallazgo, sin embargo, no es concordante en otras publicaciones (Fu et al., 2015). Finalmente, también debe considerarse que las células mesenquimales tienen un gran potencial como productoras de exosomas, que son microvesículas secretados activamente por las células como medio de comunicación extracelular. Existen evidencias que los exosomas pueden ser aplicados en forma terapéutica. Por ende, la utilización de CMM-DP (partiendo de su fuente inagotable de CMP) para producir exosomas se ha convertido en una línea de investigación promisoría (Hu et al., 2015; Zhang et al., 2015).

5.5. Líneas de investigación a futuro

Finalmente, en estos siguientes párrafos se discutirá acerca de nuevas líneas de investigación que pueden surgir en el laboratorio a partir de los resultados de esta tesis. Algunas de ellas, de hecho, ya se encuentran siendo abordadas por nuevos estudiantes.

Una primera línea de investigación se refiere al origen de uno de los estímulos para la diferenciación a células mesenquimales. Como se observó preliminarmente en algunos resultados de esta tesis, las CMM-DP parecen ser posibles de ser derivadas de muchas maneras diferentes, utilizando protocolos que difieren substancialmente en la composición de medios o en formas de agregación celular (bi o tridimensional). Pero entonces, ¿cuáles son los estímulos principales para la diferenciación mesenquimal en este modelo de cultivo de CMP? No existen dudas que los diferentes factores de crecimiento presentes en el lisado de plaquetas influyen significativamente en la diferenciación, pero el lisado de plaquetas no presenta características únicas ni definidas. Se podría esperar una diferenciación más heterogénea, en la cual puedan aparecer en la diferenciación células de diversos orígenes. Sin embargo, esto no ocurre y la diferenciación transcurre

de manera homogénea a la población mesenquimal. Además, si se utiliza suero fetal bovino en vez de lisado de plaquetas las células se diferencian de la misma manera. Por lo tanto, debe existir alguna/os otros factores que condicionen la diferenciación homogénea a células madre mesenquimales. Una hipótesis es la pérdida de señales de indiferenciación. Se puede especular que el fenómeno de diferenciación a células mesenquimales sucede porque se modifica el ambiente de cultivo y ante la falta de los estímulos de pluripotencia las células ponen en marcha un programa de diferenciación a células mesenquimales. Otro potencial estímulo puede ser la relación existente entre las uniones intercelulares (particularmente entre la e-cadherina y la connexina-43) con la transición epitelio-mesenquimal (T. Chen et al., 2010a; Ke et al., 2013). En el protocolo de diferenciación presentado, el pasaje de células frecuente junto a los estímulos positivos para la supervivencia de las células en diferenciación (inhibidor de ROCK, medio muy rico en factores de crecimiento, adherencia a una matriz extracelular específica) pueden hacer que se disparen señales de diferenciación mesenquimal. Esta hipótesis podría ser demostrada en experimentos que realicen una regulación negativa o una mutación aberrante de alguna de estas proteínas de membrana celular en CMP, y posteriormente evaluar la generación de señales que lleven a una TEM.

Una segunda línea de investigación a desarrollar es la de incrementar la capacidad de diferenciación de las CMP en CMM-DP en modelos tridimensionales. El modelo de diferenciación presentado en esta tesis se realiza en dos dimensiones. Esto tiene la desventaja de no ser apropiado para realizar grandes expansiones celulares. Para estos casos habitualmente se utilizan cultivos celulares en bioreactores, con células en suspensión y agitación continua (Godara, McFarland, & Nordon, 2008; Santos et al., 2011). Estos sistemas de cultivo ajustan las condiciones para maximizar el crecimiento de la masa celular. Los ajustes se realizan en las variables que pueden afectar el crecimiento de las células, y para ello se modifican las condiciones hasta encontrar la manera más apropiada de expandir la masa celular. Se realizan modificaciones habitualmente en las condiciones de pH y oxígeno, se adaptan las células a crecer en agitación continua para maximizar la exposición a nutrientes, y se varían las condiciones de adherencia, optando habitualmente por incluir microesferas que aumentan la superficie de adhesión de manera significativa. Hasta el momento no ha sido publicado ningún reporte acerca de la derivación de CMM-DP a partir de CMP crecidas en forma tridimensional. Este potencial desarrollo presenta una dificultad extra a los sistemas conocidos: las células no solamente tienen que crecer en un sistema tridimensional, sino también diferenciarse. Este hecho presenta dificultades para desarrollar un protocolo adecuado ya que las condiciones de cultivo pueden variar substancialmente a lo largo de la diferenciación. Por lo tanto, una línea de investigación atractiva sería poder adaptar la diferenciación y posterior expansión de las CMM-DP derivadas en lisado de plaquetas a un sistema de cultivo adaptado a un bioreactor. Las capacidades de proliferación encontradas con este protocolo de diferenciación (ver figura 26) predicen que un modelo de estas características podría ser muy atractivo ya que podría generar una masa de células enorme en tiempos más cortos en comparación con otras células madre mesenquimales.

Una tercera línea de investigación involucra la producción de exosomas por parte de las CMP-DP generadas como se mencionó anteriormente. Los exosomas, como fue comentado, son microvesículas activamente secretadas al espacio extracelular por todos los tipos celulares. Se postula que los exosomas corresponden a un tipo de comunicación intercelular ya que los mismos contienen gran cantidad de microRNA, mRNA y proteínas que modifican las funciones de las células a distancia.

Así, se ha demostrado que los exosomas derivados de células madre mesenquimales conservan la capacidad de inmunomodular como lo hacen las células de origen (Lai, Yeo, & Lim, 2015). Por lo tanto, generar exosomas de las CMM-DP derivadas por medio del protocolo presentado en esta tesis es un trabajo de investigación atractivo ya que los mismos podrían ser utilizados de manera similar a la propuesta para las células en medicina regenerativa. La secuencia de generar CMPi, diferenciar las mismas a CMM-DP, y luego producir exosomas de estas últimas tiene la gran ventaja potencial de estar basada en una fuente inagotable de células, a diferencia de la obtención de exosomas a partir de CMM adultas.

Finalmente, otras líneas de investigación con las CMM-DP es naturalmente el ensayo de las células *in vivo* en protocolos en animales con diferentes modelos de enfermedad. De hecho, ya han sido publicados múltiples experimentos en animales con CMM-DP, incluyendo modelos de esclerosis múltiple (X. Wang et al., 2014), de nefritis lúpica (Thiel et al., 2015), de osteoartritis aguda (Gonzalo-Gil et al., 2015), o de enfermedad inflamatoria intestinal (Ferrer et al., 2016). Como ya se comentó en la Introducción, los modelos de diferenciación difieren significativamente entre las publicaciones, y si bien el resultado final es una célula con fenotipo mesenquimal, no se han publicado estudios al momento que comparen diferentes maneras de generar las CMM-DP. Por lo tanto, no es posible interpretar los resultados de estos ensayos en animales como válidos si fueran realizados con CMM-DP derivados con el protocolo descrito en esta tesis. Estos estudios sí sugieren que la aplicación clínica de las CMM-DP es factible y de manera similar al uso postulado con las CMM de otras fuentes. Sin embargo, las CMM-DP presentan el obstáculo adicional de ser generadas a partir de CMP, y esto es técnicamente más difícil y más caro que derivar CMM de otros orígenes.

6. Conclusiones

La presente tesis doctoral describe un nuevo protocolo para diferenciar las células madre pluripotentes en células madres mesenquimales. El protocolo tiene como componente principal la utilización de un suplemento basado en lisado de plaquetas, el cual se obtiene fácilmente de bolsas de concentrados de plaquetas descartadas por vencimiento. Además, el protocolo estipula los pasos necesarios para permitir la diferenciación gradual a lo largo de cuatro semanas, en donde se constata la pérdida de las características de pluripotencia y la adquisición del fenotipo mesenquimal. Serán necesarios más trabajos para determinar la relevancia y potencial aplicación clínica de este protocolo en el campo de las células madre.

7. Citas Bibliográficas

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., . . . Belmonte, J. C. I. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology*, *26*, 1276–1284.
- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*, 1438–1449.
- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, *105*, 1815–1822.
- Aguilera V., Briceño L., Contreras H., Lamperti L., Sepúlveda E., Díaz-Perez F., . . . Aguayo C. (2014) Endothelium Trans Differentiated from Wharton’s Jelly Mesenchymal Cells Promote Tissue Regeneration: Potential Role of Soluble Pro-Angiogenic Factors. *PLoS ONE* *9*:e111025.
- Al-Nbaheen, M., Vishnubalaji, R., Ali, D., Bouslimi, A., Al-Jassir, F., Megges, M., . . . Aldahmash, A. (2013). Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Reviews*, *9*, 32–43.
- Alt, E., Yan, Y., Gehmert, S., Song, Y.-H., Altman, A., Gehmert, S., . . . Bai, X. (2012). Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biology of the Cell*, *103*, 197–208.
- Amorin, B., Alegretti, A. P., Valim, V., Pezzi, A., Laureano, A. M., da Silva, M. A. L., . . . Silla, L. (2014). Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Human Cell*, *27*, 137–150.
- Arpornmaeklong, P., Brown, S. E., Wang, Z., & Krebsbach, P. H. (2009). Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, *18*, 955–968.
- Barberi, T., Willis, L. M., Succi, N. D., & Studer, L. (2005). Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Medicine*, *2*, e161.
- Becker, A. J., McCulloch, E. A., & Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, *197*, 452–454.
- Behr, R., Heneweer, C., Viebahn, C., Denker, H.-W., & Thie, M. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in colonies of rhesus monkey embryonic stem cells: a model for processes involved in gastrulation. *Stem Cells*, *23*, 805–816.
- Ben Azouna, N., Jenhani, F., Regaya, Z., Berraeis, L., Ben Othman, T., Ducrocq, E., & Domenech, J. (2012). Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Research & Therapy*, *3*, 6.
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, *13*, 392–402.
- Bieback, K. (2013). Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfusion Medicine and Hemotherapy : Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, *40*, 326–335.

