

Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante **Dr. Alejandro Erices O.** Departamento de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Andrés Bello

Profesor Co-Patrocinante **Dra. Gloria León R.** Instituto de Bioquímica Facultad de Ciencias Universidad Austral de Chile

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN COMPARATIVA DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS PRESENTES EN LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y MÉDULA ÓSEA HUMANAS

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de *Licenciado en Bioquímica* y Título Profesional de *Bioquímico*

PAMELA ALEJANDRA JARAMILLO FERRADA

VALDIVIA – CHILE

2005

....Hay un tiempo para cada cosa, y un momento para hacerla bajo el cielo: Hay tiempo de nacer y tiempo de morir; tiempo para plantar y tiempo para arrancar lo plantado. Un tiempo para dar muerte, y tiempo para sanar, un tiempo para destruir y un tiempo para construir. Un tiempo para llorar y otro para reír, un tiempo para los lamentos y otro para las danzas. Un tiempo para lanzar piedras y otro para recogerlas, un tiempo para rasgar y otro para coser. Hay un tiempo para amar y otro para odiar, hay tiempo para la guerra y tiempo para la paz.... Eclesiastés 3

Con amor a mis abuelos Erna y Raúl

AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras de agradecimientos son para mi familia, en especial para mis abuelos, quienes me han apoyado constantemente a lo largo de mis estudios y en especial durante esta etapa de culminación de mi carrera universitaria. A mi mamá y a Juan, por su apoyo incondicional y por estar siempre conmigo en los momentos difíciles, recordándome seguir intentando alcanzar mis metas. A mis hermanas Consuelo, Teresita y Camila, a Tatiana, Juan, Maria y familia, por el cariño que me han regalado durante esta etapa.

Al Dr Alejandro Erices, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por su constante apoyo y ayuda durante la realización y conducción de este trabajo de tesis.

A los Dres José Minguell y Cecilia Rojas de la Clínica Las Condes e Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA, UCh) respectivamente, por su ayuda durante la realización de este trabajo y permanente disposición para la discusión de resultados.

A la Sra Valeska Simon del Laboratorio de Criopreservación de médula ósea de la Clínica Las Condes, por el excelente apoyo brindado en los análisis mediante citometría de flujo.

A mis compañeros de laboratorio, tanto del INTA como del Departamento de Ciencias Biológicas de la UNAB: María José, Juan Pablo, Marisol, Fernando, Pancho, Lorena, Anita, Laura, Cristina, Claudia, Mauricio, Rodrigo P. y Rodrigo A., no solo por su ayuda en la realización experimental de esta tesis, sino en especial por los gratos momentos que compartimos, lo cual ayudo a que cada día de trabajo fuera más alegre. En especial a Laura y Anita, por su cariño y apoyo cada vez que lo necesité.

A mi gran amiga María José, por su incondicional amistad y apoyo durante todos estos años. También a sus padres Margarita y Jaime, y a su pareja Luis, por la fuente inagotable de alegría y cariño que representan para mi. Esta tesis fue financiada por el proyecto 1030304 del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología FONDECYT.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

			1 agiii
ÍNI	DICE DE	CONTENIDOS	
ÍNI	DICE DE	FIGURAS	
LIS	TA DE	ABREVIATURAS	
1.	RESU	MEN	1
1.1	SUMM	ARY	2
2.	INTRODUCCIÓN		3
	2.1	Células troncales	3
	2.2	Células troncales mesenquimáticas	7
	2.2.1	Células troncales mesenquimáticas en sangre de cordón umbilical	9
	2.3	Diferenciación osteogénica	10
	2.4	Fundamentación y formulación de la hipótesis	14
3.	MATE	RIALES Y MÉTODOS	17
	3.1	MATERIALES	17
	3.1.1	Equipos	17
	3.1.2	Anticuerpos	17
	3.1.3	Reactivos para cultivo celular	18
	3.1.4	Reactivos químicos	18
	3.2	MÉTODOS	20
	3.1.5	Obtención de cultivos de CTM a partir de médula ósea y sangre de cordón	20
		umbilical.	
	3.1.6	Subcultivo de CTM	20
	3.1.7	Recuento y viabilidad celular	21

3.1.8	Criopreservación	21
3.1.9	Ensayos de diferenciación celular	21
3.1.9.1	Ensayo de diferenciación osteogénica	22
3.1.9.2	Ensayo de diferenciación adipogénica	22
3.1.10	Tinciones citoquímicas	22
3.1.10.1	Tinción Alizarin Red	22
3.1.10.2	Tinción Oil Red	23
3.1.11	Análisis de actividad enzimática de fosfatasa alcalina	23
3.2.7.1	Análisis con fluoresceína difosfato (FDP) mediante citometría de flujo	23
3.2.7.2	Método citoquímico.	23
3.2.8	Expresión de marcadores de diferenciación	24
3.2.8.1	Mediante microscopía de epifluorescencia	24
3.2.8.2	Mediante citometría de flujo	24
3.2.9	Preparación de extractos de proteínas	25
3.2.9.1	Obtención de proteínas totales	25
3.2.9.2	Obtención de proteínas citoplasmáticas y nucleares	25
3.2.10	Cuantificación de proteínas	26
3.2.11	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
3.2.12	Análisis de western blot	27
3.2.12.1	Electrotransferencia	27
3.2.12.2	Inmunodetección	27
RESULTADOS		
4.1	Cultivo y caracterización de CTM-SCU y CTM-MO.	29
4.1.1	Cultivo de CTM a partir de SCU y MO.	29

4.

4.1.2	Inmunotipificación de CTM-SCU y CTM-MO.	29
4.1.3	Ensayos de diferenciación adipogénica y osteogénica.	31
4.2	Estudios comparativos de expresión de marcadores de diferenciación en	36
	CTM-SCU y CTM-MO.	
4.2.1	Marcadores tempranos de diferenciación hacia linajes mesenquimáticos	36
4.2.2	Marcadores tempranos de diferenciación hacia linajes no mesenquimáticos	42
4.2.3	Expresión de marcadores de diferenciación óseos durante la diferenciación	47
	osteogénica de CTM-SCU y CTM-MO.	
4.2.3.1	Marcadores tempranos de diferenciación	47
4.2.3.2	Marcadores intermedios/tardíos	53
4.2.3.2.	1 Actividad fosfatasa alcalina.	53
4.2.3.2.2 Expresión de osteopontina. 60		60
DISCUSIÓN 64		64
5.1	Expresión de marcadores tempranos de diferenciación en cultivos de	65
	CTM-SCU y CTM-MO.	
5.2	Expresión de marcadores asociados a la diferenciación osteogénica en	70
	CTM-SCU y CTM-MO.	
5.2.1	Marcadores tempranos de diferenciación.	70
5.2.2	Marcadores intermedios y tardíos	71
BIBLIOGRAFÍA 78		

5.

6.

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1	Mecanismos de división y autorenovación de las células troncales.	4
Figura 2	Marcadores tempranos de diferenciación de la célula troncal.	6
Figura 3	Potencial de diferenciación de la CTM.	8
Figura 4	Etapas de la vía de diferenciación osteogénica.	12
Figura 5	Establecimiento de cultivos de CTM a partir de sangre de cordón umbilical	30
	y médula ósea humanas.	
Figura 6	Inmunotipificación de CTM-SCU y CTM-MO mediante citometría de flujo.	32
Figura 7	Inmunotipificación de CTM-SCU y CTM-MO mediante microscopía de	33
	epifluorescencia.	
Figura 8	Diferenciación osteogénica y adipogénica de CTM-SCU y CTM-MO.	35
Figura 9	Análisis de expresión de marcadores tempranos de diferenciación hacia	38
	linajes mesenquimáticos en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO mediante	
	inmunofluorescencia indirecta.	
Figura 10	Análisis de expresión de marcadores tempranos de diferenciación hacia linajes	41
	mesenquimáticos en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO mediante western blot.	
Figura 11	Análisis de expresión de marcadores tempranos de diferenciación hacia	43
	linajes mesenquimáticos en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO mediante	
	citometría de flujo.	
Figura 12	Análisis de expresión de marcadores de diferenciación de linajes neurogénico	46
	y pancreático en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO mediante western blot.	

Figura 13	Análisis de expresión de Runx-2/Cbfa-1 durante la diferenciación	48
	osteogénica de CTM-SCU y CTM-MO mediante inmunofluorescencia	
	indirecta y western blot.	
Figura 14	Análisis de expresión de Msx-2 durante la diferenciación	51
	osteogénica de CTM-SCU y CTM-MO mediante inmunofluorescencia indirecta	
Figura 15	Inmunodetección de Msx-2 en fracciones totales y citoplasmáticas de	52
	CTM-SCU mediante western blot.	
Figura 16	Análisis de la actividad fosfatasa alcalina en cultivos de CTM-SCU	54
	y CTM-MO mediante citometría de flujo.	
Figura 17	Análisis de expresión de fosfatasa alcalina en cultivos de CTM-MO	56
	y CTM-SU mediante tinción citoquímica.	
Figura 18	Actividad enzimática de fosfatasa alcalina en CTM-SCU y CTM-MO	58
	en respuesta al estímulo osteogénico.	
Figura 19	Análisis estadístico de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en	59
	cultivos de CTM-SCU y CTM-MO en respuesta al estímulo osteogénico	
	mediante el modelo de Kolmogorov – Smirnov.	
Figura 20	Análisis de expresión de osteopontina en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO	61
Figura 21	Diagrama ilustrativo de los marcadores tempranos de diferenciación	69
	expresados en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO.	
Figura 22	Diagrama ilustrativo de la jerarquía proliferativa y de diferenciación de	73
	la CTM.	

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	: albúmina sérica de bovino
СТ	: célula troncal
CTM	: célula troncal mesenquimática
CTM-MO	: célula troncal mesenquimática de médula ósea
CTM-SCU	: célula troncal mesenquimática de sangre de cordón umbilical
FITC	: isotiocianato de fluoresceína
IgG	: inmunoglobulina G
МО	: médula ósea
PBS	: tampón fosfato salino
RIPA	: radioimmunoprecipitation assay
rpm	: revoluciones por minuto
SDS	: dodecilsulfato de sodio
SFB	: suero fetal bovino
SCU	: sangre de cordón umbilical
ТА	: temperatura ambiente
μl	: microlitro
α-MEM	: Medio Minimum Essential Medium Alpha

1. **RESUMEN**

Las células troncales mesenquimáticas (CTM) corresponden a una subpoblación celular presente en el estroma de la médula ósea (CTM-MO) y en la sangre de cordón umbilical (CTM-SCU), caracterizadas por su capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico, adipogénico, condrogénico y miogénico. En un organismo adulto, son precursoras de linajes celulares de origen mesenquimático y conforman el microambiente hematopoyético en la médula ósea.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar las poblaciones de CTM-SCU y CTM-MO, y evaluar comparativamente sus potenciales de respuesta frente a un estímulo de diferenciación osteogénica. Se encontró que ambas poblaciones celulares expresan marcadores tempranos de diferenciación hacia los linajes osteogénico (Runx-2/Cbfa-1, Msx-2), adipogénico (PPAR-γ), condrogénico (Sox-9), miogénico (MyoD, Myf-5), pancreático (Pdx-1, Nestina) y neural (NeuroD, Nestina). Al inducir la diferenciación osteogénica, ambas poblaciones mantuvieron los niveles de expresión del factor Runx-2/Cbfa-1, mientras que al analizar la expresión de Msx-2, se encontró un patrón de localización citoplasmática asociado al progreso de la diferenciación osteogénica.

El estudio de marcadores intermedios/tardíos de la diferenciación osteogénica, mostró que los cultivos de CTM-SCU presentaban una proporción menor de células fosfatasa alcalina positivas en comparación a los de CTM-MO y ausencia de expresión de osteopontina. Frente al estímulo osteogénico, las CTM-SCU aumentaron la actividad de fosfatasa alcalina en mayor grado en comparación a las CTM-MO. Por otra parte, ambas poblaciones celulares expresaron osteopontina en respuesta al estímulo de diferenciación osteogénico.

Estos resultados sugieren que las CTM-SCU y CTM-MO representarían poblaciones celulares multipotenciales, siendo las CTM-SCU portadoras de una proporción mayor de células osteoprogenitoras inmaduras, con un potencial de respuesta distinto frente al estímulo osteogénico.

SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSC) represent a subpopulation of cells present in the bone marrow stroma (BM-MSC) and umbilical cord blood (UCB-MSC). They are characterized for their capacity to differentiate along the osteogenic, adipogenic, condrogenic and myogenic differentiation pathways. In the adult organism, they serve as precursors for cell types of mesenchymal origin and participate in the formation and maintenance of the bone marrow hematopoietic microenvironment.

The aim of this thesis was to characterize UCB-MSC and BM-MSC populations, and to comparatively evaluate their ability to respond to an osteogenic differentiation stimuli. It was found that both cellular populations express early differentiation markers towards the osteogenic (Runx-2/Cbfa-1, Msx-2), adipogenic (PPAR- γ), condrogenic (Sox-9), myogenic (MyoD, Myf-5), pancreatic (Pdx-1) and neural (NeuroD, Nestin) differentiation pathways. When induced to differentiate along the osteogenic differentiation pathway, both cell types did not show significant variations in the level of expression of Runx-2/Cbfa-1, while analyzing Msx-2 expression a cytoplasmatic localization pattern was found; which was associated with the progression along the osteogenic differentiation.