- Bieback, K., Kinzebach, S., & Karagianni, M. (2011). Translating research into clinical scale manufacturing of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells International*, 2010, 193519.
- Bieback, K., Schallmoser, K., Klüter, H., & Strunk, D. (2008). Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy : Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 35, 286–294.
- Billing A. M., Hamidane H. B., Dib S. S., Cotton R. J., Bhagwat A. M., Kumar P., ... Graumann J. (2016). Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Scientific Reports*, 6, 21507.
- Bluguermann, C., Wu, L., Petrigliano, F., McAllister, D., Miriuka, S., & Evseenko, D. A. (2013). Novel aspects of parenchymal-mesenchymal interactions: from cell types to molecules and beyond. *Cell Biochemistry and Function*, 31, 271–80.
- Boland, M., Hazen, J., Nazor, K., Rodriguez, A., Gifford, W., Martin, G., . . . Baldwin, K. (2009). Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*, 461, 91–4.
- Bondue, A., Tannler, S., Chiapparo, G., Chabab, S., Ramialison, M., Paulissen, C., . . . Blanpain, C. (2011). Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 192, 751–765.
- Bottenstein, J. E., & Sato, G. H. (1979). Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 514–517.
- Boyd, N. L., Nunes, S. S., Krishnan, L., Jokinen, J. D., Ramakrishnan, V. M., Bugg, A. R., & Hoying, J. B. (2013). Dissecting the Role of Human Embryonic Stem Cell–Derived Mesenchymal Cells in Human Umbilical Vein Endothelial Cell Network Stabilization in Three-Dimensional Environments. *Tissue Engineering. Part A*, 19, 211–223.
- Boyd, N. L., Robbins, K. R., Dhara, S. K., West, F. D., & Stice, S. L. (2009). Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells. *Tissue Engineering. Part A*, 15, 1897–1907.
- Brand, T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Developmental Biology*, 258, 1–19.
- Brown, S. E., Tong, W., & Krebsbach, P. H. (2009). The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, 189, 256–260.
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M. B. C., & Schallmoser, K. (2016). Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 76, 371–387.
- Burridge, P. W., Keller, G., Gold, J. D., & Wu, J. C. (2012). Production of De Novo Cardiomyocytes: Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Direct Reprogramming. *Cell Stem Cell*, 10, 16–28.
- Burridge, P. W., Thompson, S., Millrod, M. A., Weinberg, S., Yuan, X., Peters, A., . . . Zambidis, E. T. (2011). A Universal System for Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells That Eliminates Interline Variability. *PLoS ONE*, 6, e18293.
- Campbell, K. H., McWhir, J., Ritchie, W. A., & Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380, 64–66.
- Capelli, C., Domenghini, M., Borleri, G., Bellavita, P., Poma, R., Carobbio, A., . . . Introna, M. (2007). Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal

- stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplantation*, *40*, 785–791.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, *9*, 641–650.
- Caplan, A. I. (2008). All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*, *3*, 229–230.
- Carpenter, M. K., Frey-Vasconcells, J., & Rao, M. S. (2009). Developing safe therapies from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, *27*, 606–613.
- Cashman, T. J., Gouon-Evans, V., & Costa, K. D. (2013). Mesenchymal stem cells for cardiac therapy: practical challenges and potential mechanisms. *Stem Cell Reviews*, *9*, 254–265.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, *27*, 275–280.
- Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Ruotti, V., Probasco, M. D., . . . Thomson, J. A. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature Methods*, *8*, 424–429.
- Chen, G., Hou, Z., Gulbranson, D. R., & Thomson, J. A. (2010). Actin-myosin contractility is responsible for the reduced viability of dissociated human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, *7*, 240–248.
- Chen, T. S., Arslan, F., Yin, Y., Tan, S. S., Lai, R. C., Choo, A. B. H., . . . Lim, S. K. (2011). Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *Journal of Translational Medicine*, *9*, 47.
- Chen, T., Yuan, D., Wei, B., Jiang, J., Kang, J., Ling, K., . . . Pei, G. (2010a). E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Contact Is Critical for Induced Pluripotent Stem Cell Generation. *Stem Cells*, *28*, 1315–1325.
- Chen, T., Yuan, D., Wei, B., Jiang, J., Kang, J., Ling, K., . . . Pei, G. (2010b). E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells*, *28*, 1315–1325.
- Chen, W., Zhou, H., Weir, M. D., Tang, M., Bao, C., & Xu, H. H. K. (2013). Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate cement-chitosan-RGD scaffold for bone repair. *Tissue Engineering. Part A*, *19*, 915–927.
- Cheng, P.-P., Liu, X.-C., Ma, P.-F., Gao, C., Li, J.-L., Lin, Y.-Y., . . . Qi, Z.-Q. (2015). iPSC-MSCs Combined with Low-Dose Rapamycin Induced Islet Allograft Tolerance Through Suppressing Th1 and Enhancing Regulatory T-Cell Differentiation. *Stem Cells and Development*, *24*, 1793–1804.
- Chimenti, I., Smith, R. R., Li, T. S., Gerstenblith, G., Messina, E., Giacomello, A., & Marban, E. (2010). Relative Roles of Direct Regeneration Versus Paracrine Effects of Human Cardiosphere-Derived Cells Transplanted Into Infarcted Mice. *Circulation Research*, *106*, 971–980.
- Choi, Y. C., Morris, G. M., & Sokoloff, L. (1980). Effect of platelet lysate on growth and sulfated glycosaminoglycan synthesis in articular chondrocyte cultures. *Arthritis and Rheumatism*, *23*, 220–224.
- Copland, I. B., Garcia, M. A., Waller, E. K., Roback, J. D., & Galipeau, J. (2013). The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy. *Biomaterials*, *34*, 7840–7850.

-
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., . . . Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, *107*, 367–372.
- Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A., & Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, *309*, 1369–1373.
- Da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, *119*, 2204–2213.
- Dahéron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, M. W., Lensch, W. M., Andrews, P. W., . . . Daley, G. Q. (2004). LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, *22*, 770–778.
- De Almeida, D. C., Ferreira, M. R. P., Franzen, J., Weidner, C. I., Frobels, J., Zenke, M., . . . Wagner, W. (2016). Epigenetic Classification of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports*, *6*, 168–175.
- De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., . . . Daley, G. Q. (2015). Hallmarks of pluripotency. *Nature*, *525*, 469–478.
- De Peppo, G. M., Svensson, S., Lennerås, M., Synnergren, J., Stenberg, J., Strehl, R., . . . Karlsson, C. (2010). Human embryonic mesodermal progenitors highly resemble human mesenchymal stem cells and display high potential for tissue engineering applications. *Tissue Engineering. Part A*, *16*, 2161–2182.
- Deng, P., Zhou, C., Alvarez, R., Hong, C., & Wang, C.-Y. (2016). Inhibition of IKK/NF- κ B Signaling Enhances Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *6*, 456–465.
- Deuse, T., Wang, D., Stubbendorff, M., Itagaki, R., Grabosch, A., Greaves, L. C., . . . Schrepfer, S. (2015). SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts. *Cell Stem Cell*, *16*, 33–38.
- Di Giorgio, F. P., Boulting, G. L., Bobrowicz, S., & Eggan, K. C. (2008). Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell*, *3*, 637–648.
- Diederichs, S., & Tuan, R. S. (2014). Functional comparison of human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Stem Cells and Development*, *23*, 1594–1610.
- Dimmeler, S., Zeiher, A. M., & Schneider, M. D. (2005). Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*, 572–583.
- Dodsworth, B. T., Flynn, R., & Cowley, S. A. (2015). The Current State of Naïve Human Pluripotency. *Stem Cells*, *33*, 3181–3186.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*, 315–317.
- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J.-R., Begot, L., Holy, X., & Lataillade, J.-J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *Journal of Cellular Physiology*, *205*, 228–236.
- Eastham, A. M., Spencer, H., Soncin, F., Ritson, S., Merry, C. L. R., Stern, P. L., & Ward, C. M. (2007). Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Research*, *67*, 11254–11262.

- Eastment, C. T., & Sirbasku, D. A. (1980). Human platelet lysate contains growth factor activities for established cell lines derived from various tissues of several species. *In Vitro*, *16*, 694–705.
- Edwards, R. G. (2004). History of embryo stem cells. *Handbook of Stem Cells*, *1*, 1–14.
- Ennis, J., Sarugaser, R., Gomez, A., Baksh, D., & Davies, J. E. (2008). Isolation, characterization, and differentiation of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods in Cell Biology*, *86*, 121–136.
- Era, T., Izumi, N., Hayashi, M., Tada, S., Nishikawa, S., & Nishikawa, S.-I. (2008). Multiple mesoderm subsets give rise to endothelial cells, whereas hematopoietic cells are differentiated only from a restricted subset in embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells*, *26*, 401–411.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*, 154–156.
- Evseenko, D., Zhu, Y., Schenke-Layland, K., Kuo, J., Latour, B., Ge, S., . . . Crooks, G. M. (2010). Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*, 13742–13747.
- Ferrer, L., Kimbrel, E. A., Lam, A., Falk, E. B., Zewe, C., Juopperi, T., . . . Hoffman, A. (2016). Treatment of perianal fistulas with human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells: a canine model of human fistulizing Crohn’s disease. *Regenerative Medicine*, *11*, 33–43.
- Flemming, A., Schallmoser, K., Strunk, D., Stolk, M., Volk, H.-D., & Seifert, M. (2011). Immunomodulative efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in human platelet lysate. *Journal of Clinical Immunology*, *31*, 1143–1156.
- Fox, J. M., Chamberlain, G., Ashton, B. A., & Middleton, J. (2007). Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *British Journal of Haematology*, *137*, 491–502.
- François, S., Bensidhoum, M., Mouiseddine, M., Mazurier, C., Allenet, B., Semont, A., . . . Chapel, A. (2006). Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells*, *24*, 1020–1029.
- Fraser, J. K., Zhu, M., Wulur, I., & Alfonso, Z. (2008). Adipose-derived stem cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *449*, 59–67.
- Freberg, C. T., Dahl, J. A., Timoskainen, S., & Collas, P. (2007). Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Molecular Biology of the Cell*, *18*, 1543–1553.
- Freund, C., Oostwaard, D. W.-V., Monshouwer-Kloots, J., van den Brink, S., van Rooijen, M., Xu, X., . . . Passier, R. (2008). Insulin redirects differentiation from cardiogenic mesoderm and endoderm to neuroectoderm in differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cells*, *26*, 724–733.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *16*, 381–390.
- Frobel, J., Hemeda, H., Lenz, M., Abagnale, G., Jousen, S., Denecke, B., . . . Wagner, W. (2014). Epigenetic rejuvenation of mesenchymal stromal cells derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, *3*, 414–422.