When analyzing the expression and/or activation of intermediate and late osteogenic differentiation markers, it was found that UCB-MSC showed a smaller proportion of alkaline phosphatase positive cells in comparison to BM-MSC and absence of expression of osteopontin. In response to the osteogenic stimuli, UCB-MSC increased alkaline phosphatase activity to a greater degree in comparison to BM-MSC. On the other hand, both cellular populations express osteopontin in response to the osteogenic differentiation stimuli. These results suggest that both UCB-MSC and BM-MSC represent multipotential cellular populations and that UCB-MSC have a greater proportion of immature osteoprogrenitor cells, with a different potential of differentiation into the osteogenic pathway.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Células troncales

Las células troncales (CT) corresponden a una población celular dotada de la capacidad de diferenciación hacia diversos linajes celulares, generando así células capaces de integrarse en un tejido específico y ejercer las funciones especializadas del mismo. De igual manera, poseen la capacidad de autorenovación, esto es, de proliferar sin sufrir procesos de diferenciación durante períodos de tiempo prolongados, los que suelen abarcar toda la vida del organismo en el cual residen (Fig. 1) (Blau y col., 2001).

Han sido descritos distintos tipos de CT, clasificadas de acuerdo a su origen y al potencial de diferenciación que demuestran. Las CT embrionarias corresponden a una población celular obtenida de la masa celular interna de embriones en estado de blastocisto y de células germinales primordiales (Evans y Kaufman, 1981; Shamblott y col., 1998; Thomson y col., 1998). Estas células exhiben una elevada capacidad proliferativa lo cual permite expandirlas en cultivo de manera indefinida. En cuanto a su potencial de diferenciación, son consideradas pluripotenciales, por cuanto han mostrado ser capaces de generar la amplia mayoría de tipos celulares existentes en el organismo (Itskovitz-Eldor y col., 2000).

También es posible hallar CT en los órganos de un organismo adulto. Son denominadas CT adultas y han sido descritas en diversos tejidos tales como hematopoyético, nervioso, epitelial, gastrointestinal, muscular, pancreático y pulmonar (Weissman, 2000). Estas células son consideradas multipotenciales, portadoras de un potencial de diferenciación restringido al tejido en el cual residen, por lo tanto menor al descrito para CT embrionarias. Así por ejemplo, en la médula ósea (MO) encontramos la CT hematopoyética responsable de la formación de todos los tipos celulares existentes en la sangre. Asimismo, en el sistema gastrointestinal encontramos la CT epitelial responsable del recambio del epitelio gástrico. En el organismo, estas CT adultas cumplirían la función de



Figura 1.- Mecanismo de división y autorenovación de las células troncales. Frente a un estímulo determinado la CT se divide generando dos células hijas. A través de un mecanismo de división asimétrica, una de las células hijas puede emprender una vía de diferenciación y dar origen a una célula diferenciada y la otra mantener la identidad de célula troncal, asegurando la autorenovación de la población de CT.

reemplazar la dotación de células que se pierden por daño o envejecimiento celular (Minguell y col., 2000).

Sin embargo, diversos trabajos sugieren que el potencial de diferenciación de algunos tipos de CT adultas podría ser mayor que el esperado, al existir células con capacidad de diferenciación hacia linajes celulares pertenecientes a un tejido distinto del cual residen. Tal es el caso de CT hematopoyéticas capaces de originar células de tejido muscular cardíaco (Orlic y col., 2001), muscular esquelético (Gussoni y col., 1999), hepático (Lagasse y col., 2000) y neuronal (Mezey y col., 2000). De la misma forma, CT neuronales son capaces de generar células del sistema hematopoyético (Bjornson y col., 1999) y múltiples tipos celulares al ser implantadas en un embrión (Clarke y col., 2000).

El proceso de diferenciación de las CT hacia un linaje celular involucra una serie de cambios tanto a nivel celular como molecular, conducentes a la adquisición progresiva de una condición de mayor compromiso con la vía de diferenciación escogida.

El compromiso con una ruta de diferenciación en particular se logra por medio de la expresión/activación de marcadores tempranos de diferenciación, los que corresponden principalmente a factores de transcripción, los cuales modulan la expresión o represión de genes específicos del respectivo linaje celular. De esta manera, se logra conducir la diferenciación hacia un linaje celular específico y excluir opciones de diferenciación divergentes (Fig. 2).

Una vez comprometidas con una ruta de diferenciación, la célula comienza un proceso de maduración consistente en la expresión y ensamblaje de marcadores celulares característicos del linaje escogido, ordenados en una secuencia de eventos similar al observado durante el desarrollo embrionario (Snider y Tapscott, 2003). Estos marcadores pueden ser identificados como intermedios o tardíos, de acuerdo al grado de compromiso o maduración con el cual su expresión y/activación se correlacione.



Figura 2.- Marcadores tempranos de diferenciación de la CT. El compromiso de la CT hacia un linaje celular se encuentra dirigido por factores de transcripción linaje específicos, los cuales modulan la diferenciación de la CT hacia una vía en particular. En el diagrama se ilustran estos marcadores para el compromiso hacia los linajes osteogénico (Runx-2/Cbfa-1) y miogénico (MyoD y Myf-5).

2.2 Células troncales mesenquimáticas.

En la compleja población celular presente en la MO, existe una población de CT no hematopoyéticas referida como CT mesenquimáticas (CTM) (Conget y Minguell., 1999; Pittenger y col., 1999; Minguell y col., 2001) las cuales junto a diversos tipos celulares generan el microambiente necesario para la mantención, proliferación y diferenciación de las CT hematopoyéticas también presentes en la MO.

Junto a su rol de soporte hematopoyético, *in vivo* la CTM es precursora de linajes celulares de origen mesenquimático, tales como osteocitos, condrocitos, miocitos, adipocitos, tenocitos y estroma hematopoyético (Fig. 3) (Minguell y col., 2001).

La obtención de cultivos de CTM se encuentra ampliamente documentada en la literatura. Puede ser aislada, mantenida y expandida *ex vivo*. En cultivos muestra una marcada capacidad para adherirse a superficies plásticas, presenta una morfología fibroblastoide y para proliferar requiere de suero fetal bovino (SFB) (Prockop y col., 1997; Conget y Minguell, 1999). Estas células presentan un inmunofenotipo característico, el cual se compone por la expresión de antígenos propios de células de origen mesenquimal, endotelial, epitelial y muscular (Hynesworth y col., 1992; Conget y Minguell, 1999; Pittenger y col., 1999). Dentro de éstos, se encuentra la familia de antígenos reconocidos por los anticuerpos SH (SH2, SH3, SH4) y la isoforma α de actina de músculo liso (*alpha smooth muscle actin*, ASMA), los cuales han sido ampliamente utilizados para identificar estas células. Por otra parte, las CTM no expresan antígenos marcadores de linaje hematopoyético tales como CD14, CD34 y CD45 (Hynesworth y col., 1992; Erices y col., 2000; Minguell y col., 2001).

El potencial de diferenciación de la CTM ha sido documentado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Es así como se ha demostrado que es capaz de diferenciarse hacia los linajes osteogénico, adipogénico, condrogénico (Pittenger y col., 1999), miogénico (Bossolasco y col.,



Figura 3.- Potencial de diferenciación de la CTM. La CTM es capaz de generar tipos celulares pertenecientes a distintos linajes mesenquimáticos tales como osteocitos, condrocitos, miocitos, adipocitos, estroma hematopoyético y tenocitos.

2004), hepático (Petersen y col., 1999), endotelial (Oswald y col., 2004) y neural (Kopen y col., 1999).

Este amplio potencial de diferenciación de la CTM representa un interesante modelo para el desarrollo de terapias celulares conducentes al reemplazo de poblaciones celulares dañadas. En este sentido, numerosos estudios han evidenciado su utilidad para el trasplante y regeneración de tejidos hematopoyético (Angelopoulou y col., 2003), óseo (Horwitz y col., 2002) cardíaco (Shake y col., 2002), condrogénico (Wakitani y col., 2004), pulmonar (Ortiz y col., 2003) neural (Li y col., 2001) y de médula espinal (Mansilla y col., 2005).

2.2.1 Células troncales mesenquimáticas en sangre de cordón umbilical humana.

Durante el desarrollo embrionario, la hematopoyesis es un proceso migratorio, esto es, progenitores hematopoyéticos se movilizan por medio de la circulación fetal para ejercer su función en un lugar distinto al de su origen. (Cumano y Godin, 2001).

Durante la embriogénesis humana, el primer foco hematopoyético se origina en el saco vitelino. A continuación, éste se desplaza hacia el hígado fetal, para colonizar finalmente la MO en formación, órgano hematopoyético para el resto de la vida del individuo. De acuerdo a esto, la presencia de la CT hematopoyética en la sangre fetal humana da cuenta de la migración del proceso hematopoyético fetal (Broxmeyer y col., 1989).

En el caso del linaje mesenquimático, en las primeras etapas del desarrollo éste se encuentra sustentado por la diferenciación de células mesodérmicas. Sobre la base de que la CT hematopoyética utiliza la sangre de cordón umbilical (SCU) como vía de movilización durante el desarrollo fetal, Erices y col (2000) evaluaron la hipótesis de que las CTM también utilizarían esta vía para migrar desde sitios hematopoyéticos fetales tempranos hacia la MO en formación. Es así como este trabajo demostró la presencia de CTM - SCU, las cuales presentaban un potencial de diferenciación al

menos tripotente, por cuanto *in vitro* se diferenciaban a los linajes osteogénico, adipogénico y además presentaban la capacidad de sustentar hematopoyesis. Asimismo, estas células mostraron ser equivalentes a las CTM-MO en base a sus características morfológicas e inmunofenotípicas. Parte de estos estudios han sido confirmados y complementados posteriormente por otros autores (Campagnoli y col., 2001; Goodwin y col, 2001; Lee y col., 2004).

El conjunto de antecedentes generados por estos trabajos ha mostrado la presencia de CTM en la SCU, lo cual sugiere que durante la vida fetal la CTM "viajaría" a colonizar la MO en formación desde la cual sustentaría el proceso mesenquimático en el organismo adulto.

2.3 Diferenciación osteogénica

El tejido óseo corresponde a una forma especializada de tejido conectivo, compuesto por una matriz orgánica formada principalmente por colágeno tipo I (>95%) y diversas proteínas óseas no colágenas (5%). Esta matriz se encuentra mineralizada, principalmente como resultado de la deposición de cristales de hidroxiapatita ($Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2$), proceso que realizan los osteoblastos responsables de la formación del hueso. Junto a este tipo celular, coexiste en el tejido óseo una segunda población de células, los osteoclastos, responsables de la resorción del hueso. Ambos son responsables del recambio constante del tejido, proceso que se lleva a cabo durante toda la vida del individuo (Marks y Popoff, 1988).

El avance a lo largo de la diferenciación osteogénica involucra el progreso a través de una serie de etapas, correspondientes a estadios intermedios de diferenciación del linaje osteoblástico, para culminar finalmente en la formación de osteoblastos maduros y funcionales denominados osteocitos.

El modelo de osteodiferenciación actualmente aceptado define al proceso completo en una serie de etapas, las cuales describen la maduración progresiva de la célula desde su condición de CTM indiferenciada hasta transformarse en un osteocito (Stein y col., 2004). Es posible reconstituir *in vitro* este modelo de osteodiferenciación, cultivando las CTM en presencia de factores osteoinductores. En estos modelos, se observan cambios tanto a nivel celular como molecular representativos de la diferenciación progresiva en células osteoblásticas maduras, obteniéndose al cabo de 14 días una matriz extracelular mineralizada, aceptada como el marcador fenotípico terminal de la vía de diferenciación osteogénica (Jaiswal y col., 1997).

Han sido identificados una serie de factores tanto proteicos como esteroidales, involucrados en el control de la diferenciación de la CTM hacia el linaje osteogénico. Entre éstos se encuentran los glucocorticoides (Cheng y col., 1994) y algunos miembros de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), tales como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Yamaguchi y col., 2000).

Este modelo de osteodiferenciación plantea en una primera etapa la proliferación de las CTM indiferenciadas (Fig. 4). Esta etapa se encuentra caracterizada por una elevada expresión de genes asociados a la activación de la proliferación (c-myc; c-fos), reguladores de la progresión a través del ciclo celular (histonas, ciclinas), componentes de la matriz extracelular (fibronectina) y otros asociados a la regulación de la biosíntesis de la matriz extracelular (TGF-β). Paralelamente, los genes asociados a la funcionalidad del fenotipo osteoblástico se encontrarían suprimidos (Moursi y col., 1996; Sakano y col., 1997; Stein y col., 2004).

Posteriormente, se observa un aumento en la síntesis de proteínas asociadas a la organización y maduración de la matriz extracelular, entre las cuales se encuentra el colágeno tipo I y la fosfatasa alcalina.

Una vez sintetizada la matriz, ésta debe ser mineralizada. Esta tercera etapa del proceso osteogénico se encuentra caracterizada por la expresión de proteínas involucradas en la deposición



Figura 4.- Etapas de la vía de diferenciación osteogénica. El programa genético de proliferación y diferenciación de los progenitores osteoblásticos puede ser representado en 3 etapas secuenciales, cada una de las cuales se encuentra caracterizada por la expresión temporal de proteínas específicas. Se observa un esquema representativo de las etapas de proliferación, maduración y mineralización de la matriz extracelular junto a los marcadores asociados a cada etapa.

del mineral óseo, entre las que se encuentran osteopontina, sialoproteína ósea y osteocalcina (Stein y col., 2004).

Como se ha señalado anteriormente en 2.1, el compromiso de la CT hacia un linaje en particular, implica la expresión y / o activación de factores de transcripción específicos, mientras que la maduración implica la expresión y/o activación de genes y proteínas asociadas a la funcionalidad del fenotipo maduro (Arnold y Winter, 1998; Rosen y Spiegelman, 2000). En la diferenciación osteogénica, se ha identificado al factor de transcripción Runx-2/Cbfa-1 como el activador transcripcional central para el compromiso de la CTM hacia este linaje, como asimismo para el desarrollo y progresión a través de éste (Ducy y col., 1997). Su expresión ha sido descrita tanto en células osteoblásticas (Ducy y col., 1997) como en condrocitos hipertróficos (Kim y col., 1999) y en condensaciones mesenquimáticas precondrogénicas (Otto y col., 1997). Su actividad se encuentra fundamentalmente asociada a la regulación de la expresión de genes involucrados en la formación y mantención del hueso, tales como colágeno tipo I, osteopontina y osteocalcina (Ducy y col., 1997).