- Fu, X., Chen, Y., Xie, F.-N., Dong, P., Liu, W., Cao, Y., . . . Xiao, R. (2015). Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow. *Tissue Engineering. Part A*, *21*, 616–626.
- Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A. A., Manor, Y. S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., . . . Hanna, J. H. (2013). Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, *504*, 282–6.
- Gao, J., Yan, X.-L., Li, R., Liu, Y., He, W., Sun, S., . . . Mao, N. (2010). Characterization of OP9 as authentic mesenchymal stem cell line. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, *37*, 475–482.
- García, C. P., Videla Richardson, G. A., Romorini, L., Miriuka, S. G., Sevlever, G. E., & Scassa, M. E. (2013). Topoisomerase I inhibitor, camptothecin, induces apoptogenic signaling in human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*, *12*, 400–414.
- Gee, A. (2009). Cell Therapy cGMP Facilities and Manufacturing, 1–254.
- Gill, J. G., Langer, E. M., Lindsley, R. C., Cai, M., Murphy, T. L., Kyba, M., & Murphy, K. M. (2011). Snail and the microRNA-200 family act in opposition to regulate epithelial-to-mesenchymal transition and germ layer fate restriction in differentiating ESCs. *Stem Cells*, *29*, 764–776.
- Ginis, I., Luo, Y., Miura, T., Thies, S., Brandenberger, R., Gerecht-Nir, S., . . . Rao, M. S. (2004). Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology*, *269*, 360–380.
- Giuliani, M., Oudrhiri, N., Noman, Z. M., Vernochet, A., Chouaib, S., Azzarone, B., . . . Bennaceur-Griscelli, A. (2011). Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. *Blood*, *118*, 3254–3262.
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W.-F., & Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, *105*, 2821–2827.
- Godara, P., McFarland, C. D., & Nordon, R. E. (2008). Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *83*, 408–420.
- Gonzalo-Gil, E., Pérez-Lorenzo, M. J., Galindo, M., Díaz de la Guardia, R., López-Millán, B., Bueno, C., . . . Criado, G. (2015). Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cells ameliorate collagen-induced arthritis by inducing host-derived indoleamine 2,3 dioxygenase. *Arthritis Research & Therapy*, *18*, 77.
- Grove, J. E., Bruscia, E., & Krause, D. S. (2004). Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*, *22*, 487–500.
- Gruber, R., Karreth, F., Kandler, B., Fuerst, G., Rot, A., Fischer, M. B., & Watzek, G. (2004). Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets*, *15*, 29–35.
- Gruenloh, W., Kambal, A., Sondergaard, C., McGee, J., Nacey, C., Kalomoiris, S., . . . Nolte, J. A. (2011). Characterization and in vivo testing of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Engineering. Part A*, *17*, 1517–1525.
- Guzzo, R. M., Gibson, J., Xu, R.-H., Lee, F. Y., & Drissi, H. (2013). Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *114*, 480–490.

- Hajizadeh-Saffar, E., Tahamtani, Y., Aghdami, N., Azadmanesh, K., Habibi-Anbouhi, M., Heremans, Y., . . . Baharvand, H. (2015). Inducible VEGF expression by human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cells reduces the minimal islet mass required to reverse diabetes. *Scientific Reports*, *5*, 9322.
- Halfon, S., Abramov, N., Grinblat, B., & Ginis, I. (2011). Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells and Development*, *20*, 53–66.
- Hanley, P. J., Mei, Z., da Graca Cabreira-Hansen, M., Klis, M., Li, W., Zhao, Y., . . . Horwitz, E. M. (2013). Manufacturing mesenchymal stromal cells for phase I clinical trials. *Cytotherapy*, *15*, 416–422.
- Hanna, J. H., Saha, K., & Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues. *Cell*, *143*, 508–525.
- Hao, Q., Zhu, Y.-G., Monsel, A., Gennai, S., Lee, T., Xu, F., & Lee, J.-W. (2015). Study of Bone Marrow and Embryonic Stem Cell-Derived Human Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Escherichia coli Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Stem Cells Translational Medicine*, *4*, 832–840.
- Hara, Y., Steiner, M., & Baldini, M. G. (1980). Platelets as a source of growth-promoting factor(s) for tumor cells. *Cancer Research*, *40*, 1212–1216.
- Harkness, L., Mahmood, A., Ditzel, N., Abdallah, B. M., Nygaard, J. V., & Kassem, M. (2011). Selective isolation and differentiation of a stromal population of human embryonic stem cells with osteogenic potential. *Bone*, *48*, 231–241.
- Hawkins, K., Mohamet, L., Ritson, S., Merry, C. L. R., & Ward, C. M. (2012). E-cadherin and, in its Absence, N-cadherin Promotes Nanog Expression in mES Cells via STAT3 Phosphorylation. *Stem Cells*, *30*, 1842–51. doi:10.1002/stem.1148
- Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anatomica*, *154*, 8–20.
- Himeno, T., Kamiya, H., Naruse, K., Cheng, Z., Ito, S., Kondo, M., . . . Nakamura, J. (2013). Mesenchymal stem cell-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells ameliorate diabetic polyneuropathy in mice. *BioMed Research International*, *2013*, 259187.
- Hu, G., Li, Q., Niu, X., Hu, B., Liu, J., Zhou, S., . . . Deng, Z.-F. (2015). Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice. *Stem Cell Research & Therapy*, *6*, 10.
- Hu, J., Smith, L. A., Feng, K., Liu, X., Sun, H., & Ma, P. X. (2010). Response of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells to osteogenic factors and architectures of materials during in vitro osteogenesis. *Tissue Engineering. Part A*, *16*, 3507–3514.
- Huang, K., Maruyama, T., & Fan, G. (2014). The naive state of human pluripotent stem cells: a synthesis of stem cell and preimplantation embryo transcriptome analyses. *Cell Stem Cell*, *15*, 410–415.
- Hwang, N. S., Varghese, S., Lee, H. J., Zhang, Z., Ye, Z., Bae, J., . . . Elisseeff, J. (2008). In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*, 20641–20646.
- Hynes, K., Menicanin, D., Mrozik, K., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2014). Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells and Development*, *23*, 1084–1096.

- Ishikane, S., Yamahara, K., Sada, M., Harada, K., Kodama, M., Ishibashi-Ueda, H., . . . Ikeda, T. (2010). Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *49*, 753–761.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., . . . Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass)*, *6*, 88–95.
- Iudicone, P., Fioravanti, D., Bonanno, G., Miceli, M., Lavorino, C., Totta, P., . . . Pierelli, L. (2014). Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine*, *12*, 28.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*, 1420–1428.
- Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S., . . . Takahashi, M. (2014). Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports*, *2*, 205–218.
- Kang, E., Wu, G., Ma, H., Li, Y., Tippner-Hedges, R., Tachibana, M., . . . Mitalipov, S. (2014). Nuclear reprogramming by interphase cytoplasm of two-cell mouse embryos. *Nature*, *509*, 101–104.
- Kang, L., Wang, J., Zhang, Y., Kou, Z., & Gao, S. (2009). iPS Cells Can Support Full-Term Development of Tetraploid Blastocyst-Complemented Embryos. *Cell Stem Cell*, *5*, 135–8.
- Kang, R., Zhou, Y., Tan, S., Zhou, G., Aagaard, L., Xie, L., . . . Luo, Y. (2015). Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity. *Stem Cell Research & Therapy*, *6*, 144.
- Karlsson, C., Emanuelsson, K., Wessberg, F., Kajic, K., Axell, M. Z., Eriksson, P. S., . . . Strehl, R. (2009). Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors—potential in regenerative medicine. *Stem Cell Research*, *3*, 39–50.
- Kattman, S. J., Witty, A. D., Gagliardi, M., Dubois, N. C., Niapour, M., Hotta, A., . . . Keller, G. (2011). Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*, *8*, 228–240.
- Ke, Q., Li, L., Cai, B., Liu, C., Yang, Y., Gao, Y., . . . Xiang, A. P. (2013). Connexin 43 is involved in the generation of human-induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics*, *22*, 2221–2233.
- Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, *10*, 709–716.
- Kebriaei, P., Isola, L., Bahceci, E., Holland, K., Rowley, S., McGuirk, J., . . . Uberti, J. (2009). Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *15*, 804–811.
- Kehat, I., Amit, M., Gepstein, A., Huber, I., Itskovitz-Eldor, J., & Gepstein, L. (2003). Development of cardiomyocytes from human ES cells. *Methods in Enzymology*, *365*, 461–473.
- Kennedy, M., D’Souza, S. L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S., & Keller, G. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood*, *109*, 2679–2687.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem*

Cells, 24, 1294–1301.

- Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J. L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., . . . Marini, F. C. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*, 27, 2614–2623.
- Kilian, O., Flesch, I., Wenisch, S., Taborski, B., Jork, A., Schnettler, R., & Jonuleit, T. (2004). Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *European Journal of Medical Research*, 9, 337–344.
- Kim, M.-H., & Kino-oka, M. (2014). Maintenance of undifferentiated state of human induced pluripotent stem cells through cytoskeleton-driven force acting to secreted fibronectin on a dendrimer-immobilized surface. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118, 716–722.
- Kim, Y.-S., Yi, B.-R., Kim, N.-H., & Choi, K.-C. (2014). Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 46, e108.
- Kimbrel, E. A., Kouris, N. A., Yavanian, G. J., Chu, J., Qin, Y., Chan, A., . . . Lanza, R. (2014). Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells and Development*, 23, 1611–1624.
- Kimbrel, E. A., & Lanza, R. (2015). Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14, 681–692.
- Klein, J. D., & Fauza, D. O. (2011). Amniotic and placental mesenchymal stem cell isolation and culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 698, 75–88.
- Koike, M., Sakaki, S., Amano, Y., & Kurosawa, H. (2007). Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104, 294–299.
- Kopher, R. A., Penchev, V. R., Islam, M. S., Hill, K. L., Khosla, S., & Kaufman, D. S. (2010). Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells function as MSC progenitor cells. *Bone*, 47, 718–728.
- Kovacic, B., Rosner, M., Schipany, K., Ionce, L., & Hengstschläger, M. (2015). Clinical impact of studying epithelial-mesenchymal plasticity in pluripotent stem cells. *European Journal of Clinical Investigation*, 45, 415–422.
- Kuehn, M. R., Bradley, A., Robertson, E. J., & Evans, M. J. (1987). A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, 326, 295–298.
- Kumar, N., Richter, J., Cutts, J., Bush, K. T., Trujillo, C., Nigam, S. K., . . . Willert, K. (2015). Generation of an expandable intermediate mesoderm restricted progenitor cell line from human pluripotent stem cells. *eLife*, 4, a000869.
- Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 389–398.
- Kuzmina, L. A., Petinati, N. A., Parovichnikova, E. N., Lubimova, L. S., Griбанова, E. O., Gaponova, T. V., . . . Savchenko, V. G. (2012). Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells International*, 2012, 968213.

- Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., & Lim, S. K. (2015). Mesenchymal stem cell exosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, 82–88.
- Lamouille, S., Subramanyam, D., Belloch, R., & Derynck, R. (2013). Regulation of epithelial–mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions by microRNAs. *Current Opinion in Cell Biology*, 25, 200–207.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15, 178–196.
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., . . . Ringdén, O. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet*, 371, 1579–1586.
- Lee, C., Mitsialis, S. A., Aslam, M., Vitali, S. H., Vergadi, E., Konstantinou, G., . . . Kourembanas, S. (2012). Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 126, 2601–2611.
- Lee, E. J., Lee, H.-N., Kang, H.-J., Kim, K.-H., Hur, J., Cho, H.-J., . . . Kim, H.-S. (2010). Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Tissue Engineering. Part A*, 16, 705–715.
- Lee, J.-K., Park, S.-R., Jung, B.-K., Jeon, Y.-K., Lee, Y.-S., Kim, M.-K., . . . Kim, C.-W. (2013). Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8, e84256.
- Lepage, S. I., Nagy, K., Sung, H.-K., Kandel, R. A., Nagy, A., & Koch, T. G. (2016). Generation, Characterization, and Multilineage Potency of Mesenchymal-Like Progenitors Derived from Equine Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 25, 80–89.
- Li, O., Tormin, A., Sundberg, B., Hyllner, J., Le Blanc, K., & Scheduling, S. (2013). Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stroma cells (hES-MSCs) engraft in vivo and support hematopoiesis without suppressing immune function: implications for off-the shelf ES-MSC therapies. *PLoS ONE*, 8, e55319.
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., . . . Pei, D. (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 7, 51–63.
- Lian, Q., Lye, E., Suan Yeo, K., Khia Way Tan, E., Salto-Tellez, M., Liu, T. M., . . . Lim, S. K. (2007). Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells*, 25, 425–436.
- Lian, Q., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, H. K., Wu, X., Zhang, Y., . . . Tse, H.-F. (2010). Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*, 121, 1113–1123.
- Liu, J., Chen, W., Zhao, Z., & Xu, H. H. K. (2013). Reprogramming of mesenchymal stem cells derived from iPSCs seeded on biofunctionalized calcium phosphate scaffold for bone engineering. *Biomaterials*, 34, 7862–7872.
- Liu, J., Chen, W., Zhao, Z., & Xu, H. H. K. (2014). Effect of NELL1 gene overexpression in iPSC-MSCs seeded on calcium phosphate cement. *Acta Biomaterialia*, 10, 5128–5138.
- Liu, Y., Goldberg, A. J., Dennis, J. E., Gronowicz, G. A., & Kuhn, L. T. (2012). One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PLoS ONE*, 7, e33225.

-
- Loh, Y.-H., Hartung, O., Li, H., Guo, C., Sahalie, J. M., Manos, P. D., . . . Daley, G. Q. (2010). Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell*, *7*, 15–19.
- Lohmann, M., Walenda, G., Hemeda, H., Jousseen, S., Drescher, W., Jockenhoevel, S., . . . Wagner, W. (2012). Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, *7*, e37839.
- Lucchini, G., Introna, M., Dander, E., Rovelli, A., Balduzzi, A., Bonanomi, S., . . . Biagi, E. (2010). Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *16*, 1293–1301.
- Luo, J., Zhao, X., Tan, Z., Su, Z., Meng, F., & Zhang, M. (2013). Mesenchymal-like progenitors derived from human embryonic stem cells promote recovery from acute kidney injury via paracrine actions. *Cytotherapy*, *15*, 649–662.
- Lyons, A. B., Blake, S. J., & Doherty, K. V. (2013). Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Current Protocols in Cytometry /Editorial Board, J. Paul Robinson, Managing Editor ... [et Al.], Chapter 9*, Unit9.11.
- Ma, H., Morey, R., O’Neil, R. C., He, Y., Daughtry, B., Schultz, M. D., . . . Mitalipov, S. (2014). Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature*, *511*, 177–183.
- Macchiarelli, P., Jungebluth, P., Go, T., Asnaghi, M. A., Rees, L. E., Cogan, T. A., . . . Birchall, M. A. (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*, *372*, 2023–2030.
- Mackensen, A., Dräger, R., Schlesier, M., Mertelsmann, R., & Lindemann, A. (2000). Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, *49*, 152–156.
- Maehle, A.-H. (2011). Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes and Records of the Royal Society of London*, *65*, 359–378.
- Mahmood, A., Harkness, L., Schröder, H. D., Abdallah, B. M., & Kassem, M. (2010). Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/activin/nodal signaling using SB-431542. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *25*, 1216–1233.
- Martin, M. J., Muotri, A., Gage, F., & Varki, A. (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Medicine*, *11*, 228–232.
- Menard, C., & Tarte, K. (2013). Immunoregulatory properties of clinical grade mesenchymal stromal cells: evidence, uncertainties, and clinical application. *Stem Cell Research & Therapy*, *4*, 64.
- Mendicino, M., Bailey, A. M., Wonnacott, K., Puri, R. K., & Bauer, S. R. (2014). MSC-Based Product Characterization for Clinical Trials: An FDA Perspective. *Cell Stem Cell*, *14*, 141–145.
- Miao, Q., Shim, W., Tee, N., Lim, S. Y., Chung, Y. Y., Ja, K. P. M. M., . . . Wong, P. (2014). iPSC-derived human mesenchymal stem cells improve myocardial strain of infarcted myocardium. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *18*, 1644–1654.

-
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D. L., Kano, Y., . . . Mori, M. (2011). Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Stem Cell*, 8, 633–638.
- Mojica-Henshaw, M. P., Jacobson, P., Morris, J., Kelley, L., Pierce, J., Boyer, M., & Reems, J.-A. (2013). Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*, 15, 1458–1468.
- Murry, C. E., & Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 132, 661–680.
- Muul, L. M., Heine, G., Silvin, C., James, S. P., Candotti, F., Radbruch, A., & Worm, M. (2011). Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. *Current Protocols in Immunology* /Edited by John E. Coligan ... [et Al.], Chapter 7, Unit7.10.
- Nakajima, Y., Yamagishi, T., Hokari, S., & Nakamura, H. (2000). Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *The Anatomical Record*, 258, 119–127.
- Niehage, C., Steenblock, C., Pursche, T., Bornhauser, M., Corbeil, D., & Hoflack, B. (2011). The Cell Surface Proteome of Human Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS ONE*, 6, e20399.
- Nieto, M. A. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science*, 342, 1234850.
- Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., & Silberstein, L. E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12, 126–131.
- Ohgushi, M., Matsumura, M., Eiraku, M., Murakami, K., Aramaki, T., Nishiyama, A., . . . Sasai, Y. (2010). Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7, 225–239.
- Ohgushi, M., & Sasai, Y. (2011). Lonely death dance of human pluripotent stem cells: ROCKing between metastable cell states. *Trends in Cell Biology*, 21, 274–282.
- Olivier, E. N., Rybicki, A. C., & Bouhassira, E. E. (2006). Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24, 1914–1922.
- Orkin, S. H., & Hochedlinger, K. (2011). Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell*, 145, 835–850.
- Parish, C. R., Glidden, M. H., Quah, B. J. C., & Warren, H. S. (2009). Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Current Protocols in Immunology* /Edited by John E. Coligan ... [et Al.], Chapter 4, Unit4.9.
- Perico, N., Casiraghi, F., Inrona, M., Gotti, E., Todeschini, M., Cavinato, R. A., . . . Remuzzi, G. (2011). Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6, 412–422.
- Pevsner-Fischer, M., Levin, S., & Zipori, D. (2011). The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Reviews*, 7, 560–568.
- Phinney, D. G. (2008). Isolation of mesenchymal stem cells from murine bone marrow by immunodepletion. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 449, 171–186.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284,

143–147.

- Potian, J. A., Aviv, H., Ponzio, N. M., Harrison, J. S., & Rameshwar, P. (2003). Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*, *171*, 3426–3434.
- Psaltis, P. J., Paton, S., See, F., Arthur, A., Martin, S., Itescu, S., ... Zannettino, A. C. W. (2010). Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations. *Journal of Cellular Physiology*, *223*, 530–540.
- Quah, B. J. C., Warren, H. S., & Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*, *2*, 2049–2056.
- Questa, M., Romorini, L., Bluguermann, C., Solari, C. M., Neiman, G., Luzzani, C., ... Miriuka, S. G. (2016). Generation of iPSC line iPSC-FH2.1 in hypoxic conditions from human foreskin fibroblasts. *Stem Cell Research*, *16*, 300–303.
- Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the origin of the term 'stem cell'. *Cell Stem Cell*, *1*, 35–38.
- Ramkisoensing, A. A., Pijnappels, D. A., Askar, S. F. A., Passier, R., Swildens, J., Goumans, M.-J., ... Atsma, D. E. (2011). Human Embryonic and Fetal Mesenchymal Stem Cells Differentiate toward Three Different Cardiac Lineages in Contrast to Their Adult Counterparts. *PLoS ONE*, *6*, e24164.
- Rauch, C., Feifel, E., Amann, E.-M., Spötl, H. P., Schennach, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2011). Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX*, *28*, 305–316.
- Raynaud, C. M., Halabi, N., Elliott, D. A., Pasquier, J., Elefanty, A. G., Stanley, E. G., & Rafii, A. (2013). Human embryonic stem cell derived mesenchymal progenitors express cardiac markers but do not form contractile cardiomyocytes. *PLoS ONE*, *8*, e54524.
- Reis, L. A., Borges, F. T., Simões, M. J., Borges, A. A., Sinigaglia-Coimbra, R., & Schor, N. (2012). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats. *PLoS ONE*, *7*, e44092.
- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., ... Kieffer, T. J. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, *32*, 1121–1133.
- Romorini, L., Riva, D. A., Bluguermann, C., Videla Richardson, G. A., Scassa, M. E., Sevlever, G. E., & Miriuka, S. G. (2013). Effect of antibiotics against Mycoplasma sp. on human embryonic stem cells undifferentiated status, pluripotency, cell viability and growth. *PLoS ONE*, *8*, e70267.
- Romorini, L., Scassa, M. E., Richardson, G. V., Bluguermann, C., de Giusti, C. J., Questa, M., ... Miriuka, S. G. (2012). Activation of apoptotic signalling events in human embryonic stem cells upon Cocksackievirus B3 infection. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, *17*, 132–142.
- Ryan, J. M., Pettit, A. R., Guillot, P. V., Chan, J. K. Y., & Fisk, N. M. (2011). Unravelling the Pluripotency Paradox in Fetal and Placental Mesenchymal Stem Cells: Oct-4 Expression and the Case of the Emperor's New Clothes. *Stem Cell Reviews*, *9*, 408–421.