El rol central de Runx-2/Cbfa-1 en el desarrollo y progresión de la diferenciación osteogénica, ha sido atribuido a su habilidad para interactuar con un número extenso de proteínas y para participar en diversas vías de transducción de señales (Stein y col., 2004). Es así como se ha demostrado que diversos factores de transcripción y cofactores interactúan con este factor modulando su actividad, tales como las proteínas Smads -1, -5, -3, STAT-1, Msx-2, Msx-1, Menina, Dlx-5, Grg5, p300 y Twist (Franceschi y col., 2003). De éstos, existen algunos que han mostrado tener un rol fundamental para el correcto desarrollo del tejido óseo tales como Msx-2 y Dlx-5. La importancia de estas proteínas en el desarrollo esquelético ha quedado demostrada en modelos transgénicos, en los cuales su eliminación resulta en una deficiente o escasa formación ósea (Acampora y col., 1999; Satokata y col., 2000).

2.4 Fundamentación y formulación de hipótesis.

Las CT de origen fetal, han mostrado poseer un conjunto de diferencias respecto de aquellas de un organismo adulto. Estas diferencias estarían asociadas a características propias de la condición de inmadurez de estas células, como es el mayor potencial de autorenovación y diferenciación que muestran (Lewis y Verfaillie, 2000).

En este contexto, se ha demostrado que la CT hematopoyética posee características distintas dependiendo de la edad del organismo del cual provenga. Es así como se ha observado que la CT hematopoyética de SCU presenta un mayor potencial de proliferación (Tanavde y col., 2002), mayor capacidad de migración transendotelial (Yong y col., 2002), mayor capacidad de sustentar hematopoyesis (Ueda y col., 2001) y distintas propiedades inmunológicas (Cohen y col., 1998) en comparación a su equivalente de la MO adulta.

Análogamente en el contexto de la CTM, algunos estudios han descrito ciertas diferencias funcionales entre las CTM provenientes de organismos jóvenes y adultos. Es así como se ha reportado que las CTM-SCU muestran una mayor capacidad proliferativa en comparación a sus contrapartes adultas (Kang y col., 2004). Asimismo, se ha planteado que el potencial de diferenciación de las CTM disminuiría con la edad del organismo, secundario a una disminución en su capacidad de respuesta frente a estímulos de diferenciación (D`Ippolito y col., 1999; O'Donoghue y Fisk, 2004).

En el contexto de la diferenciación osteogénica de la CTM, ha sido ampliamente descrito que el potencial osteogénico varía de acuerdo a la edad del individuo, mostrando ser menor en organismos adultos en comparación a individuos más jóvenes (Leveille, 2004). Diversos estudios han buscado abordar las causas de este fenómeno, postulado que podría ser atribuido a una disminución en el potencial proliferativo de precursores osteoblásticos (Oreffo y col., 1998), a un número menor de células osteoprogenitoras tempranas en organismos adultos (Sutherland y col., 1995) como asimismo a la acumulación de daños y mutaciones genéticas en las CTM osteoprogenitoras, lo cual se traduciría

en una disminución de su capacidad de respuesta frente a factores biológicos osteoinductores, generando como consecuencia una inadecuada y/o deficiente formación de tejido óseo (Oreffo y col., 1998; D'Ippolito y col., 1999; Mueller y Glowacki, 2001).

De acuerdo a los antecedentes anteriormente expuestos, la hipótesis de esta tesis plantea que: "Sobre la base de la expresión de marcadores de diferenciación, las CTM-SCU representarían una población celular con un mayor potencial de diferenciación hacia el linaje osteogénico en comparación a las CTM-MO obtenidas de un organismo adulto". En tal caso, la población de CTM-SCU podría presentar una respuesta más temprana ó una mayor expresión de marcadores de diferenciación en respuesta al estímulo osteogénico. Como hipótesis alternativa, es posible considerar que cultivos de CTM-SCU tendrían una proporción distinta de células osteoprogenitoras inmaduras que los cultivos de CTM-MO.

Para probar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos generales y específicos:

Objetivos Generales

Caracterizar y evaluar comparativamente la expresión de marcadores tempranos, intermedios y tardíos de diferenciación en las poblaciones de CTM obtenidas de SCU y MO, y su respuesta frente a la aplicación de un estímulo de diferenciación osteogénica.

Objetivos Específicos

- 1. Establecer los cultivos de CTM a partir de muestras de SCU y MO humanas.
- 2. Caracterizar los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO sobre la base de sus características morfológicas, inmunofenotípicas y de expresión de marcadores tempranos de diferenciación.

- 3. Inducir la diferenciación de CTM-SCU y CTM-MO hacia el linaje osteogénico en condiciones *in vitro*.
- Evaluar la expresión y/o funcionalidad temporal de marcadores osteogénicos (tempranos, intermedios y tardíos) en respuesta a la aplicación de un estímulo de diferenciación osteogénico en las CTM-SCU y CTM-MO.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Equipos

Agitador magnético de *Cole Parmer* modelo VelaTM, Agitador tipo balancín de *Cole Parmer*, balanza analítica de *Scientech* modelo SA 80, baño termoregulado *Memmert* modelo WB-10, cámara de electroforesis y transferencia Mini-Protein2 de Bio-Rad, cámara de flujo laminar de *Filtro Met* modeloVR 24242, centrífuga refrigerada *Hettich* modelo MIKRO 22R, centrífuga *Medilite* modelo Termo IEC, citómetro de flujo Becton Dickinson modelo FACScan , estufa de cultivo de *Sanyo Electric Biomedical Co.*, Ltda. modelo MCO-15AC; fuente de poder de *Apparatus Corporation* modelo EC-250 -90, lector de absorbancia para placas de 96 pocillos de *Bio-Tek Instruments, Inc.* modelo EL_x 800, microscopio de fluorescencia de *Olympus* modelo BX-41; microscopio invertido de *Meiji Techo Co.* serie VT, Scanner AGFA, tambor de nitrógeno líquido de *Thermolyne* modelo Locator 4, Unidades de filtración de *Advantec MFS*, Inc.

3.1.2 Anticuerpos

Anticuerpos primarios

- Anticuerpo monoclonal anti - α -actina de músculo liso, (A2547), Sigma-Aldrich.
- Anticuerpos monoclonales anti -SH2, -SH3, -SH4 de Osiris Therapeutics
- Anticuerpo monoclonal anti -PPARγ (sc-7273), Sta Cruz Biotech.
- Anticuerpo policional anti -Sox9 (AB5809) Chemicon.
- Anticuerpos policionales anti- Runx-2/Cbfa-1 (sc-10758), -Msx2 (sc-15396), -MyoD (sc-760),

-Myf5 (sc-302), -Nestina (sc-21248), -NeuroD (sc-1084), -Pdx-1(sc-14662), -osteopontina (sc-10591), Sta Cruz, Biotech.

Anticuerpos Secundarios

• Anticuerpos anti-IgG de ratón, conejo y cabra conjugados a peroxidasa de rábano, de ECL Amersham.

• Anticuerpos anti IgG de ratón, conejo y cabra conjugados a FITC, Rockland Inc.

3.1.3 Reactivos para cultivo celular

Medio *Minimum Essential Medium Alpha* (α-MEM), de Gibco BRL; solución de penicilina/ estreptomicina de Invitrogen, suero fetal bovino de *Hyclone*, tripsina de bovino de Gibco BRL, solución Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS) de Gibco BRL.

3.1.4 Reactivos químicos

De *Sigma Chemical Co.*, se utilizaron los siguientes reactivos: Ascorbato-2-fosfato, Alizarin red sodium sulfonate, Azul de tripán 0.4%, β-glicerolfosfato, Dexametasona, Dimetilsulfóxido (DMSO), Histopaque – 1077, DTT, EGTA, Na₃VO₄, *Alkaline Phosphatase Detection* kit.

• De *Invitrogen Life Technologies, Inc.*, se obtuvo acrilamida, N,N⁻-metilen-bisacrilamida.

• De *Winkler Ltda*., se obtuvieron los reactivos: Azul de Coomasie, NaHCO₃, MgCl2, KCl, NaCl, Cristal violeta, EDTA, NaH₂PO₄, glicerol, glicina, NaOH, Nonidet (NP-40), TEMED, marcador de proteínas rango amplio (14-116 kDa).

• De *Merck* se obtuvo: Acido clorhídrico fumante 37% p.a., Formaldehído 37%, Etanol p.a., Oil Red O.

• De *TCL* se obtuvo: Acido acético 90%, Etanol 70%.

De *US Biologicals* se obtuvo: Tween20, Azul de bromofenol, Dodecil sulfato de sodio (SDS),
Tris p.a., Tritón X-100.

• De *Calbiochem* se obtuvo: trihidrocloruro de bisbenzamida H33342 (Ho), iso-butil-metilxantina (IBMX), cocktail de inhibidores de proteasas P*rotease Inhibitor Cocktail Set III*.

• De **BioRad** se obtuvieron: kit de cuantificación de proteínas D_c Protein Assay, membrana PVDF Immun-BlotTM.

• De *Molecular Probes* se obtuvo: sustrato fluorescente de fosfatasa alcalina tetra- amonio de fluoresceína difosfato (F-2999).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtención de cultivos de CTM a partir de MO y SCU humanas.

Las muestras de SCU fueron obtenidas de partos realizados en el Hospital Santiago Oriente Dr. Luis Tisné, tras ser obtenido el consentimiento de la madre. La recolección de las muestras fue llevada a cabo en botellas estériles con medio de cultivo M-199 suplementado con heparina (2500 UI/100 ml medio) y procesadas en un tiempo no superior a las 24 horas desde su recolección.

Las células mononucleares fueron aisladas por medio de una centrifugación en gradiente de Ficoll (= 1.077 g/ml) por 30 min a 400 x g (Boyum, 1968) y posteriormente fueron sembradas a una densidad de 1x10⁶ cél/cm² en medio de cultivo α -MEM conteniendo 10% de SFB (Hyclone, Utah, USA). Las células fueron cultivadas en un incubador a 37°C con atmósfera controlada conteniendo CO₂ al 5%. Después de 5 a 7 días de cultivo, el medio junto con las células no adheridas, fue removido y reemplazado por medio de cultivo completo fresco (Erices y col., 2000). La monocapa de células adherentes que se desarrolló, posteriormente fue subcultivada y expandida para realizar los experimentos que se describen en esta tesis.

Las muestras de médula ósea fueron obtenidas a partir de remanentes de aspirados provenientes de donantes normales para trasplante alogénico del Laboratorio de Criopreservación, Clínica Las Condes. El aislamiento y cultivo de las células mononucleares fue realizado de manera análoga a lo descrito para CTM-MO (Conget y Minguell, 1999).

3.2.2 Subcultivo de CTM.

El subcultivo de las células fue realizado mediante una incubación con un volumen de una solución de tripsina 0.25% en PBS por 10 min a 37°C. Se inactivó el efecto de la tripsina por adición de dos volúmenes de medio de cultivo completo. Tras centrifugar a 500 x g durante 10 min a TA,

el sedimento de células se resuspendió en medio de cultivo completo y las células se volvieron a sembrar y cultivar bajo las condiciones descritas en **3.2.1**.

3.2.3 Recuento y viabilidad celular

El número de células se determinó mediante el recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer) utilizando la siguiente fórmula:

 N° células/Vol. solución = <u>N^{\circ}</u> células vivas x factor dilución x Vol. suspensión celular N^o cuadrantes contados

La viabilidad celular fue medida a través de la exclusión del colorante azul de tripán y posterior recuento en microscopio óptico o con yoduro de propidio en el caso de análisis por citometría de flujo.

3.2.4 Criopreservación

Las células obtenidas en las condiciones descritas anteriormente, fueron criopreservadas con el objeto de mantener una reserva de muestras. Para esto, las células fueron tripsinizadas según lo descrito en **3.2.2** y resuspendidas a una densidad de 1 x 10^6 cél/ml en una solución de criopreservación fría, consistente en un 80% de suero fetal bovino, 10% de células en medio completo y 10% DMSO. Alícuotas de 1 ml de solución en criotubos fueron congeladas mediante el descenso gradual de la T° hasta alcanzar –196°C y luego mantenidas en N₂ líquido.

3.2.5 Ensayos de diferenciación celular

Para los ensayos de diferenciación se usaron condiciones descritas en la literatura. Las condiciones de mantención consistieron en cambios de medio regulares cada 3 - 4 días.

3.2.5.1 Ensayos de diferenciación osteogénica.

La inducción de CTM hacia el linaje osteogénico fue realizada incubando cultivos confluentes en medio osteogénico, compuesto por medio de cultivo completo suplementado con dexametasona 0.1 μ M, β -glicerolfosfato 10 mM y ascorbato – 2 – fosfato 50 μ M (Jaiswal y col., 1997). El progreso del proceso de diferenciación fue evaluado mediante la aparición de focos de mineralización en la placa de cultivo, los cuales fueron confirmados mediante tinción con Alizarin Red.

3.2.5.2 Ensayos de diferenciación adipogénica.

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo completo hasta alcanzar la sub-confluencia de la placa. A continuación, las células fueron incubadas en medio adipogénico, compuesto por medio de cultivo completo suplementado con insulina 10µg/ml, dexametasona 1µM, iso-butil-metil-xantina (IBMX) 0.5 mM e indometacina 100 µM (Dennis y col., 1999). Las células fueron cultivadas hasta la aparición de gotas de lípidos en el citoplasma celular, lo cual fue posteriormente confirmado por tinción con Oil Red O.

3.2.6 Tinciones citotoquímicas

3.2.6.1 Tinción Alizarin Red S.

Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con etanol al 70% por 30 min a TA. Luego de ser lavadas con PBS, las células fueron incubadas con una solución de Alizarin Red 40 mM en NaH₂PO₄ pH 4.3 por 10 min a TA. Tras 5 lavados con agua destilada, se realizó una incubación con PBS por 15 min a TA. La aparición de un precipitado rojo cristalino fue indicativo de una reacción positiva (Lievremont y col., 1982).