- Sakamoto, N., Tsuji, K., Muul, L. M., Lawler, A. M., Petricoin, E. F., Candotti, F., . . . Rosenberg, A. S. (2007). Bovine apolipoprotein B-100 is a dominant immunogen in therapeutic cell populations cultured in fetal calf serum in mice and humans. *Blood*, *110*, 501–508.
- Salem, H. K., & Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*, *28*, 585–596.
- Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.-K., Beyer, T. A., Datti, A., . . . Wrana, J. L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, *7*, 64–77.
- Samuel, M. S., & Olson, M. F. (2010). Dying alone: a tale of rho. *Cell Stem Cell*, *7*, 135–136.
- Sánchez, L., Gutierrez-Aranda, I., Ligeró, G., Rubio, R., Muñoz-López, M., García-Pérez, J. L., . . . Menendez, P. (2011). Enrichment of human ESC-derived multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive and anti-inflammatory properties capable to protect against experimental inflammatory bowel disease. *Stem Cells*, *29*, 251–262.
- Santos, F. dos, Andrade, P. Z., Abecasis, M. M., Gimble, J. M., Chase, L. G., Campbell, A. M., . . . Cabral, J. M. S. (2011). Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, *17*, 1201–1210.
- Scassa, M. E., Jaquenod de Giusti, C., Questa, M., Pretre, G., Richardson, G. A. V., Bluguermann, C., . . . Gómez, R. M. (2011). Human embryonic stem cells and derived contractile embryoid bodies are susceptible to Coxsakievirus B infection and respond to interferon I β treatment. *Stem Cell Research*, *6*, 13–22.
- Schallmoser, K., Bartmann, C., Rohde, E., Reinisch, A., Kashofer, K., Stadelmeyer, E., . . . Strunk, D. (2007). Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, *47*, 1436–1446.
- Schallmoser, K., & Strunk, D. (2013). Generation of a pool of human platelet lysate and efficient use in cell culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *946*, 349–362.
- Selvaggi, T. A., Walker, R. E., & Fleisher, T. A. (1997). Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*, *89*, 776–779.
- Sensebé, L., Krampera, M., Schrezenmeier, H., Bourin, P., & Giordano, R. (2010). Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sanguinis*, *98*, 93–107.
- Seshareddy, K., Troyer, D., & Weiss, M. L. (2008). Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. *Methods in Cell Biology*, *86*, 101–119.
- Shih, D. T.-B., & Burnouf, T. (2015). Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *New Biotechnology*, *32*, 199–211.
- Siller, R., Greenhough, S., Naumovska, E., & Sullivan, G. J. (2015). Small-molecule-driven hepatocyte differentiation of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, *4*, 939–952.
- Somers, A., Jean, J.-C., Sommer, C. A., Omari, A., Ford, C. C., Mills, J. A., . . . Kotton, D. N. (2010). Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, *28*, 1728–1740.
- Sommer, C. A., & Mostoslavsky, G. (2010). Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *1*, 26.

- Sommer, C. A., & Mostoslavsky, G. (2013). The evolving field of induced pluripotency: recent progress and future challenges. *Journal of Cellular Physiology*, *228*, 267–275.
- Sommer, C. A., Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, *27*, 543–549.
- Stadtfeld, M., & Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & Development*, *24*, 2239–2263.
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinkas, A., Slaby, O., & Michalek, J. (2012). Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells and Development*, *21*, 2724–2752.
- Sun, Y.-Q., Deng, M.-X., He, J., Zeng, Q.-X., Wen, W., Wong, D. S. H., . . . Fu, Q.-L. (2012). Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice. *Stem Cells*, *30*, 2692–2699.
- Sundin, M., Ringdén, O., Sundberg, B., Nava, S., Götherström, C., & Le Blanc, K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*, *92*, 1208–1215.
- Sze, S. K., de Kleijn, D. P. V., Lai, R. C., Khia Way Tan, E., Zhao, H., Yeo, K. S., . . . Lim, S. K. (2007). Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *6*, 1680–1689.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., . . . Mitalipov, S. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, *153*, 1228–1238.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*, 861–872.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*, 663–676.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *17*, 183–93.
- Takashima, Y., Guo, G., Loos, R., Nichols, J., Ficz, G., Krueger, F., . . . Smith, A. (2014). Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*, *158*, 1254–1269.
- Tam, P. P. L., & Loebel, D. A. F. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nature Reviews Genetics*, *8*, 368–381.
- Tan, H.-K., Toh, C.-X. D., Ma, D., Yang, B., Liu, T. M., Lu, J., . . . Loh, Y.-H. (2014). Human finger-prick induced pluripotent stem cells facilitate the development of stem cell banking. *Stem Cells Translational Medicine*, *3*, 586–598.
- Tavassoli, M., & Crosby, W. H. (1968). Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*, *161*, 54–56.
- Theunissen, T. W., Powell, B. E., Wang, H., Mitalipova, M., Faddah, D. A., Reddy, J., . . . Jaenisch, R. (2014). Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell*, *15*, 471–487.

- Thiel, A., Yavanian, G., Nastke, M.-D., Morales, P., Kouris, N. A., Kimbrel, E. A., & Lanza, R. (2015). Human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells preserve kidney function and extend lifespan in NZB/W F1 mouse model of lupus nephritis. *Scientific Reports*, *5*, 17685.
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*, 131–142.
- Thomson, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*, 1145–1147.
- Till, J. E., & McCulloch, E. A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, *14*, 213–222.
- Todorova, M. G., Soria, B., & Quesada, I. (2008). Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state. *Journal of Cellular Physiology*, *214*, 354–362.
- Tran, N.-T., Trinh, Q.-M., Lee, G. M., & Han, Y.-M. (2012). Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells by modulating intracellular signaling pathways in a feeder/serum-free system. *Stem Cells and Development*, *21*, 1165–1175.
- Tran, T., Wang, X., Browne, C., Zhang, Y., Schinke, M., Izumo, S., & Burcin, M. (2009). Wnt3a Induced Mesoderm Formation and Cardiomyogenesis in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, *27*, 1869–78.
- Trivedi, P., & Hematti, P. (2008). Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Experimental Hematology*, *36*, 350–359.
- Trojahn Kølbe, S.-F., Oliveri, R. S., Glovinski, P. V., Kirchhoff, M., Mathiasen, A. B., Elberg, J. J., . . . Fischer-Nielsen, A. (2013). Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum—investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use. *Cytotherapy*, *15*, 1086–1097.
- Tuschong, L., Soenen, S. L., Blaese, R. M., Candotti, F., & Muul, L. M. (2002). Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Human Gene Therapy*, *13*, 1605–1610.
- Ullmann, U., In't Veld, P., Gilles, C., Sermon, K., De Rycke, M., Van de Velde, H., . . . Liebaers, I. (2007). Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Molecular Human Reproduction*, *13*, 21–32.
- Valencic, E., Piscianz, E., Andolina, M., Ventura, A., & Tommasini, A. (2010). The immunosuppressive effect of Wharton's jelly stromal cells depends on the timing of their licensing and on lymphocyte activation. *Cytotherapy*, *12*, 154–160.
- Villa-Diaz, L. G., Brown, S. E., Liu, Y., Ross, A. M., Lahann, J., Parent, J. M., & Krebsbach, P. H. (2012). Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells*, *30*, 1174–1181.
- Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R., & Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, *394*, 369–374.
- Walenda, G., Hemeda, H., Schneider, R. K., Merkel, R., Hoffmann, B., & Wagner, W. (2012). Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, *18*, 924–934.

- Wallace, P. K., Tario, J. D., Fisher, J. L., Wallace, S. S., Ernstoff, M. S., & Muirhead, K. A. (2008). Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *73*, 1019–1034.
- Wang, D., Akiyama, K., Zhang, H., Yamaza, T., Li, X., Feng, X., . . . Sun, L. (2012). Double allogeneic mesenchymal stem cells transplantations could not enhance therapeutic effect compared with single transplantation in systemic lupus erythematosus. *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*, 273291.
- Wang, D., Zhang, H., Cao, M., Tang, Y., Liang, J., Feng, X., . . . Sun, L. (2011). Efficacy of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in patients with drug-resistant polymyositis and dermatomyositis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *70*, 1285–1288.
- Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, *5*, 19.
- Wang, X., Kimbrel, E. A., Ijichi, K., Paul, D., Lazorchak, A. S., Chu, J., . . . Xu, R.-H. (2014). Human ESC-Derived MSCs Outperform Bone Marrow MSCs in the Treatment of an EAE Model of Multiple Sclerosis. *Stem Cell Reports*, *3*, 115–130.
- Wei, C. L., Miura, T., Robson, P., Lim, S. K., Xu, X. Q., Lee, M. Y.-C., . . . Lim, B. (2005). Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state. *Stem Cells*, *23*, 166–185.
- Wei, H., Tan, G., Manasi, Qiu, S., Kong, G., Yong, P., . . . shim, W. (2012). One-step derivation of cardiomyocytes and mesenchymal stem cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, *9*, 87–100.
- Weiss, M. L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K. B., Weiss, R. J., VanderWerff, I., . . . McIntosh, K. R. (2008). Immune properties of human umbilical cord Wharton’s jelly-derived cells. *Stem Cells*, *26*, 2865–2874.
- Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. *Journal of Cell Science*, *121*, 727–735.
- Whitworth, D. J., Frith, J. E., Frith, T. J. R., Ovchinnikov, D. A., Cooper-White, J. J., & Wolvetang, E. J. (2014). Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Canine Induced Pluripotent Stem Cells by Inhibition of the TGF β /Activin Signaling Pathway. *Stem Cells and Development*, *23*, 3021–33.
- Wilmut, I. (2007). The first direct reprogramming of adult human fibroblasts. *Cell Stem Cell*, *1*, 593–594.
- Witkowski, J. M. (2008). Advanced application of CFSE for cellular tracking. *Current Protocols in Cytometry /Editorial Board, J. Paul Robinson, Managing Editor ... [et Al.], Chapter 9, Unit9.25*.
- Wobus, A. M., & Boheler, K. R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological Reviews*, *85*, 635–678.
- Wu, R., Gu, B., Zhao, X., Tan, Z., Chen, L., Zhu, J., & Zhang, M. (2013). Derivation of multipotent nestin(+)/CD271 (-)/STRO-1 (-) mesenchymal-like precursors from human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Human Cell*, *26*, 19–27.
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., & Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, *19*, 971–974.