3.2.6.2 Tinción Oil Red O.

Las células fueron lavadas con PBS y a continuación incubadas con una solución saturada de Oil Red en isopropanol 60 % v/v por 1 hora a TA. Posteriormente fueron lavadas con PBS y observadas bajo microscopio. La aparición de células teñidas de rojo fue considerado una reacción positiva a la tinción (Ramirez-Zacarias y col., 1992)

3.2.7 Análisis de actividad enzimática de fosfatasa alcalina.

3.2.7.1 Análisis con fluoresceína difosfato (FDP) mediante citometría de flujo.

El análisis de la actividad fosfatasa alcalina utilizando FDP como sustrato fluorescente fue realizada de acuerdo a los descrito por Rattner y col., (1997). Brevemente, las células fueron tripsinizadas y lavadas en tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 (tampón TN). A continuación, fueron incubadas en una solución de FDP 20 µM en el mismo tampón TN por 10 min a 37°C. Seguidamente, fueron colocadas en hielo por 4 min para detener la reacción. Se realizaron 3 lavados tras lo cual fueron resuspendidas en 300 µl de tampón TN, al cual se adicionó yoduro de propidio para determinar la viabilidad celular. Seguidamente, se llevó a cabo el análisis por citometría de flujo (Laboratorio Criopreservación de Médula Ósea, Clínica Las Condes). Estos análisis fueron realizados 3 veces independientemente.

El análisis estadístico de los histogramas fue realizado con el programa *CellQuest* (Becton Dickinson) mediante el modelo estadístico de Kolmogorov-Smirnov (Young, 1977).

3.2.7.2 Análisis mediante tinción citoquímica.

El análisis citoquímico de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina fue realizado con el kit 86-R de *Sigma Diagnostic* de acuerdo a las instrucciones entregadas por el fabricante.

Brevemente, las células fueron fijadas por 30 seg a T° ambiente, con una mezcla compuesta por acetona, formaldehído y citrato en proporciones recomendadas por el fabricante. Se realizaron 3 lavados con agua destilada, seguido de una incubación con una solución de sustrato para la enzima por 20 min a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la solución de sustrato y se llevó a cabo la tinción de los núcleos con una solución de hematoxilina. Una reacción positiva fue visualizada como el depósito de una coloración violeta-rosácea en el citoplasma de las células. Estos experimentos fueron realizados 3 veces de manera independiente.

3.2.8 Expresión de marcadores de diferenciación

3.2.8.1 Mediante microscopía de epifluorescencia

Las células crecidas sobre cubreobjetos de vidrio fueron lavadas dos veces con PBS y luego fijadas con paraformaldehído al 1% en PBS por 20 min a T° ambiente. A continuación, se realizaron dos lavados de 5 min cada uno con PBS. Para estudiar la expresión de antígenos intracelulares, luego de la etapa de fijación, las células fueron permeabilizadas con Tritón X–100 al 0.25% en PBS por 10 min a TA. Luego de tres lavados con PBS, se realizó un bloqueo con una solución de PBS-SFB 2% por 45 min a TA. Posteriormente, se incubó con el respectivo anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Tras realizarse 3 lavados con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hora a TA, seguido de tres lavados con PBS.

Finalmente, se procedió a teñir los núcleos de las células con bisbenzimida (Hoescht, Ho), este paso se realizó incubando las células con una solución Ho (1 μ g/ml) por 4 min a TA, seguido de tres lavados con PBS. Finalmente, las muestras fueron montadas sobre portaobjetos utilizando medio de montaje, para luego ser analizadas por microscopía de epifluorescencia.

3.2.8.2 Mediante citometría de flujo.

Para analizar la expresión de antígenos de superficie, las células fueron tripsinizadas según lo descrito en 3.2.2. Se tomó una alícuota de aproximadamente 300.000 células y se centrifugó a 400 x g por 10 min a TA. A continuación, el sedimento de células se resuspendió en 500 1 de PBS-SFB 2% (solución de bloqueo) y se centrifugó nuevamente a 400 x g durante 10 min a 25°C. Se incubó con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo por 1 hora a 4°C. Luego se agregaron 500 1 de solución de bloqueo y se centrifugó a 400 x g durante 10 min. Se incubó con el 2° anticuerpo por 1 hora a 4°C y se lavó con solución de bloqueo. Seguidamente, las células fueron fijadas en formaldehído 0.5 % en PBS. A la brevedad, fueron analizadas por citometría de flujo con el programa *Cellquest* (Beckton Dickinson).

En el caso de antígenos intracelulares, las células fueron permeabilizadas agregando etanol 70% frío con agitación constante. Se dejaron las células en hielo por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 400 x g durante 10 min a 4°C y se resuspendió el sedimento de células en solución de bloqueo. Se volvió a centrifugar para eliminar el exceso de etanol. Seguidamente, las células fueron incubadas con los anticuerpos respectivos y procesadas de manera análoga a lo descrito para el análisis de antígenos de superficie.

3.2.9 Preparación de extractos de proteínas

3.2.9.1 Obtención de proteínas totales

Las células adheridas a la placa de cultivo fueron lavadas dos veces con PBS frío y a continuación se les agregó solución de lisis (Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 2mM, NP40 1%, Triton X-100 1%, pH 7.4) suplementada con inhibidores de proteasas (P*rotease Inhibitor Cocktail,* de *Calbiochem* compuesto por AEBSF 100 mM, Aprotinina 80 μ M, Bestatina 5 μ M, E-64 1.5 mM, Leupeptina 2mM, Pepstatina A 1 mM y Na₃VO₄ 10 mM). El material celular fue mantenido en hielo con agitación constante por 20 min, tras lo cual fue extraído de la placa con ayuda de un raspador de

células desechable (*cell scraper*) y posteriormente fue centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue guardado a -20°C y utilizado como extracto total de proteínas en los experimentos descritos (Harlow & Lane, 1988).

3.2.9.2 Obtención de proteínas citoplasmáticas y nucleares

La monocapa de células fue lavada dos veces con PBS frío y luego con la ayuda de un raspador de células, fueron recolectadas en solución de lisis citoplasmática [HEPES 10 mM (pH 7.9), MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM] e incubadas en hielo por 10 min. Seguidamente, se llevó a cabo una centrifugación a 4000 x g por 15 min a 4°C, tras lo cual el sobrenadante fue guardado a -20°C y utilizado como fracción de proteínas citoplasmáticas. El sedimento obtenido fue resuspendido en solución de lisis nuclear [HEPES 20 mM (pH7.9), MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 420 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, glicerol 25%] e incubada en hielo por 30 min. Se llevó a cabo una centrifugación a 13.000 x g por 20 min a 4°C y el sobrenadante obtenido correspondiente a la fracción nuclear, fue guardado a -20°C.

3.2.10 Cuantificación de proteínas

Se realizó una curva de concentración de proteínas utilizando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar. Cada punto de la curva se realizó por triplicado al igual que la muestra de interés. La cuantificación de proteínas se realizó con el kit *Dc Protein Assay* (BioRad) correspondiente a una adaptación del método de Lowry siguiendo las instrucciones entregadas por el fabricante. Posteriormente, la absorbancia de las muestras se cuantificó a 630 nm en un espectrofotómetro. La concentración de proteínas fue obtenida por interpolación de los valores de absorbancia a 630 nm en la curva estándar.
3.2.11 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los extractos de proteína fueron tratados bajo condiciones denaturantes y reductoras. Para esto, las muestras fueron calentadas a 100°C por 5 min en tampón de carga (Tris-HCl 240 mM, SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0.001%) adicionado de 5% (v/v) de β -mercaptoetanol. La electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones denaturantes y reductoras (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970).

De las muestras de proteínas totales y citoplasmáticas se cargaron 40 µg de proteína por carril. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V de corriente por 1 hora en tampón de corrida [Tris-HCl 25 mM (pH 8.0), glicina 190 mM, SDS 0.1%]. Una vez terminada la corrida electroforética, se transfirió el gel desde las placas a una solución de teñido (metanol 50% v/v, agua 40% v/v, ácido acético 10% v/v, azul de coomasie R-250 0.25% p/v) por espacio de 15 min. Para quitar el exceso de colorante y desteñir el gel, se utilizó una solución de desteñido (metanol 30% - ácido acético 10%).

3.2.12 Análisis de "Western Blot"

3.2.12.1 Electrotransferencia

Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF). La transferencia se realizó aplicando una intensidad de corriente de 30 mA durante 14 horas a 4°C. Para verificar la completa transferencia de las proteínas, el gel fue teñido según lo descrito en **3.2.11**.

3.2.12.2 Inmunodetección

Las membranas fueron lavadas dos veces en tampón TTBS [Tris-HCl 20 mM (pH 7.4), Tween-20 0.1%, NaCl 500 mM]. Posteriormente, fueron incubadas en solución de bloqueo (leche descremada 10% en tampón TTBS) por 2 horas a TA. Luego, cada membrana fue incubada con el anticuerpo primario diluido en leche descremada 3% en tampón TTBS, durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Subsiguientemente, las membranas fueron lavadas 4 veces con tampón TTBS por 5 minutos cada vez a T° ambiente, para luego ser incubadas por 1 hora a TA con el anticuerpo secundario (anti-IgG acoplada a peroxidasa de rábano) diluido en tampón TTBS. El exceso de anticuerpo se eliminó lavando la membrana 4 veces con tampón TTBS por 5 min cada vez. Finalmente, las membranas fueron reveladas utilizando un método de quimioluminiscencia no radiactivo, según recomendaciones del fabricante (ECLTM, *Western Blotting Analysis System*, Amersham).

4. **RESULTADOS**

4.1 Cultivo y caracterización de CTM-SCU y CTM-MO.

4.1.1 Cultivo de CTM a partir de SCU y MO.

La obtención de cultivos de CTM-SCU fue realizado de acuerdo a lo descrito por Erices y col. (2000). Las células mononucleares fueron sembradas a una densidad de 1x106 cél/cm2 y cultivadas en medio -MEM suplementado con 10% de SFB por un período de tiempo aproximado de 14 días, durante el cual se monitoreó en forma permanente la aparición de células adherentes.

En un inicio se observó la aparición de colonias de células alargadas (Fig. 5A). Al observar a mayor aumento la forma de éstas, se comprobó que presentaban una morfología fibroblastoide bipolar (Fig. 5B) similar a lo descrito para CTM-MO (Conget y Minguell, 1999).

Estas células fueron tripsinizadas y subcultivadas en medio -MEM/10%SFB. Se observó que proliferaron hasta formar una monocapa continua y homogénea de células, la que cubrió toda la placa de cultivo (Fig. 5C). Una vez alcanzada la confluencia, estas células fueron sucesivamente subcultivadas y utilizadas para realizar los experimentos posteriores.

La obtención de CTM-MO, fue realizado de acuerdo a lo descrito por Conget y Minguell (1999). El cultivo de las células mononucleares en -MEM/10% SFB dio origen a una población de células adherentes de morfología fibroblastoide, similar a aquellas aisladas de SCU (Fig. 5D). Estas células fueron posteriormente subcultivadas y expandidas de manera análoga a lo descrito para CTM-SCU.

4.1.2 Inmunotipificación de CTM-SCU y CTM-MO.

Una vez establecidos los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, se llevó a cabo la inmunocaracterización de estas células. Para este propósito, las células fueron marcadas con los



Figura 5.- Establecimiento de cultivos de CTM a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea humana. En el panel **A** se observa un foco inicial de CTM obtenido a partir de cultivos primarios de SCU (40X) y en **B**, un aumento mayor de la morfología fibroblastoide de las células (200X). Panel **C**: cultivos confluentes de CTM–SCU (200X). Panel **D**: cultivos de CTM obtenidos de aspirados de MO (40X).

anticuerpos monoclonales anti -SH2, -SH3, -SH4, -ASMA, los cuales reconocen antígenos presentes en CTM y no en las CT hematopoyéticas, también presentes en el estroma de la MO. El análisis de expresión de estas proteínas fue llevado a cabo mediante citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia (Hynesworth y col., 1992; Conget y Minguell 1999; Erices y col., 2000).

Los resultados obtenidos en el análisis citofluorimétrico demostraron la expresión de los antígenos SH2, SH3, SH4 y ASMA en ambas poblaciones celulares (Fig 6). Este resultado se obtuvo para la amplia mayoría de la población analizada en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, confirmando la expresión de estas proteínas en ambos grupos celulares.

En el análisis por microscopía de epifluorescencia (Fig. 7) se observó que el marcaje con los anticuerpos anti -SH3 y -SH4 se encontraba asociado a la superficie de las células. Por otra parte, el marcaje con el anticuerpo anti -ASMA mostró que esta proteína forma una red de filamentos intracelulares reconocibles como parte del citoesqueleto celular.

Estos resultados fueron complementados por estudios de nuestro laboratorio, analizando la expresión de marcadores de linaje hematopoyéticos tales como CD34, CD14, CD45. Se encontró que tanto las CTM-SCU como las CTM-MO no expresaban estos marcadores.

En conjunto, estos resultados demostraron que los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO presentan un inmunofenotipo similar sobre la base de la expresión de los antígenos SH2, SH3, SH4 y ASMA, el cual es compartido por la amplia mayoría de las células en ambas poblaciones.

4.1.3 Ensayos de diferenciación adipogénico y osteogénico.

Una vez caracterizado el inmunofenotipo de las células presentes en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, se procedió a analizar su potencial de diferenciación mediante ensayos de diferenciación hacia los linajes adipogénico y osteogénico.



Figura 6.- Inmunotipificación de CTM-SCU y CTM-MO mediante citometría de flujo. Las células fueron tripsinizadas y marcadas con anticuerpos monoclonales para ser procesadas y analizadas mediante citometría de flujo con el programa CellQuest.



Figura 7.- Inmunotipificación de CTM mediante microscopía de epifluorescencia. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos anti –SH3, -SH4 y –ASMA. Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo anti – ratón acoplado a FITC. Aumento total de 400X.

Para inducir la diferenciación hacia el linaje adipogénico, las células fueron incubadas en medio adipogénico por un período de tiempo aproximado de 14 días. Durante este período se observó la acumulación progresiva de gotas de lípidos en la región perinuclear/citoplasmática de las células. Para confirmar la naturaleza lipídica de estas observaciones se realizó una tinción citoquímica con Oil Red O, lo cual permitió visualizar células portadoras de gotas de lípidos teñidas de color rojo en los cultivos (Fig. 8A).

Por otra parte, la inducción al linaje osteogénico se realizó cultivando las células en medio osteogénico por un período de 14 días. En un inicio se observó la transición hacia una morfología de tipo cuboidal por parte de las células, lo cual se acompañó de la formación y deposición progresiva de una matriz extracelular mineralizada, en forma de nódulos discretos de mineralización en los cultivos de ambas poblaciones celulares. Para confirmar que estas observaciones correspondían a nódulos de matriz extracelular calcificada, se realizó una tinción citoquímica con Alizarin Red S lo cual permitió visualizar focos de mineralización teñidos de color rojizo en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO (Fig. 8B).

El conjunto de resultados obtenidos en los análisis de morfología celular, inmunotipificación con los anticuerpos anti -SH2, -SH3 -SH4 y -ASMA como asimismo de diferenciación hacia los linajes osteogénico y adipogénico, nos permitieron reconocer a las poblaciones celulares adherentes obtenidas de SCU y MO como CTM, las cuales fueron utilizadas en todos los experimentos que se describen en esta tesis.



Figura 8.- Diferenciación osteogénica y adipogénica de CTM-SCU y CTM-MO. En el panel A se observa la diferenciación adipogénica en CTM-SCU y CTM-MO evidenciada mediante una tinción con Oil Red O (Aumento total 200X). En el panel B se observa la diferenciación osteogénica de ambas poblaciones celulares, observándose nódulos de calcificación teñidos con Alizarin Red S (Aumento total 200X).

4.2 Estudios comparativos de expresión de marcadores de diferenciación en CTM-SCU y CTM-MO.

4.2.1 Marcadores tempranos de diferenciación hacia linajes mesenquimáticos.

Como se ha señalado anteriormente en 2.2, diversos estudios han demostrado la capacidad de diferenciación de las CTM-MO y CTM-SCU hacia distintos linajes celulares, tanto en modelos in vitro como in vivo (Minguell y col., 2001). En estos estudios, el avance a lo largo de una vía de diferenciación ha sido descrito sobre la base de expresión de marcadores de diferenciación (tempranos, intermedios y tardíos) cuya expresión y/o actividad se asocia a la adquisición progresiva de una condición de mayor compromiso y maduración dentro de la vía de diferenciación escogida.

En el contexto de la diferenciación de las CTM, existe escasa información referente al perfil de expresión de marcadores de diferenciación en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, en forma previa a la inducción de la diferenciación hacia un linaje en particular.

Decidimos abordar esta interrogante como una primera estrategia al estudio comparativo de estas poblaciones celulares, con el propósito de conocer la batería de marcadores tempranos de diferenciación que estuvieran expresados en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO.

Para este propósito, las células fueron procesadas para inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos contra marcadores tempranos de diferenciación hacia los linajes osteogénico (Runx-2/Cbfa-1, Msx-2) (Ducy y col., 1997), condrogénico (Sox-9) (Akiyama y col., 2002) miogénico (Myo-D, Myf-5) (Perry y Rudnick., 2000) y adipogénico (PPAR-γ) (Lowell, 1999). Todos estos marcadores, a excepción de Msx-2, han sido descritos como "genes maestros" de los procesos de diferenciación osteogénica, condrogénica, miogénica y adipogénica respectivamente, por cuanto su expresión y/o actividad ha demostrado ser absolutamente necesaria para el compromiso y progresión a lo largo de cada vía de diferenciación en particular. Por su parte, Msx-2 es un factor de transcripción necesario para el correcto desarrollo del tejido óseo (Satokata y col., 2000). Entre sus funciones se ha descrito que es capaz de modular la actividad transcripcional de Runx-2/Cbfa-1 a través de interacciones proteína - proteína (Shirakabe y col., 2001) y de inhibir la actividad del promotor de osteocalcina también a través de interacciones proteína – proteína con diversos cofactores, entre ellos Dlx-5, Dlx-3 y MINT (Newberry y col., 1997; Sierra y col., 2004).

Los resultados obtenidos en el análisis mediante microscopía de epifluorescencia, demostraron que tanto los cultivos de CTM-SCU como de CTM-MO expresan todos los marcadores analizados (Fig. 9). Para cada uno de ellos, se obtuvo una fuerte marcación asociada al núcleo celular, la cual se observó en la amplia mayoría de las células analizadas, sugerente de que ambas poblaciones

celulares expresan simultáneamente todos los marcadores analizados.

Junto a esto, fue posible observar algunas diferencias en la forma de marcaje asociada a cada factor. Es así como Runx-2/Cbfa-1, Sox-9, PPAR-γ y Myf-5 mostraron una distribución homogénea dentro de la región nuclear tanto en las CTM-SCU como en las CTM-MO. Por otra parte, MyoD mostró un patrón similar, destacando sin embargo la presencia de zonas definidas de marcación más intensa, sugerentes de una acumulación en dominios específicos de la región nuclear. De forma análoga, en el caso de Msx-2 se observó un marcaje de tipo puntiforme, el cual se encontró distribuido dentro de toda la región nuclear, igualmente sugerente de una compartimentalización en dominios discretos del núcleo.

Para confirmar la expresión de estas proteínas en las poblaciones de CTM-SCU y CTM-MO, se preparó extractos de proteínas totales a partir de cultivos de CTM-SCU y CTM-MO los cuales fueron analizados mediante western blot (Fig. 10). Los resultados obtenidos demostraron la presencia de una banda inmuno reactiva del tamaño molecular esperado para cada proteína, confirmando de esta manera, los resultados obtenidos en el análisis por inmunofluorescencia indirecta.

Una vez demostrada la expresión de estos marcadores tempranos de diferenciación en los cultivos de CTM - SCU y CTM - MO, resultó de interés conocer la proporción de células que

Figura 9.- Expresión de marcadores tempranos de diferenciación hacia linajes mesenquimáticos en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO mediante inmunofluorescencia indirecta. Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos y marcadas con anticuerpos dirigidos contra las proteínas Runx-2/Cbfa-1, Msx-2, Sox-9, MyoD, Myf-5 y PPAR- . Para cada marcador se observa una microfotografía de la fluorescencia asociada al núcleo de las células detectada en un microscopio de luz UV a un aumento de 400X, junto al aumento de un núcleo celular a 1000X con su correspondiente marcaje con bis-benzimida (Hoescht 33342).

CTM-SCU





Runx-2/Cbfa-1

Msx-2



CTM-SCU



PPAR-γ

MyoD

Myf-5





CTM-MO









Figura 10.- Análisis de expresión de marcadores específicos de linaje en cultivos de CTM- SCU y CTM-MO mediante w*estern blot.* Extractos de proteínas totales obtenidas a partir de cultivos expandidos de CTM-SCU y CTM-MO fueron analizadas utilizando anticuerpos dirigidos contra las proteínas Runx-2/Cbfa-1, Msx-2, Sox-9, MyoD, Myf-5 y PPAR-y.

expresaban estas proteínas dentro de la población total presente en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO.

Para abordar esta interrogante se realizaron análisis por citometría de flujo en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO (Fig. 11). Este enfoque experimental permite realizar una estimación cuantitativa de la proporción de células que expresa cada marcador, como asimismo evaluar la posibilidad de que existieran distintas subpoblaciones celulares, las que por separado expresaran cada una de estas proteínas. Los resultados obtenidos demostraron que en ambas poblaciones celulares, la amplia mayoría de las células expresan todos los marcadores analizados de acuerdo a la obtención de una señal única de intensidad media de fluorescencia (IMF), en comparación al respectivo control negativo de cada experimento.

En su conjunto, los resultados obtenidos en los análisis por microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo y *western blot*, nos permiten concluir que los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO corresponden a poblaciones celulares que expresan marcadores tempranos de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico, miogénico y adipogénico, en forma previa al contacto con un estímulo de diferenciación específico. De acuerdo a estos resultados, no existirían diferencias en cuanto a la presencia de estos marcadores entre los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, por cuanto todos ellos están presentes en ambas poblaciones celulares.

4.2.2 Marcadores tempranos de diferenciación hacia linajes no mesenquimáticos.

Habiendo demostrado la expresión de marcadores tempranos de diferenciación hacia linajes de origen mesenquimático en CTM-SCU y CTM-MO, resultó de interés abordar la posibilidad de que estas células compartieran la expresión de marcadores característicos de diferenciación hacia otros linajes de origen no mesenquimático.

Figura 11.- Análisis de expresión de marcadores tempranos de diferenciación hacia linajes mesenquimáticos en CTM-SCU y CTM-MO mediante citometría de flujo. Cultivos de CTM-SCU y CTM-MO fueron tripsinizados y procesados para análisis por citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra Runx-2/Cbfa-1, Msx-2, Sox-9, MyoD, Myf-5 y PPAR-γ. Para cada antígeno se analizaron 10.000 eventos mediante el programa CellQuest. En el panel A se muestran los histogramas obtenidos para el análisis de cada antígeno en cultivos de CTM-SCU. En B, histogramas correspondientes a los análisis realizados en cultivos de CTM-MO.



A partir de extractos de proteínas totales de CTM-SCU y CTM-MO se analizó la expresión de Nestina, NeuroD y Pdx-1 mediante análisis por western blot.

De estas proteínas, Nestina es un filamento de tipo intermedio cuya expresión ha sido ampliamente descrita en células troncales neuroepiteliales del sistema nerviosos central (Lendahl y col., 1990). Asimismo, diversos estudios han descrito su expresión en distintos tipos celulares tanto adultos como fetales caracterizados por una elevada capacidad proliferativa y regenerativa (Namiki y Tator, 1999). Sobre la base de estas observaciones, algunos autores han definido a Nestina como una proteína marcadora de células progenitoras multipotenciales, capaces de participar en procesos de regeneración tisular (Wiese y col., 2004).

Por otra parte, NeuroD es un factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas basic helix-loop-helix (bHLH) el cual ha demostrado tener un rol fundamental en etapas tempranas de la diferenciación neurogénica y pancreática (Chae y col., 2004). Pdx-1 por su parte, es un factor de transcripción del tipo homeodominio capaz de transactivar el promotor de insulina (Petersen y col., 1994), y ha sido descrito como un regulador clave en el desarrollo del tejido pancreático (Offield y col., 1996).

Los resultados obtenidos en el análisis por western blot, demostraron que tanto los cultivos de CTM-SCU como de CTM-MO expresan todos estos marcadores, de acuerdo a la obtención de una banda inmunoreactiva del peso molecular esperado para cada proteína (Fig. 12).

En conclusión, estos resultados nos permiten ampliar nuestra conclusión anterior señalando que los cultivos de CTM-SCU y de CTM-MO representan poblaciones celulares que comparten la expresión simultánea de marcadores tempranos de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico, miogénico, pancreático y neural, en ausencia de un estímulo de diferenciación específico hacia alguna de estas vías de diferenciación.



Figura 12.- Expresión de proteínas marcadoras de los linajes neurogénico y pancreático en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO. Se observa la inmunodetección de NeuroD, Nestina y Pdx-1 en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO mediante *western blot*.

De los marcadores estudiados, encontramos que todos ellos se expresan tanto en los cultivos de CTM-SCU como CTM-MO, por cuanto concluimos que ambos grupos celulares son equivalentes en cuanto al perfil de expresión de los marcadores analizados.

4.2.3 Expresión de marcadores de diferenciación óseos durante la diferenciación osteogénica de CTM-SCU y CTM-MO.

4.2.3.1 Marcadores tempranos de diferenciación.

Entre los resultados entregados en la sección anterior, demostramos la expresión de dos marcadores tempranos de la diferenciación osteogénica, Runx-2/Cbfa-1 y Msx-2, ambos necesarias para el desarrollo del tejido óseo (Ducy y col., 1997; Satokata y col., 2000).

Como un primer enfoque al análisis comparativo del proceso de osteodiferenciación en CTM-SCU y CTM-MO, decidimos evaluar el perfil de expresión de estas proteínas durante el progreso de la diferenciación osteogénica. Para este propósito, realizamos análisis de inmunofluorescencia indirecta y de western blot con anticuerpos dirigidos contra cada una de estas proteínas, en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO incubados por 0, 7 y 14 días, en medio osteogénico.

En el caso de Runx-2/Cbfa-1, los resultados obtenidos mostraron que en ambas poblaciones celulares se observó una localización intracelular predominantemente asociada a la región nuclear, tanto al inicio de la inducción osteogénica, como a los 7 y 14 días de estimulación (Fig 13). Mediante análisis por western blot de extractos de proteínas totales obtenidas a estos mismos tiempos de estímulo, pudimos comprobar que los niveles de expresión de Runx-2/Cbfa-1 no mostraron variaciones significativas durante la diferenciación osteogénica de CTM-SCU y CTM-MO. Estos resultados se encuentran en concordancia con datos de la literatura, los cuales señalan que el nivel de expresión de Runx-2/|Cbfa-1 no sufriría variaciones significativas durante el progreso de la diferenciación osteogénica de las CTM-MO humanas (Shui y col., 2003).

Figura 13.- Análisis de expresión de Runx-2/Cbfa-1 durante la diferenciación osteogénica de CTM-SCU y CTM-MO mediante inmunofluorescencia indirecta y *western blot***. En el panel A se observa la inmunodetección de Runx-2/Cbfa-1 mediante inmunofluorescencia indirecta. Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos y marcadas con un anticuerpo anti –Runx-2/Cbfa-1 a los 0, 7 y 14 días de estimulación osteogénica. Se observa una microfotografía de la fluorescencia asociada al núcleo de las células en un microscopio de luz UV a un aumento de 400 X.**

En el panel B, se aprecia la inmunodetección de Runx-2/Cfa-1 mediante *western blot* a los 0, 7 y 14 días de estimulación osteogénica.