- Xu, C., Jiang, J., Sottile, V., McWhir, J., Lebkowski, J., & Carpenter, M. K. (2004). Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. *Stem Cells*, *22*, 972–980.
- Xu, R., Taskin, M. B., Rubert, M., Seliktar, D., Besenbacher, F., & Chen, M. (2015). hiPS-MSCs differentiation towards fibroblasts on a 3D ECM mimicking scaffold. *Scientific Reports*, *5*, 8480.
- Xu, X. Q., Graichen, R., Soo, S. Y., Balakrishnan, T., Rahmat, S. N. B., Sieh, S., . . . Davidson, B. P. (2008). Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Differentiation*, *76*, 958–970.
- Yamanaka, S., & Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, *465*, 704–712.
- Yang, L., Soonpaa, M. H., Adler, E. D., Roepke, T. K., Kattman, S. J., Kennedy, M., . . . Keller, G. M. (2008). Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*, *453*, 524–528.
- Yen, B. L., Chang, C. J., Liu, K.-J., Chen, Y. C., Hu, H.-I., Bai, C.-H., & Yen, M.-L. (2009). Brief report—human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors possess strong immunosuppressive effects toward natural killer cells as well as T lymphocytes. *Stem Cells*, *27*, 451–456.
- Yoo, K. H., Jang, I. K., Lee, M. W., Kim, H. E., Yang, M. S., Eom, Y., . . . Koo, H. H. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cellular Immunology*, *259*, 150–156.
- Zhang, J., Guan, J., Niu, X., Hu, G., Guo, S., Li, Q., . . . Wang, Y. (2015). Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *Journal of Translational Medicine*, *13*, 49.
- Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., . . . Colman, A. (2011). A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell*, *8*, 31–45.
- Zhang, Y., Liang, X., Liao, S., Wang, W., Wang, J., Li, X., . . . Lian, Q. (2015). Potent Paracrine Effects of human induced Pluripotent Stem Cell-derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Doxorubicin-induced Cardiomyopathy. *Scientific Reports*, *5*, 11235.
- Zhang, Y., Liao, S., Yang, M., Liang, X., Poon, M.-W., Wong, C.-Y., . . . Lian, Q. (2012). Improved cell survival and paracrine capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells promote therapeutic potential for pulmonary arterial hypertension. *Cell Transplantation*, *21*, 2225–2239.
- Zhao, Q., Gregory, C. A., Lee, R. H., Reger, R. L., Qin, L., Hai, B., . . . Liu, F. (2015). MSCs derived from iPSCs with a modified protocol are tumor-tropic but have much less potential to promote tumors than bone marrow MSCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*, 530–535.
- Zhao, X., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., . . . Zhou, Q. (2009). iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, *461*, 86–90.
- Zhou, Q., & Melton, D. (2008). Extreme Makeover: Converting One Cell into Another. *Cell Stem Cell*, *3*, 382–8.

Zou, L., Luo, Y., Chen, M., Wang, G., Ding, M., Petersen, C. C., . . . Büniger, C. (2013). A simple method for deriving functional MSCs and applied for osteogenesis in 3D scaffolds. *Scientific Reports*, 3, 2243.

8. Apéndice

En este apéndice se resumen los estudios publicados en los cuales se desarrollaron o utilizaron CMM-DP. Se realiza una breve descripción del protocolo utilizado para generar las células mesenquimales y una descripción de los principales resultados.

- ***Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth.*** (Chunhui Xu et al., 2004)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: 4 días en suspensión en DMEM + SFB 20 % en forma de cuerpos embrioides, luego adherencia.
 - Resultados principales: Los autores derivan células fibroblásticas, las cuales inmortalizan para utilizarlas como *feeder cells* para las CMEh.
- ***Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells.*** (Barberi et al., 2005)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Co-cultivo con células inductora mesenquimal OP9 en α -MEM + SFB 20 % y *sorting* para células CD73(+).
 - Resultados principales: Obtienen un 5 % de células CD73(+) luego de 40 días de diferenciación. El fenotipo mesenquimal lo demuestran por marcadores de superficie y diferenciación a multipotencia. Realizan un microarreglo el cual comparan con CMM de médula ósea y encuentran similitudes con el fenotipo mesenquimal.
- ***Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells.*** (Olivier et al., 2006)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Raspado y sub-cultivo de CMEh diferenciadas de los bordes de las colonias; luego continúan el cultivo por 4 semanas con cambios mínimos de medio DMEM + SFB 10 %.
 - Resultados principales: Caracterizan por citometría de flujo la expresión de marcadores clásicos DE CMM (CD44, CD71, CD73, CD105, CD166); describen la diferenciación multipotente de las células.
- ***Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs.*** (Lian et al., 2007)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Las CMP fueron primero tripsinizadas, y luego cultivadas en DMEM + SFB 20 % + FGF2 + PDGF-AB; luego de 7 días realizaron un *sorting* para CD105(+)/CD24(-) y continuaron el cultivo.
 - Resultados principales: Las células generadas fueron positivas para marcadores de superficie de CMM y presentaron capacidad de diferenciación multipotente; realizaron

- una comparación por micro-arreglo de las diferencias de expresión de genes entre CMM-DP y CMM de médula ósea y hallaron una concordancia significativa en la expresión de genes mesenquimales entre estas dos poblaciones. Es de destacar que el primer pasaje en el inicio de la diferenciación se realizó con tripsina, ya que el uso de colagenasa no fue efectivo.
- ***Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells.*** (Sze et al., 2007)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Lian y colaboradores (Lian et al., 2007).
 - Resultados principales: Análisis comparativo de la proteómica del sobrenadante de las CMM-DP y de las CMM-MO. Los autores observaron similitudes entre los dos tipos celulares.
 - ***Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells.*** (Trivedi & Hematti, 2008)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Las CMEh fueron crecidas en Matrigel, con medio condicionado de iMEF, el cual se extendía el cambio a cada 3 a 5 días. Luego de unos 10 días extraían los centros de colonias que aun persistían indiferenciadas y sub-cultivaban las células diferenciadas remanentes. Luego eran cultivadas en α -MEM + SFB 10%.
 - Resultados principales: Las células diferenciadas demostraron multipotencia, marcadores típicos de CMM, y capacidad de inmunomodular una respuesta de proliferación de linfocitos *in vitro*.
 - ***In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells.*** (Hwang et al., 2008)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Se generaron cuerpos embrioides cultivados en suspensión por 10 días, y luego por otros 10 días en adherencia (no aclara en que medio fueron cultivadas durante este periodo); las células que crecían alrededor de los cuerpos eran mecánicamente separadas y cultivadas en DMEM + SFB 10%.
 - Resultados principales: Las células generadas presentaban marcadores típicos de CMM; se indujo diferenciación a condroblastos y se aplicaron en modelos *in vivo* de reparación de lesiones condrales en rata con buenos resultados.
 - ***The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells.*** (Brown, Tong, & Krebsbach, 2009)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Generación de cuerpos embrioides en suspensión por 7 días en medio para CMP, luego adheridos hasta confluencia en α -MEM + SFB 10% + bFGF 4 ng/ml y pasados sucesivamente hasta obtener morfología de fibroblastos.

-
- Resultados principales: Confirmación de la diferenciación a CMM-DP por marcadores de superficie y multipotencia.
 - ***Brief report-human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors possess strong immunosuppressive effects toward natural killer cells as well as T lymphocytes.*** (Yen et al., 2009)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Olivier (Olivier et al., 2006) .
 - Resultados principales: Efecto de inmunomodulación similar entre las CMM-DP y las CMM-MO en los linfocitos CD4+ y CD8+; efecto de inhibición más potente de linfocitos NK por parte de las CMM-DP en comparación con las CMM-MO.
 - ***Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors-potential in regenerative medicine.*** (Karlsson et al., 2009)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Las células eran pasadas a estado unicelular sobre gelatina y cultivadas en DMEM + SFB 10% + bFGF 10ng/ml. Sucesivos pasajes eran necesarios hasta alcanzar una morfología homogénea similar a fibroblastos.
 - Resultados principales: Caracterización estándar de las características de CMM-DP (multipotencia y marcadores de superficie). Además, las implantaron en ratones *nude* y obtuvieron crecimientos de masas de tejidos mesenquimales (cartilago por ejemplo), pero no teratomas.
 - ***Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells.*** (Boyd, Robbins, Dhara, West, & Stice, 2009)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Crecimiento de colonias de CMEh sobre laminina hasta sub-confluencia, y luego cambio de medio a EGM2-MV (un medio de diferenciación endotelial) por 20-30 días. Luego pasajes con tripsina hasta homogeneizar el cultivo de células mesenquimales.
 - Resultados principales: Los autores describen la formación de un epitelio en los primeros 20-30 días, y luego una TEM para luego generar las CMM.
 - ***Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells.*** (Arpornmaeklong, Brown, Wang, & Krebsbach, 2009)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Similad a Olivier y colaboradores (Olivier et al., 2006).
 - Resultados principales: Los autores demostraron una buena capacidad osteogénica de las CMM-DP *in vitro* e *in vivo*.

-
- ***Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/activin/nodal signaling using SB-431542.*** (Mahmood et al., 2010)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Similar a (Hwang et al., 2008), pero con un medio definido: DMEM/F12 suplementado con albúmina, lípidos, ITS y el inhibidor de SMADs 2 y 3 SB431245 (1 μ M).
 - Resultados principales: La inhibición de la vía de TGF/Noggin/Nodal con el SB431245 aumentó la diferenciación a CMM-DP.
 - ***Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells.*** (E. J. Lee et al., 2010)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Generación de CE en suspensión por 14 días en medio de CMEh sin bFGF; luego adherencia en DMEM + SFB 10 % por 16 días; finalmente las células continuaron en mantenimiento en el medio endotelial EGM2-MV.
 - Resultados principales: Caracterización de las CMM-DP por marcadores de superficie y multipotencia; las células demostraron efectividad en reducir el tamaño de un infarto de miocardio en ratones.
 - ***Human embryonic mesodermal progenitors highly resemble human mesenchymal stem cells and display high potential for tissue engineering applications.*** (de Peppo et al., 2010)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Karlsson y colaboradores (Karlsson et al., 2009).
 - Resultados principales: Las CMM-DP son mucho más similares en su expresión génica a CMM-MO que a las CMEh; las CMM-DP presentan una tasa de replicación más alta que las CMM-MO con telómeros más largos; las CMM-DP presentan menos expresión de MHC-II que las CMM-MO luego de la estimulación con interferón.
 - ***Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells function as MSC progenitor cells.*** (Kopher et al., 2010)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Co-cultivo con una línea celular de CMM-MO murinas y posterior *sorting* para células CD73+ y/o CD34+.
 - Resultados principales: Obtienen CMM-DP en la población CD73+CD34-; argumentan que las células CD73-/CD34+ también presentan características mesenquimales, pero su perfil de expresión génica es diferente, la cual incluye a genes de indiferenciación y de endotelio.
 - ***Response of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells to osteogenic factors and architectures of materials during in vitro osteogenesis.***

(J. Hu et al., 2010)

- Células: CMEh
- Protocolo de diferenciación: Generación y cultivo de cuerpos embrioides por 10 días, con posterior adherencia en α -MEM + SFB 20% + bFGF 1 ng/ml durante dos semanas.
- Resultados principales: Gran potencial osteogénico *in vitro* e *in vivo* de las CMM-DP, particularmente luego de cultivarlas con BMP-7 y dexametasona.