A



0 7 14



(DÍAS)

Runx-2/Cbfa-1

B

En el caso de Msx-2, encontramos que en la población de CTM-SCU la localización de este factor mostró estar asociada principalmente al núcleo de las células, tanto a los 0, 7 y 14 días del ensayo. Sin embargo observamos a partir del séptimo día de estimulación, la aparición de una señal fluorescente asociada al citoplasma de las células, la cual fue también evidenciada al décimo cuarto día de estimulación osteogénica (Fig. 14).

Estos resultados fueron confirmados mediante análisis por western blot en extractos de proteínas totales y citoplasmáticas de CTM-SCU incubadas por 14 días con medio osteogénico, comprobando que la presencia de Msx-2 asociada al citoplasma de las células, sólo fue detectable a los 7 y 14 días de estimulación, concordante con lo observado en el análisis por inmunofluorescencia (Fig. 15).

En el caso de CTM-MO observamos un patrón de localización intracelular similar, en el cual se observó asimismo una localización nuclear para Msx-2 a los 0, 7 y 14 días de estimulación osteogénica. Sin embargo, pudimos constatar que la localización citoplasmática de este marcador no resultó ser tan notoria en comparación a lo observado en CTM-SCU. Esta diferencia en el grado de asociación citoplasmática para Msx-2 en células fetales y adultas se encuentra descrita por Stelnicki y col. (1997), quienes también hallaron una distribución citoplasmática más prominente de este marcador en células de origen fetal, en un modelo de tejido epidérmico fetal y adulto.

En conclusión, estos resultados nos permiten concluir que las CTM-SCU y CTM-MO muestran un perfil de expresión y localización subcelular similar del marcador Runx-2/Cbfa-1, el cual no presenta variaciones significativas asociadas al progreso de la diferenciación osteogénica en ambas poblaciones celulares. Análogamente, la localización subcelular de Msx-2 muestra ser similar durante la diferenciación osteogénica en ambos grupos celulares, destacando sin embargo una mayor localización citoplasmática asociada al avance de la diferenciación en CTM-SCU en comparación a lo observado para CTM-MO.



Figura 14.- Análisis de expresión de Msx-2 durante la diferenciación osteogénica de CTM-SCU y CTM-MO mediante inmunofluorescencia indirecta. Cultivos confluentes de células fueron incubados con medio de diferenciación osteogénico, para ser posteriormente analizados a los 0, 7 y 14 días de estímulo. Se muestra la inmunodetección de Msx-2 por inmunofluorescencia indirecta en cultivos crecidos sobre cubreobjetos, y analizados mediante microscopía de epifluorescencia a un aumento total de 400X. Las flechas indican la aparición de la señal fluorescente asociada al citoplasma de las células.



Figura 15.- Inmunodetección de Msx-2 en fracciones totales y citoplasmáticas de CTM-SCU mediante *western blot*. Se observa la inmunodetección de Msx-2 en extractos de proteínas totales y citoplasmáticas de CTM-SCU incubadas en medio osteogénico por 0, 7 y 14 días. Como control de carga se utilizó β-actina.

4.2.3.2 Marcadores intermedios/tardíos

4.2.3.2.1 Actividad Fosfatasa Alcalina

Los resultados obtenidos en los análisis de expresión y localización subcelular de Runx-2/Cbfa-1 y Msx-2 demostraron que tanto las CTM-SCU como las CTM-MO presentan patrones de expresión y localización subcelular similares para estos marcadores, tanto al inicio como durante el progreso de la diferenciación osteogénica.

Para complementar estos resultados decidimos evaluar la expresión y actividad de un marcador de diferenciación de tipo intermedio, dentro de la secuencia de factores asociados al progreso de la diferenciación osteogénica.

Del conjunto de proteínas asociadas al fenotipo osteoblástico, la isoforma óseo/renal/hepática de fosfatasa alcalina es uno de los marcadores bioquímicos de la actividad osteoblástica más ampliamente utilizados (Magnusson y col., 1999). La importancia de esta enzima en el proceso de osificación ha sido evidenciado en los casos de hipofosfatasia, una enfermedad hereditaria caracterizada por una formación ósea defectiva debido a la deficiencia de esta proteína (Whyte, 1987). Su actividad ha mostrado estar asociada al proceso de mineralización de la matriz ósea y como tal, ha sido utilizada en diversos estudios como marcador intermedio de la diferenciación osteogénica.

Decidimos evaluar la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, tanto en forma previa al estímulo de diferenciación, como una vez llevada a cabo la inducción de éste.

El análisis citofluorimétrico mostró que los cultivos de CTM-SCU presentaban un valor de intensidad media de fluorescencia (IMF) de 5, mientras que en el caso de las CTM-MO este parámetro alcanzó un valor de 125 (Fig. 16A). La comparación de los histogramas de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina entre ambas poblaciones celulares, fue realizada con el programa CellQuest sobre la base del análisis estadístico de Kolmogorov – Smirnov, el cual permite estimar el grado de mayor



Figura 16.- Análisis de la actividad fosfatasa alcalina en cultivos de CTM -SCU y CTM-MO mediante citometría de flujo. En el panel A se muestra el análisis cito-fluorimétrico de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, medida mediante hidrólisis de FDP. La células fueron incubadas con FDP y analizadas mediante citometría de flujo. Se analizaron 5000 eventos en cada caso. En el panel B se muestra el resultado del análisis estadístico realizado mediante el método de Kolmogorov-Smirnov.

discrepancia entre dos histogramas a través del parámetro D (Young, 1977). El valor del índice D señala la máxima diferencia entre ambos histogramas, cuyos valores se indican en el rango de 0 - 1. Para dos curvas de distribución idéntica D = 0, mientras que en el caso de histogramas de distribuciones completamente distintas D = 1.

Los resultados obtenidos a través de este análisis muestran un índice D = 0.8 (p < 0.001) al comparar las distribuciones de frecuencia en los histogramas obtenidos al analizar la actividad de fosfatasa alcalina en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO (Fig. 16B).

Para corroborar este resultado, se utilizó una tinción citoquímica la cual permite visualizar células fosfatasa alcalina positivas teñidas en la placa de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que los cultivos de CTM-SCU presentaron sólo algunas células teñidas (Fig. 17). Por el contrario, los cultivos de CTM- MO mostraron un número ampliamente mayor de células fosfatasa alcalina positivas, apoyando así el resultado obtenido en el análisis por citometría de flujo. Destaca en este resultado, las diferencias en intensidad de tinción entre las células fosfatasa alcalina positivas dentro una misma población celular, observándose células muy marcadas junto a otras con un grado notablemente menor de tinción. Esta observación es sugerente de un grupo celular heterogéneo en cuanto a la existencia de células osteoprogenitoras con distinto grado de expresión y/o actividad enzimática de este marcador.

En conjunto, estos resultados nos permiten señalar que los cultivos de CTM-SCU presentan una proporción menor de células con actividad fosfatasa alcalina en comparación a los cultivos de CTM-MO, lo cual daría cuenta del valor más bajo de actividad enzimática mostrado por los cultivos de CTM-SCU en el análisis por citometría de flujo. Este resultado podría ser indicativo de que los cultivos de CTM-SCU presentan una proporción menor de células osteoprogenitoras más comprometidas con la diferenciación osteogénica, por cuanto la expresión y/o actividad de esta enzima ha sido utilizada por diversos autores como marcadora de células osteoprogenitoras, las que

CTM-SCU





Figura 17.- Análisis de la actividad de fosfatasa alcalina en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO mediante tinción citoquímica. Se observa una microfotografía de una tinción citoquímica realizada en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, en la cual las células teñidas de color violeta-rosáceo corresponden a células fosfatasa alcalina positivas (flechas) (Aumento 200X).

han avanzado en la vía de diferenciación osteogénica hasta la etapa pre-osteoblástica (Gronthos y col., 1999).

Habiendo constatado una marcada diferencia en la proporción de células fosfatasa alcalina positivas en los cultivos de CTM-MO y CTM-SCU, decidimos evaluar la actividad de este marcador en respuesta a la inducción de la diferenciación osteogénica en ambas poblaciones celulares. Para este propósito, analizamos la actividad de fosfatasa alcalina mediante citometría de flujo a los 4 y 7 días de incubación con medio osteogénico.

Los resultados obtenidos demostraron que las CTM-SCU responden al estímulo osteogénico induciendo un aumento más acentuado en la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, en comparación a las CTM-MO (Fig. 18).

De acuerdo al análisis estadístico de los histogramas obtenidos tanto en ausencia como en respuesta al estimulo osteogénico, el aumento en la actividad enzimática de fosfatasa alcalina por parte de las CTM-SCU a los 4 y 7 días de estimulación osteogénica, muestra ser mayor en comparación al mostrado por las CTM-MO (Fig 19).

En el caso de las CTM-SCU, los valores del parámetro D muestra ser igual a 0.22 y 0.67 (p<0.001) a los 4 y 7 días de estimulación osteogénica respectivamente (Fig. 19A). Las CTM-MO en cambio, sólo muestran valores del índice D iguales a 0.14 y 0.09 (p<0.001) a los 4 y 7 días de estímulo, respectivamente (Fig 19B), indicativo de una menor diferencia en los niveles de actividad fosfatasa alcalina en comparación a la situación control.

En conclusión, estos resultados señalan que existirían diferencias en los niveles de actividad enzimática de fosfatasa alcalina entre los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, tanto en ausencia como en respuesta al estímulo de diferenciación osteogénica.

De acuerdo a nuestras observaciones, los cultivos de CTM-SCU presentarían una proporción menor de células fosfatasa alcalina positivas en comparación a los de CTM-MO. Una vez inducida la



Figura 18.- Actividad enzimática de fosfatasa alcalina en CTM-SCU y CTM-MO en respuesta al estimulo osteogénico. Cultivos confluentes de CTM-SCU y CTM-MO fueron incubados por 7 días con medio osteogénico y medio control. A los 4 y 7 días de estímulo, las células fueron incubadas con FDP y analizadas mediante citometría de flujo. En cada histograma, la actividad enzimática de células incubadas en medio control se representa por línea punteada y de aquellas en medio osteogénico con línea gruesa.



Figura 19.- Análisis estadístico de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO en respuesta al estímulo osteogénico mediante el modelo de Kolmogorov-Smirnov. Se muestra el resultado del análisis estadístico realizado sobre la actividad de fosfatasa alcalina observada en respuesta a la aplicación del estímulo osteogénico por 4 y 7 días. En cada representación, el valor D representa el grado de disimilitud máxima entre ambos histogramas.

diferenciación osteogénica, las CTM-SCU responderían al estímulo de diferenciación induciendo un aumento más acentuado en la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en comparación a las CTM-MO.

4.3.2.1 Expresión de osteopontina.

Sobre la base de las diferencias encontradas en el patrón de expresión y actividad de fosfatasa alcalina en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, decidimos correlacionar este resultado con la expresión de un marcador tardío de la diferenciación osteogénica.

Para esto, se decidió analizar la expresión de osteopontina, una fosfoglicoproteína cuya expresión ha sido descrita en células osteoblásticas durante la etapa de mineralización de la matriz extracelular (Beck y col., 1998).

Para abordar este objetivo, se prepararon extractos de proteínas totales a partir de cultivos de CTM-SCU y CTM-MO incubados por 0, 7 y 14 días con medio osteogénico, los cuales fueron analizados mediante western blot (Fig. 20).

Los resultados obtenidos demostraron que los cultivos de CTM-MO expresan osteopontina en ausencia del estímulo de diferenciación osteogénica, de acuerdo a la obtención de una banda inmunoreactiva del tamaño molecular descrito para esta proteína (Geissinger y col., 2002). Este resultado estaría en concordancia con lo reportado por Mendes y col. (2004), quienes también han descrito la expresión de osteopontina en cultivos de CTM-MO humanas. Los cultivos de CTM-SCU por el contrario, no expresan osteopontina en ausencia del estímulo de diferenciación osteogénico (Fig 20 A).

Este resultado estaría en concordancia con lo observado en los análisis de actividad enzimática de fosfatasa alcalina, los cuales muestran que los cultivos de CTM-SCU representarían una población celular compuesta por una proporción mayor de células osteoprogenitoras inmaduras



Figura 20: Análisis de la expresión de OPN en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO. En el panel A se observa la inmunodetección de osteopontina mediante *western blot* en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, en ausencia del estímulo osteogénico revelando que sólo las CTM-MO expresan niveles detectables de la proteína. En el panel B se muestra que ambas poblaciones celulares expresan la proteína a los 7 y 14 días de estímulo osteogénico. Como control de carga se analizó la expresión de β -actina.

caracterizadas por una baja expresión y actividad de fosfatasa alcalina. En apoyo a esta aseveración, encontramos que los cultivos de CTM-SCU no expresan osteopontina.

Asimismo este resultado se encuentra en concordancia con datos existentes en la literatura, los cuales han descrito que la expresión de osteopontina es dependiente del nivel enzimático de fosfatasa alcalina (Beck y col., 1998). De esta manera, en circunstancias en que el nivel enzimático de fosfatasa alcalina es bajo, la expresión de osteopontina se vería inhibida a consecuencia de una disminuida concentración de fosfato inorgánico en el medio extracelular, el cual es un factor necesario para estimular la expresión de este marcador (Beck y col., 2003).

A continuación analizamos la expresión de osteopontina a los 7 y 14 días de inducción osteogénica. Los resultados mostraron que tanto los cultivos de CTM-SCU como de CTM-MO expresan este marcador en ambos tiempos de análisis, indicativo de que ambas poblaciones celulares responden al estímulo de diferenciación osteogénica induciendo la expresión de osteopontina (Fig 20B). Estas observaciones estarían en concordancia con los resultados obtenidos en el análisis enzimático de fosfatasa alcalina, por cuanto los cultivos de CTM-SCU responden al estímulo osteogénico incrementando el nivel enzimático de este marcador, lo cual elevaría la concentración de fosfato inorgánico extracelular y la consiguiente expresión de osteopontina. Los cultivos de CTM-MO por su parte, muestran un nivel enzimático mayor de fosfatasa alcalina en ausencia de un estímulo de diferenciación y luego, un aumento discreto en respuesta al estímulo osteogénico. Estos niveles de actividad permitirían la expresión de osteopontina tanto en ausencia como en respuesta al estímulo de diferenciación osteogénico.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO presentan un patrón similar de expresión de marcadores tempranos de diferenciación osteogénica, tanto en ausencia como en respuesta a la aplicación del estímulo de diferenciación osteogénico.

Sin embargo, la expresión y/o actividad de marcadores intermedios y tardíos muestra ser
diferente en ambas poblaciones, sugerente de grupos celulares con distinta proporción de progenitores osteogénicos inmaduros. A su vez, estas diferencias estarían asociadas a un potencial de respuesta distinto frente al estímulo osteogénico entre las poblaciones de CTM-SCU y CTM-MO humanas.

5. DISCUSIÓN

Las CTM corresponden a un tipo celular caracterizado por su capacidad de diferenciación hacia múltiples tipos celulares (osteocitos, condrocitos, miocitos, adipocitos, tenocitos) como asimismo por ser capaces de llevar a cabo procesos de autorenovación y proliferación en el organismo en el cual residen. La presencia de estas células ha sido descrita tanto en tejidos adultos como fetales, mostrando poseer en ambos casos características morfológicas e inmunofenotípicas similares (Erices y col., 2000; Campagnoli y col., 2001; Minguell y col., 2001; Lee y col., 2004).

Existe creciente evidencia científica que señala que las CT de un organismo más joven, presentarían un conjunto de características sugerentes de un mayor potencial de desarrollo y diferenciación, en comparación a sus respectivas contrapartes adultas (O'Donoghue y Fisk, 2004). En el caso de la CTM, ha sido postulado que el potencial de diferenciación hacia el linaje osteogénico disminuiría con la edad, siendo mayor en individuos más jóvenes (Oreffo y col., 1998; D' Ippolito y col., 1999, Mueller y Glowaki, 2001).

Con el objetivo de caracterizar los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO humanas y evaluar comparativamente su potencial de respuesta frente a un estímulo de diferenciación osteogénico, el trabajo realizado en esta tesis analizó el perfil de expresión de marcadores tempranos de diferenciación en ambas poblaciones celulares, y posteriormente evaluó la expresión y/o activación de marcadores osteogénicos tempranos, intermedios y tardíos, al inducir la diferenciación osteogénica en ambas poblaciones celulares.

5.1 Expresión de marcadores tempranos de diferenciación en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO.

La presencia de la CTM ha sido descrita en numerosos tejidos en adición a la MO, tales como tejido adiposo, muscular, periosteo, hueso trabecular, dermis, y tejido decidual dentario. Dada esta amplia distribución de las CTM, la MO puede ser considerada como la fuente primaria de esta población celular multipotente, la cual accede a los diferentes tejidos por medio de la circulación, adoptando en forma subsiguiente características funcionales que le permitan cumplir con los requerimientos de mantención y reparación de un tipo celular dañado (Tuan y col., 2003). En el caso de las CTM-MO, existe numerosa evidencia que señala la capacidad de estas células para participar en procesos regenerativos y de reparación tisular (Minguell y col., 2000; Mackenzie y Flake, 2001).

Los resultados obtenidos en la primera etapa de este trabajo, demostraron que los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO corresponden a poblaciones celulares que comparten la expresión de marcadores tempranos de diferenciación hacia los linajes osteogénico (Runx-2/Cbfa-1; Msx-2), condrogénico (Sox-9), miogénico (MyoD, Myf-5), adipogénico (PPAR-γ), neural (NeuroD, Nestina) y pancreático (Pdx-1, NeuroD). Esta múltiple expresión de marcadores tempranos de diferenciación podría ser interpretada como un estado de "latencia", en el cual una vez que la CTM es alcanzada por un estímulo de diferenciación determinado, abandonaría la MO y entraría a la circulación sanguínea para así acceder al tejido dañado.

La co-expresión de estos marcadores en ausencia de un estímulo de diferenciación específico es un hallazgo importante y novedoso por cuanto la mayoría de éstos corresponde a "genes maestros", responsables de iniciar y dirigir la diferenciación de las CT hacia un tipo celular específico. Este hecho podría ser explicado argumentando que estos marcadores residirían en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO en espera de una señal inductora de la diferenciación. Al recibir

el estímulo, cada uno de ellos interactúa con un número de proteínas, orquestando distintas vías de señalización intracelular, las que en su conjunto coordinan el inicio y el progreso de la diferenciación hacia un linaje celular específico. Se han descrito diversos mecanismos involucrados en la activación de los factores responsables de controlar las etapas tempranas de la diferenciación celular. De éstos, se ha demostrado que la accesibilidad de la cromatina desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica (Grunstein, 1997). En el caso de los marcadores analizados en este trabajo, se ha demostrado una directa asociación entre la activación de éstos y la interacción con deacetilasas de histonas (McKinsey y col., 2001; Fajas y col., 2002). Asimismo, se encuentran descritos mecanismos de regulación por medio de la adquisición y/o pérdida de modificaciones post-traduccionales (Shui y col., 2003). Este conjunto de antecedentes plantea la posibilidad de que existan diferencias en el estado funcional de estos marcadores en las CTM-SCU y CTM-MO.

Junto a estas observaciones, la expresión de Nestina en las CTM-SCU y CTM-MO, fuertemente sugiere que estas poblaciones celulares se encontrarían dotadas de la capacidad para participar en procesos regenerativos en el organismo. Durante la embriogénesis, su expresión es abundante en CT embrionarias como asimismo en células precursoras de distintos tipos celulares (tejido neural, pancreático, hepático, dentario) presentes durante la vida fetal. En el individuo adulto, se ha observado que la expresión de Nestina se encuentra descrita en respuesta a señales de daño tisular, en poblaciones celulares capaces de proliferar, diferenciar y migrar hacia zonas afectadas del organismo (Weise y col., 2004). Este conjunto de antecedentes apoya nuestras interpretaciones anteriores, como asimismo la posibilidad que estas células participen en el reemplazo de poblaciones celulares dañadas en el organismo.

Cabe señalar que la múltiple expresión de marcadores de diferenciación en poblaciones de CT que no han sido expuestas a un estímulo de diferenciación, ha sido previamente descrita por otros autores, tanto en el modelo de CTM como en el contexto de la CT hematopoyética. Es así como Seshi y col., 2003, reportaron la presencia de RNA mensajeros correspondientes a marcadores de diferenciación característicos de células osteoblásticas, condrogénicas, adipogénicas y musculares en cultivos de CTM-MO humanas. Análogamente, Tremain y col. (2001) describieron la presencia de múltiples transcritos asociados a distintos procesos de diferenciación tales como osteogénico, condrogénico, muscular, neural, y endotelial/epitelial en poblaciones clonales de CTM-MO humanas. Asimismo, Rosada y col. (2003), describieron la presencia del RNA mensajero correspondiente a Runx-2/Cbfa-1 en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO humanas. Por otra parte, esta idea ya ha sido vislumbrada en el contexto de la diferenciación de las CT hematopoyéticas, por cuanto existen trabajos que demuestran que estas células expresan simultáneamente genes involucrados en la diferenciación hacia los linajes eritroide y granulocítico, en forma previa al compromiso con una vía de diferenciación determinada (Hu y col., 1997).

Este conjunto de antecedentes, junto a los entregados en este trabajo, sugiere que la multipotencialidad de diferenciación descrita para las CT, residiría en su habilidad para activar simultáneamente distintos programas de expresión génica, asociados al compromiso con diversas vías de diferenciación celular. Esta aparente "promiscuidad" de expresión y afiliación a distintas vías de diferenciación, conferiría a estas células la capacidad de responder rápida y eficazmente las demandas del organismo en condiciones en que se requiera del reemplazo de poblaciones celulares dañadas. De acuerdo a esta interpretación, cabe plantear la posibilidad de que la capacidad de respuesta que presentan estas células en el organismo frente a diversos factores de diferenciación, resida justamente en esta habilidad para expresar un amplio repertorio de genes claves para el desarrollo de cada una de estas vías de diferenciación. De acuerdo a esto, una vez inducidas a seguir una vía de diferenciación en particular, las células emplearían mecanismos para excluir paulatinamente las opciones de diferenciación divergentes y conducir la diferenciación hacia el linaje celular deseado. En apoyo de esta interpretación, resultados de nuestro laboratorio han mostrado que

los cultivos de CTM-SCU expuestos por 48 horas al estímulo de diferenciación osteogénico, disminuyen significativamente los niveles de expresión de NeuroD.

Como conclusión, sobre la base de los resultados obtenidos en esta tesis postulamos que las CTM-SCU al encontrarse migrando en la circulación fetal desde sitios hematopoyéticos tempranos hacia la MO en formación, expresarían este amplio repertorio de marcadores tempranos de diferenciación como una estrategia para poder participar en la formación y/o remodelación de distintos órganos en el organismo que se está formando (además de hígado y MO fetal). En apoyo de esta interpretación, existen antecedentes que señalan la presencia de CTM en tejidos fetales, tales como MO, hígado, bazo y pulmón (Noort y col., 2002; Campagnoli y col., 2001; In't Anker y col., 2003). Junto a esto, se ha demostrado que las CTM-SCU son capaces de migrar hacia distintos tejidos y participar en la regeneración de poblaciones celulares dañadas de los mismos, al ser trasplantadas durante el desarrollo embrionario por medio de la circulación fetal (Le Blanc y col., 2005).

En conjunto, nuestros resultados han demostrado la múltiple expresión de marcadores tempranos de diferenciación hacia distintos linajes celulares en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO humanas (Fig. 21). Esta amplia expresión de marcadores reflejaría el carácter multipotencial de estas poblaciones celulares y la habilidad de estas células para responder a diversos estímulos de diferenciación tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, lo cual contribuiría a explicar la extraordinaria capacidad de diferenciación y la amplia distribución que las CTM muestran en el organismo.



Figura 21.- Diagrama ilustrativo de los marcadores tempranos de diferenciación expresados en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO. Se ilustra un esquema de las vías de diferenciación que pueden emprender las CTM y los tipos celulares maduros que cada una de éstas origina. De cada linaje celular, se muestran los marcadores tempranos de diferenciación analizados en este trabajo, cuya expresión fue demostrada en cultivos de CTM-SCU y CTM-MO.

5.2 Expresión de marcadores asociados a la diferenciación osteogénica en CTM-SCU y CTM-MO.

5.2.1 Marcadores tempranos de diferenciación

Habiendo demostrado la expresión de múltiples marcadores de diferenciación en los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO, dirigimos nuestra atención al análisis de la expresión y activación de marcadores óseos en respuesta a la aplicación de un estímulo de diferenciación osteogénico.

Observamos que al analizar el perfil de expresión y localización subcelular de un marcador temprano de la diferenciación osteogénica, no encontramos diferencias significativas en los resultados mostrados por ambas poblaciones celulares.

Es así como la expresión de Runx-2/Cbfa-1 mostró mantener niveles similares durante el progreso de la diferenciación osteogénica en las CTM-MO y CTM-SCU. Este resultado concuerda con lo descrito por Shui y col. (2003), quienes han reportado que la inducción de la diferenciación osteogénica en cultivos de CTM-MO no resulta en una variación significativa en el nivel de expresión de esta proteína, sino más bien induciría cambios en el patrón de fosforilaciones de este factor, los que serían dependientes a su vez de la activación de componentes de la vía de las MAP kinasas (Jaiswal y col., 2000). Sobre la base de estas observaciones, podemos señalar que nuestros resultados demuestran que los cultivos de CTM-SCU muestran un patrón similar al mostrado por las CTM-MO en cuanto al nivel de expresión de Runx-2/Cbfa-1 en respuesta al estímulo osteogénico. Junto a esto, plantean la posibilidad que nuestros resultados sean complementados con análisis destinados a evaluar la activación y funcionalidad de este marcador en respuesta al estímulo osteogénico en ambas poblaciones celulares.

En el caso de Msx-2 pudimos constatar la aparición de una señal citoplasmática asociada al progreso de la diferenciación osteogénica en CTM-SCU y CTM-MO. Msx-2 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas de homeodominio, el cual ha mostrado tener un

rol importante en la diferenciación osteogénica. Se ha descrito que es capaz de inhibir la actividad transcripcional de Runx-2/Cbfa-1 y la mineralización de la matriz extracelular en fibroblastos de ligamento (Yoshizawa y col., 2004).

Nuestros resultados sugieren que durante la diferenciación osteogénica de las CTM-MO y CTM-SCU, una fracción de Msx-2 sería movilizada al citoplasma de las células en forma concomitante al progreso de la diferenciación osteogénica. Esta traslocación, podría ser utilizada por las células para favorecer el avance de la diferenciación, al reclutar a un factor que impide la mineralización de la matriz hacia otro compartimento subcelular.

6.2.2 Marcadores intermedios y tardíos

Para complementar los resultados obtenidos en los análisis de expresión de Runx-2/Cbfa-1 y Msx-2 en respuesta al estímulo osteogénico en CTM-SCU y CTM-MO, analizamos la actividad enzimática de fosfatasa alcalina y la expresión de osteopontina en ambas poblaciones celulares, en ausencia y en repuesta a la aplicación del estímulo de diferenciación osteogénica.

Es así como nuestros resultados mostraron que los cultivos de CTM-SCU estarían compuestos por una proporción mayor de células osteoprogenitoras más tempranas en comparación a los cultivos de CTM-MO. En este contexto, las CTM-SCU representarían una población celular osteoprogenitora más inmadura en comparación a las CTM-MO.