- ***Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs.*** (T. S. Chen et al., 2011)

- Células: CMEh
- Protocolo de diferenciación: Línea de CMM-DP inmortalizada a partir de las células generadas por Lian y colaboradores (Lian et al., 2007).
- Resultados principales: Describen la producción de exomas por parte de las CMM-DP.

- ***Human Embryonic and Fetal Mesenchymal Stem Cells Differentiate toward Three Different Cardiac Lineages in Contrast to Their Adult Counterparts.*** (Ramkisoensing et al., 2011)

- Células: No descriptas.
- Protocolo de diferenciación: No descrito.
- Resultados principales: Mayor potencial de diferenciación a cardiomiocitos de las CMM-DP que las CMM adultas.

- ***Selective isolation and differentiation of a stromal population of human embryonic stem cells with osteogenic potential.*** (Harkness et al., 2011)

- Células: CMEh
- Protocolo de diferenciación: Diferenciación espontánea de las CMEh crecidas sobre Matrigel en medio condicionado de iMEF, posteriormente seleccionadas por medio de la adherencia a ácido hialurónico.
- Resultados principales: Las CMM-DP presentaban las características mesenquimales en los marcadores de superficie y un gran potencial osteogénico.

- ***Enrichment of human ESC-derived multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive and anti-inflammatory properties capable to protect against experimental inflammatory bowel disease.*** (Sánchez et al., 2011)

- Células: CMEh y CMPi
- Protocolo de diferenciación: Diferenciación inducida por cultivo con el inhibidor de TGF-beta SB431245 por 30 días y posterior *sorting* para CD73+/CD90+.

- Resultados principales: Las CMM-DP presentaban una inhibición potente de la respuesta proliferativa de linfocitos *in vitro* y un efecto inmunomodulador positivo en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal en ratones.
- ***Characterization and in vivo testing of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells.*** (Gruenloh et al., 2011)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Trivedi y colaboradores (Trivedi & Hematti, 2008) .
 - Resultados principales: Las CMM-DP migraron a la zona de isquemia en un modelo experimental de isquemia de miembro en ratones.
- ***Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery.*** (Giuliani et al., 2011)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Cultivo por 4 semanas en DMEM/F12 + SFB 10 %.
 - Resultados principales: Las CMM-Dp resultaron más potentes que las CMM-MO en la inhibición de las células NK.
- ***A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects.*** (Jinqiu Zhang et al., 2011)
 - Células: CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Xu y colaboradores (Chunhui Xu et al., 2004).
 - Resultados principales: Desarrollo de CMM-DP para demostrar sus alteraciones en un modelo *in vitro* de la Progeria (envejecimiento acelerado).
- ***One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating.*** (Liu, Goldberg, Dennis, Gronowicz, & Kuhn, 2012)
 - Células: CMEh y CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: CMP resuspendidas a unicelular con Accutasse y iROCK; cultivadas por 10 días en α -MEM + SFB 10 % + dexametasona; luego pasadas sobre platos cubiertos de colágeno.
 - Resultados principales: Diferenciación en un solo paso sin separación mecánica; demostración de CMM-DP por medio presencia de marcadores de superficie y de multipotencia.
- ***Improved cell survival and paracrine capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells promote therapeutic potential for pulmonary arterial hypertension.*** (Y. Zhang et al., 2012)
 - Células: CMEh

- Protocolo de diferenciación: Diferenciación en DMEM + SFB10% + bFGF 10 ng/ml + PDGFAB 10 ng/ml + EGF 10 ng/ml; a los 7 días *sorting* para células CD105+/CD24-. Finalmente, realizaron un crecimiento clonal de colonias crecidas a partir de la población CD105+/CD24-.
- Resultados principales: Utilización de las CMM-DP en un modelo de hipertensión pulmonar en ratones. Las CMM-DP fueron más efectivas en reducir las presiones pulmonares que las CMM-MO. Además, demuestran que las CMM-DP se integraron a las arterias pulmonares y diferenciaron a células endoteliales.
- ***Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells by modulating intracellular signaling pathways in a feeder/serum-free system.*** (N.-T. Tran, Trinh, Lee, & Han, 2012)
 - Células: CMEh y CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: CMP en medio condicionado + bFGF 10 ng/ml por dos días, luego 3 días en DMEM/F12 + KSR 20% + Activina-A 5 ng/ml + BIO + BMP4 20 mg/ml; luego 10 días en α -MEM + KSR10% + bFGF 10 ng/ml + EGF 10 ng/ml. Finalmente, *sorting* para células CD105+.
 - Resultados principales: Los autores demuestran que es posible la diferenciación a CMM-DP modulando las señales en un medio definido.
- ***Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice.*** (Sun et al., 2012)
 - Células: CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Xu y colaboradores (Chunhui Xu et al., 2004) .
 - Resultados principales: Utilizan las CMM-DP en un modelo de alergia respiratoria en ratones.
- ***One-step derivation of cardiomyocytes and mesenchymal stem cells from human pluripotent stem cells.*** (H. Wei et al., 2012)
 - Células: CMEh y CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: Explantes de células no cardíacas diferenciadas en un protocolo específico para la diferenciación cardíaca.
 - Resultados principales: Los autores demuestran que durante la diferenciación orientada a células cardíacas se producen de manera asociada CMM-DP.
- ***Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates.*** (Villa-Diaz et al., 2012)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Cultivo por 7 días en cuerpos embrioides suspendidos en medio de CMEh sin bFGF. Luego adherencia por 2 semanas en α -MEM suplementado con SFB 10% hasta alcanzar confluencia.

- Resultados principales: Desarrollo de CMM-DP a partir de CMP crecidas en un medio definido con un matriz extracelular definida. Las células mesenquimales fueron aptas para regenerar hueso *in vivo*.
- ***Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate cement-chitosan-RGD scaffold for bone repair.*** (W. Chen et al., 2013)
 - Células: CMEh y CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: CMP confluentes fueron cultivadas en DMEM/F12 + KSR20 % + SB431245 por 10 días; posteriormente las células se pasaban a DMEM + SFB10 %.
 - Resultados principales: Método con componentes definidos durante la diferenciación. Las CMM-DP se diferenciaban de forma robusta a condroblastos y osteoblastos, pero menos a adipocitos.
- ***Mesenchymal stem cell-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells ameliorate diabetic polyneuropathy in mice.*** (Himeno et al., 2013)
 - Células: CMPi de ratón.
 - Protocolo de diferenciación: CE generados por *hanging drop* por 2 días en α -DMEM + SFB 10 %, luego transferidos a adherencia por 3 días agregando ácido trans-retinoico.
 - Resultados principales: CMM-DP utilizadas en un modelo de polineuropatía diabética en ratones.
- ***Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stroma cells (hES-MSCs) engraft in vivo and support hematopoiesis without suppressing immune function: implications for off-the shelf ES-MSC therapies.*** (O. Li et al., 2013)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Línea comercial de CMM-DP.
 - Resultados principales: CMM-DP utilizadas para incrementar el *engraftment* de las células hematopoyéticas en un modelo de trasplante de médula ósea en ratones.
- ***Human embryonic stem cell derived mesenchymal progenitors express cardiac markers but do not form contractile cardiomyocytes.*** (Raynaud et al., 2013)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: CMEh crecidas en mTSER sobre Matrigel, pasadas a DMEM + SFB 20 % por 18 días.
 - Resultados principales: Las CMM-DP presentan una diferenciación parcial a cardiomiocitos, sin actividad contráctil.
- ***Dissecting the Role of Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Cells in Human Umbilical Vein Endothelial Cell Network Stabilization in Three-Dimensional Environments.*** (Boyd et al., 2013)
 - Células: CMEh

- Protocolo de diferenciación: Similar a Boyd y colaboradores (Boyd et al., 2009).
 - Resultados principales: Desarrollo de un modelo in vivo de formación de vasos vasculares mediante la inyección de CMM-DP y HUVEC. Las CMM-DP ayudan en la formación del vaso y se integran como pericitos.
- ***Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells.*** (Guzzo, Gibson, Xu, Lee, & Drissi, 2013)
 - Células: CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: Disgregación con Accutase y posterior cultivo en adherencia en gelatina en DMEM + SFB 10% + bFGF 5ng/ml.
 - Resultados principales: Descripción de un desarrollo de condrocitos a partir de CMM-DP.
- ***Derivation of multipotent nestin(+)/CD271 (-)/STRO-1 (-) mesenchymal-like precursors from human embryonic stem cells in chemically defined conditions.*** (Wu et al., 2013)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Dispersión unicelular y cultivo prolongado en DMEM + N2B27 + bFGF 5 ng/ml y iROCK.
 - Resultados principales: Desarrollan una célula con características mesenquimales, pero CD271- y nestina+, en un medio que característicamente induce neuronas. La expresión de marcadores de superficie y la multipotencia demuestran cierto fenotipo de CMM-DP sin embargo.
- ***Mesenchymal-like progenitors derived from human embryonic stem cells promote recovery from acute kidney injury via paracrine actions.*** (Luo et al., 2013)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Dispersión unicelular y posteriorcultivo con DMEM + SFB10% + iROCK por varios pasajes.
 - Resultados principales: Las CMM-DP demostraron disminuir el daño en un modelo de injuria renal aguda en ratones.
- ***Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate cement-chitosan-RGD scaffold for bone repair.*** (W. Chen et al., 2013)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Arpornmaeklong (Arpornmaeklong et al., 2009)
 - Resultados principales: Generación de una matriz para reemplazo óseo compuesta por CMM-DP y RGD, chitosano, y fosfato de calcio.
- ***Reprogramming of mesenchymal stem cells derived from iPSCs seeded on bio-functionalized calcium phosphate scaffold for bone engineering.*** (J. Liu, Chen, Zhao, & Xu, 2013)

- Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Arpornmaeklong y colaboradores (Arpornmaeklong et al., 2009)
 - Resultados Principales: Generación de una matriz de fosfato de calcio y RGD, pero con CMM-DP modificadas genéticamente para secretar BMP-2.
- ***A simple method for deriving functional MSCs and applied for osteogenesis in 3D scaffolds.*** (Zou et al., 2013)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Diferenciación en DMEM+SFB10% por 14 días y luego sucesivos pasajes.
 - Resultados principales: Integración de las CMM-DP a estructuras tridimensionales de polilactona; las CMM-DP generan osteocitos en este contexto.
- ***Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines.*** (Hynes, Menicanin, Mrozik, Gronthos, & Bartold, 2014)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Utilizaron el reemplazo del medio por α -MEM + SFB 10% y lo mantuvieron por largos pasajes (>5).
 - Resultados principales: Generación de CMM-DP de CMPi originadas de diferentes fuentes (encías, ligamento periodontal y pulmón).
- ***Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties.*** (Kimbrel et al., 2014)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: CE cultivados en medio (hematopoyético) Stemline II + BMP4 50 ng/ml + VEGF 50 ng/ml por 4 días con bFGF 22.5 ng/ml en los últimos dos; Luego los CE fueron resuspendidos unicelular en el gel Methocult en medio Excite + VEGF + Ftl3-ligand + trombopoyetina + bFGF por 7-12 días; finalmente fueron pasadas a α -MEM + SFB20%.
 - Resultados principales: Generación de CMM-DP a través de un protocolo complejo y descripción de las propiedades inmunomoduladoras potentes de las células; efectos inmunomoduladores positivos en modelos de lupus y uveítis experimental en ratón.
- ***Human ESC-Derived MSCs Outperform Bone Marrow MSCs in the Treatment of an EAE Model of Multiple Sclerosis.*** (X. Wang et al., 2014)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Kimbrel y colaboradores (Kimbrel et al., 2014).
 - Resultados principales: Efectos potentes de inmunomodulación de las CMM-DP (inclusive mayor que las CMM-MO) en un modelo experimental de esclerosis múltiple en

ratón.

- ***Functional comparison of human induced pluripotent stem cell derived mesenchymal cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from the same donor.*** (Diederichs & Tuan, 2014)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: CE en suspensión por 3 días en DMEM + SFB 20% y luego en adherencia en gelatina por 8 días.
 - Resultados principales: Generación de CMM-DP a partir de CMPi derivadas de CMM-MO. Posteriormente compararon los dos tipos de células mesenquimales y encontraron similitudes y diferencias entre las mismas.
- ***iPSC-derived human mesenchymal stem cells improve myocardial strain of infarcted myocardium.*** (Miao et al., 2014)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Wei y colaboradores (H. Wei et al., 2012)
 - Resultados principales: Efectos positivos de las CMM-DP en un modelo de infarto de miocardio en ratón.
- ***Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Canine Induced Pluripotent Stem Cells by Inhibition of the TGF β /Activin Signaling Pathway.*** (Whitworth et al., 2014)
 - Células: CMPi caninas
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Chen y colaboradores (W. Chen et al., 2013)
 - Resultados principales: Generación de CMM-DP caninas.
- ***Epigenetic rejuvenation of mesenchymal stromal cells derived from induced pluripotent stem cells.*** (Frobel et al., 2014)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Cambio de medio a LP 10% por 7 días y luego sucesivos pasajes.
 - Resultados principales: Describen un rejuvenecimiento, expresado por la longitud de los telómeros, de las CMM-DP en comparación con las CMM-MO. Este estudio, publicado mientras se desarrollaba esta tesis doctoral, utiliza lisado de plaquetas como suplemento del medio de cultivo. Sin embargo, no realizan un detalle del método ni de una caracterización celular.
- ***Effect of NELL1 gene overexpression in iPSC-MSCs seeded on calcium phosphate cement.*** (J. Liu, Chen, Zhao, & Xu, 2014)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Arpornmaeklong (Arpornmaeklong et al., 2009)

- Resultados principales: Efectos de una CMM-DP genéticamente modificada para mejorar las propiedades de un cemento odontológico.
- *hiPS-MSCs differentiation towards fibroblasts on a 3D ECM mimicking scaffold.* (R. Xu et al., 2015)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Zou y colaboradores (Zou et al., 2013).
 - Resultados principales: Integración de las CMM-DP a una estructura tridimensional (hidrogel de polilactona mas fibrinógeno) generando diferenciación de los mismo a fibroblastos.
- *MSCs derived from iPSCs with a modified protocol are tumor-tropic but have much less potential to promote tumors than bone marrow MSCs.* (Q. Zhao et al., 2015)
 - Células: CMPi
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Olivier y colaboradores (Olivier et al., 2006).
 - Resultados principales: Evaluación de la capacidad de integración de las CMM-DP a tumores.
- *Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cells ameliorate collagen induced arthritis by inducing host-derived indoleamine 2,3 dioxygenase.*(Gonzalo-Gil et al., 2015)
 - Células: CMEh
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Sanchez y colaboradores.
 - Resultados principales: Las CMM-DP redujeron significativamente la inflamación de la artritis reumatoide inducida. Se observó un incremento de las células T reguladoras en los animales. El efecto parece estar mediado por un incremento de la secreción deIDO por parte de las células del huésped.
- *iPSC-MSCs Combined with Low-Dose Rapamycin Induced Islet Allograft Tolerance Through Suppressing Th1 and Enhancing Regulatory T-Cell Differentiation.* (Cheng et al., 2015)
 - Células: CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: No descrito.
 - Resultados principales: La combinación de CMM-DP más rapamicina incrementó significativamente el tiempo de sobrevida de islotes pancreáticos transplantados en ratones diabéticos. Esto se asoció a un incremento de las células T reguladoras.
- *Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity.* (R. Kang et al., 2015)
 - Células: CMPi.

- Protocolo de diferenciación: Similar a Zou y colaboradores (Zou et al., 2013).
- Resultados principales: Las CMM-DP presentaron una adecuada diferenciación a condroblastos y osteoblastos, comparable a CMM-MO, pero deficiente diferenciación a adipocitos.
- ***Study of Bone Marrow and Embryonic Stem Cell-Derived Human Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Escherichia coli Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice.*** (Hao et al., 2015).
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: No descrito.
 - Resultados principales: Las CMM-DP redujeron significativamente el daño causado por la injuria aguda pulmonar inducida por E. coli en un modelo de ratón. El efecto no fue diferente comparado con CMM-MO.
- ***Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice.*** (G. Hu et al., 2015)
 - Células: CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Zou y colaboradores (Zou et al., 2013).
 - Resultados principales: Se utilizaron exosomas de CMM-DP en un modelo de isquemia de extremidad en ratas. La inyección de exosomas mejoró significativamente la perfección de la extremidad a las 30 días.
- ***Inducible VEGF expression by human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cells reduces the minimal islet mass required to reverse diabetes.*** (Hajizadeh-Saffar et al., 2015).
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Trivedi y colaboradores (Trivedi & Hematti, 2008)
 - Resultados principales: Realizaron un co-transplante de islotes pancreáticos con CMM-DP modificadas genéticamente para sobreexpresar VEGF. Esto resultó en una mejor aceptación y funcionamiento de los implantes en ratones diabéticos.
- ***Potent Paracrine Effects of human induced Pluripotent Stem Cell-derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Doxorubicin-induced Cardiomyopathy.*** (Y. Zhang et al., 2015)
 - Células: CMPi.
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Lian y colaboradores (Lian et al., 2010).
 - Resultados principales: Las CMM-DP presentaron mejor protección que CMM-MO en un modelo de cardiomiopatía inducido por doxorubicina. Este efecto sería mediado por MIF y GDF-15 secretado únicamente por las CMM-DP.

-
- ***Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow.*** (Fu et al., 2015)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Hu y colaboradores (J. Hu et al., 2010).
 - Resultados principales: Realizaron un análisis extenso comparando CMM-DP con CMM-MO. Si bien presentaron diferencias en la expresión de algunas moléculas relacionadas con la capacidad inmunológica, no presentaron diferencias funcionales la momento de ser comparadas en un ensayo re reacción mixta de linfocitos.
 - ***Generation, Characterization, and Multilineage Potency of Mesenchymal-Like Progenitors Derived from Equine Induced Pluripotent Stem Cells.*** (Lepage et al., 2016)
 - Celulas: CMPi equinas.
 - Protocolo de diferenciación: Suspensión unicelular sobre platos cubiertos con gelatina y posterior cultivo en DMEM + SFB 10 % + SB431245 10 μ M + bFGF 5 ng/ml. Una vez confluentes se pasaron a DMEM + SFB 10 %.
 - Resultados principales: Derivación de CMM-DP en células equinas.
 - ***Inhibition of IKK/NF- κ B Signaling Enhances Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells from Human Embryonic Stem Cells.*** (Deng, Zhou, Alvarez, Hong, & Wang, 2016)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Las colonias de células se levantaron con colagenasa y se colocaron en cultivo con DMEM + SFB 15 %. A las 24 horas le agregaron IKKi 1 μ M (un inhibidor de NF-kB) al medio y cultivadas por 7días. Posteriormente se pasaban en forma unicelular con tripsina, sin describir en detalle a partir de este paso.
 - Resultados principales: El uso de IKKi generó una derivación de CMM-DP más rápida que el control.
 - ***Treatment of perianal fistulas with human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells: a canine model of human fistulizing Crohn's disease.*** (Ferrer et al., 2016)
 - Células: CMEh.
 - Protocolo de diferenciación: Similar a Kimbrel y colaboradores (Kimbrel et al., 2014).
 - Resultados principales: Reportan los resultados del uso de CMM-DP en perros con fistulas personales similares a la enfermedad de Crohn en humanos. Se observó un buen resultado a 3 meses, pero con relapso en 2 animales (de 6) a los 6 meses. Se utilizó ciclosporina para inducir la tolerancia a las células.
 - ***Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers.*** (Billing et al., 2016)

- Células: CMEh.
- Protocolo de diferenciación: Similar a Raynaud y colaboradores (Raynaud et al., 2013).
- Resultados principales: Los autores realizaron una caracterización extensa de las CMM-DP por medio de RNA-seq y de proteómica y compararon los resultados contra CMM-MO. Las conclusiones avalan que las CMM-DP son células mesenquimales, pero que distan tanto de las CMM-MO como éstas de otras CMM, concluyendo entonces que las CMM-DP son una célula única en su tipo.