Al analizar la población de células fosfatasa alcalina positivas presentes en ambos cultivos, se observó la presencia de un grupo celular heterogéneo en cuanto al grado de expresión y actividad de este marcador. Esta heterogeneidad podría ser interpretada sobre la base del modelo jerárquico de proliferación propuesto para las CTM-MO (Muraglia y col., 2000; Minguell y col., 2001). De acuerdo a este modelo, las CTM pueden comprometerse con una determinada vía de diferenciación bajo la regulación de señales químicas apropiadas. El avance y maduración en una vía de

diferenciación, se encuentra caracterizada por una disminución paulatina de la capacidad autoreplicativa de las células y un aumento progresivo en la elaboración y organización de componentes celulares característicos de la vía de diferenciación emprendida. La heterogeneidad observada tanto *in vitro* como *in vivo* en las poblaciones de CTM, se explicarían planteando que en la MO, la población de CTM estaría formada no sólo por las CTM pluripotenciales, sino además por distintas subpoblaciones de CTM con distinto potencial de diferenciación hacia diferentes tipos celulares, similar a lo descrito para las CT hematopoyéticas también presentes en la MO. Esta hipótesis explicaría la heterogeneidad observada en los cultivos de CTM-MO, los cuales si bien homogéneos en cuanto a la morfología e inmunofenotipo de las células que los constituyen, presentan distintos potenciales de diferenciación al ser analizados a nivel clonal, tanto en ensayos in vitro como in vivo (Fig. 22) (Basksh y col., 2004). Este modelo sería también aplicable a los cultivos de CTM-SCU, aunque estudios específicos no han sido realizados. No obstante, nuestras observaciones muestran que al aplicar el estímulo de diferenciación osteogénico, los cultivos de CTM-SCU evidencian zonas discretas de mineralización, las cuales se observan como nódulos de mineralización distribuidos heterogéneamente en la placa de cultivo. Observaciones similares son evidenciadas al inducir la diferenciación adipogénica, la cual resulta en la acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma de algunos grupos discretos de células.

De acuerdo a este modelo, las diferencias en intensidad de expresión y/o actividad de fosfatasa alcalina por parte de distintas células, indicarían que los cultivos de CTM-SCU estarían compuestos por una proporción mayor de CTM osteoprogenitoras más inmaduras, caracterizadas por la expresión de los factores Runx-2/Cbfa-1 y Msx-2 pero carentes en su amplia mayoría de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina y expresión de osteopontina. Los cultivos de CTM-MO por otra parte, comprenderían una proporción mayoritaria de CTM osteoprogenitoras más maduras, caracterizadas por distintos niveles de actividad fosfatasa alcalina y expresión de oesteopontina,



Figura 22.- Diagrama ilustrativo de la jerarquía proliferativa y de diferenciación de las CTM. Se postula la existencia de una heterogeneidad de progenitores en los cultivos de CTM-MO y CTM-SCU, los que corresponderían a una mezcla heterogénea de células con distintos potenciales de diferenciación hacia diversos tipos celulares (tetrapotencial, tripotencial, bipotencial, monopotencial). Para cada uno de estos progenitores, la capacidad de autoreplicación disminuye a medida que progresa la diferenciación hacia un determinado linaje celular.

cmo asimismo por la expresión de los factores Runx-2/Cbfa-1 y Msx-2.

Sobre la base de algunos antecedentes que sugieren una disminución en el potencial de respuesta por parte de las CTM frente a factores osteoinductores (Oreffo y col., 1998), analizamos la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en las CTM-SCU y CTM-MO en respuesta a la aplicación del estímulo osteogénico. Nuestros resultados mostraron que las CTM-SCU respondieron al estímulo osteogénico induciendo un aumento mayor en el nivel enzimático de este marcador en comparación a las CTM-MO. Concordante con este resultado, observamos que ambos tipos celulares expresan osteopontina en respuesta al estímulo osteoinductor.

Osteopontina ha sido descrita como una fosfoglicoproteína expresada en una variedad de tipos celulares en adición a células pertenecientes al linaje osteoblástico. Se ha demostrado que es capaz de unir y de estimular la movilización de iones calcio (Chen y col., 1992; Denhardt y col., 1995), y de participar en la regulación del crecimiento de los cristales de hidroxiapatita durante el proceso de formación ósea (Boskey y col., 1993). Este conjunto de antecedentes apuntan a un rol para esta proteína, en la localización y el transporte de iones calcio, lo cual durante la diferenciación osteogénica, forma parte del proceso de mineralización de la matriz extracelular (Beck y col., 1998).

La ausencia de expresión de osteopontina en los cultivos de CTM-SCU se encontraría en concordancia con datos existentes en la literatura, los cuales señalan que la expresión de esta proteína estaría estrechamente asociada al nivel de actividad de fosfatasa alcalina presente en las células. En este mecanismo, la concentración extracelular de fosfato inorgánico sería un factor determinante en la expresión de este marcador, la cual a su vez estaría determinado por el nivel enzimático de fosfatasa alcalina (Beck y col., 1998).

Este conjunto de observaciones sugieren que las CTM-SCU presentarían un potencial de respuesta distinto frente al estímulo osteogénico en comparación a las CTM-MO, sobre la base del menor número de células fosfatasa alcalina positivas en ausencia del estímulo osteogénico, el mayor

aumento en la actividad enzimática de este marcador en respuesta al estimulo osteogénico y la expresión de osteopontina.

Estos resultados evidencian un conjunto de diferencias entre las poblaciones de CTM-SCU y CTM-MO, las cuales podrían estar asociadas a ciertas ventajas ó desventajas en el contexto de la utilización de estas células en terapias de reemplazo celular. En este sentido, existen antecedentes en la literatura que señalan que la capacidad de formación de tejido óseo por parte de las CTM *in vivo*, se encontraría estrechamente asociada al aumento relativo que se observa en el porcentaje de células que expresan fosfatasa alcalina en respuesta al estímulo osteogénico en condiciones *in vitro* (Mendes y col., 2004). Asimismo, se ha reportado que las CTM-MO obtenidas a partir de donantes de distintas edades poseen potencial osteogénico *in vivo*. Sin embargo, se ha observado que la frecuencia de cultivos de CTM-MO con capacidad de formación ósea *in vivo*, disminuye significativamente al aumentar la edad del donante a partir del cual sean obtenidos (D'Ippolito y col., 1999; Mendes y col., 2002).

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a la caracterización biológica de las poblaciones de CTM-SCU y CTM-MO humanas y constituyen, a nuestro conocimiento, el primer trabajo que describe la múltiple expresión de marcadores tempranos de diferenciación en ambas poblaciones celulares. Asimismo, postula que las CTM-SCU representarían una población osteoprogenitora más inmadura en comparación a las CTM-MO, con un potencial de respuesta distinto al mostrado por las CTM-MO frente a la aplicación de un estímulo de diferenciación osteogénica *in vitro*.

Esta información es importante por cuanto ayuda a profundizar el análisis comparativo de ambas poblaciones celulares, identificando características relevantes que permiten postular su utilización como modelos de terapias celulares.

CONCLUSIONES

• Los cultivos de CTM-SCU y CTM-MO representarían poblaciones celulares equivalentes dotadas de una multipotencialidad de diferenciación sobre la base de la expresión de marcadores tempranos de diferenciación al menos hacia los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico, miogénico, pancreático y neural.

• La expresión y localización subcelular de marcadores tempranos de diferenciación en respuesta al estímulo de diferenciación osteogénico, muestra ser similar entre las CTM-SCU y CTM-MO.

• La expresión y actividad de marcadores intermedios y tardíos de diferenciación osteogénica frente al estímulo osteoinductor, muestra diferencias entre ambos grupos celulares, congruentes con nuestro postulado de que las CTM-SCU representarían una población celular más enriquecida en progenitores osteogénicos inmaduros y con un potencial de respuesta distinto frente al estímulo osteogénico en comparación a las CTM-MO.

PROYECCIONES

Las CTM-SCU representan una valiosa y atractiva alternativa celular para el desarrollo y aplicación de terapias biológicas, tal como hoy ocurre con CT hematopoyéticas de SCU. En este contexto cabe postular su utilización como alternativa a las CTM-MO, en terapias celulares para problemas clínicos que afecten el sistema óseo/esquelético tales como osteogénesis imperfecta (Horwitz y col., 2002; Le Blanc y col., 2005) y osteoporosis (Kumar y col., 2004). En adición, las CTM - SCU pueden ser transducidas eficientemente por vectores virales (Campagnoli y col., 2002)

lo cual permite postular su utilización en modelos de terapia génica. Junto a esto, este modelo celular sugiere también la posibilidad de intervenir terapéuticamente a tempranas edades del desarrollo gestacional. Así, en condiciones de diagnóstico prenatal se podrían utilizar las propiedades migratorias de CTM-SCU para reparar por reemplazo una población genéticamente deficiente a través del trasplante *in utero* (O'Donoghue y col., 2004).

6. **BIBLIOGRAFIA**

Acampora D., Merlo G.R., Paleari L., Zerega B., Postiglione M.P., Mantero S., Bober E., Barbieri O., Simeone A., Levi G. (2002). Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene Dlx5. *Development* **126** : 3795-3809.

Akiyama H., Chaboissier M.C., Martin J.F., Schedl A., de Crombrugghe B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16** : 2813-2828.

Angelopoulou M., Novelli E., Grove J.E., Rinder H.M., Civin C., Cheng L., Krause D.S. (2003). Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* **31** : 413-420

Arnold H.H., Winter B. (1998). Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr Opin Genet Dev.***8** : 539-544.

Baksh D., Song L., Tuan R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* **8**:301-316

Beck G.R., Knecht N. (2003) Osteopontin regulation by inorganic phosphate is ERK1/2-, protein kinase C-, and proteasome-dependent. *JBC* **278** : 41921-41929.

Beck G.R., Sullivan E.C., Moran E., Zerler B. (1998). Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biol Chem* **68** : 269-280.

Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C., Vescovi A.L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283** : 534-537.

Blau H.M., Brazelton T.R., Weimann J.M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function?. *Cell* **105** : 829-841.

Boskey A.L., Maresca M., Ullrich W., Doty S.B., Butler W.T., Prince C.W. (1993). Osteopontinhydroxyapatite interactions *in vitro*: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatingel. *Bone Miner*. **2** : 147-159.

Bossolasco P., Corti S., Strazzer S., Borsotti C., Del Bo R., Fortunato F., Salani S., Quirici N., Bertolini F., Gobbi A., Deliliers G.L., Pietro Comi G., Soligo D. (2004). Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells. *Exp Cell Res.* **295** : 66-78.

Boyum A. (1968). Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* **21**: 77.

Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G., Cooper S., Bard J., English D., Arny M., Thomas L., Boyse E.A.(1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci* **86** : 3828-3832. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S., Bennett P.R., Bellantuono I., Fisk N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98** : 2396-2402.

Campagnoli C., Bellantuono I., Kumar S., Fairbairn L.J., Roberts I., Fisk N.M.(2002). High transduction efficiency of circulating first trimester fetal mesenchymal stem cells: potential targets for in utero ex vivo gene therapy. *BJOG*. **109** : 952-954.

Chae J.H., Stein G.H., Lee J.E. (2004). NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells.* **18** : 271-288.

Chen Y., Bal B.S., Gorski J.P.(1992). Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem.* **267** : 24871-24878.

Cheng S.L., Yang J.W., Rifas L., Zhang S.F., Avioli L.V.(1994). Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*. **134** : 277-286.

Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlstrom H., Lendahl U., Frisen J.(2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **288** : 1660-1663.

Cohen SB, Madrigal JA. (1998). Immunological and functional differences between cord and peripheral blood. *Bone Marrow Transplant Suppl* **3**: S9-S12.

Conget P.A., Minguell J.J. (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* **181**: 67-73.

Cumano A., Godin I. (2001) Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Curr Opin Immunol.* **13** : 166-171.

Denhardt D.T., Lopez C.A., Rollo E.E., Hwang S.M., An X.R., Walther S.E. (1995). Osteopontininduced modifications of cellular functions. *Ann N Y Acad Sci.* **760** : 127-142

Dennis J.E., Merriam A., Awadallah A., Yoo J.U., Johnstone B., Caplan A.I. (1999). quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res.* **14** : 700-709.

D'Ippolito G., Schiller P.C., Ricordi C., Roos B.A., Howard G.A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* **14** : 1115-112.

Dodig M., Tadic T., Kronenberg M.S., Dacic S., Liu Y.H., Maxson R., Rowe D.W., Lichtler A.C. (1999). Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol.* **209** : 298-307.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89** : 747-754.

Erices A., Conget P., Minguell J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* **109** : 235-242.

Evans M.J., Kaufman M.H.(1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. **292** : 154-156.

Fajas L., Egler V., Reiter R., Hansen J., Kristiansen K., Debril M.B., Miard S., Auwerx J.(2002). The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev Cell.* **3** : 903-910.

Franceschi R.T., Xiao G., Jiang D., Gopalakrishnan R., Yang S., Reith E. (2003). Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res.* **44** Suppl 1: 109-116.

Geissinger E. Weisser C. Fischer P. Schartl M. Wellbrock C. (2002). Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen. *Cancer Res.* **62** : 820-828.

Goodwin H.S., Bicknese A.R., Chien S.N., Bogucki B.D., Quinn C.O., Wall D.A. (2001) Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant.* **7** : 581-588.

Gronthos S., Zannettino A.C., Graves S.E., Ohta S., Hay S.J., Simmons P.J. (1999). Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res.* **1** : 47-56.

Grunstein M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**: 349-352.

Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D., Buzney E.A., Khan M.K., Flint A.F., Kunkel L.M., Mulligan R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. **401** : 390-394.

Harlow, E., Lane D. (1988). Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York., 449-450.

Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* **13**: 69-80.

Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K., Marx J.C., Neel M.D., McNall R.Y., Muul L., Hofmann T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *PNAS* **99** : 8932-8937.

Hu M., Krause D., Greaves M., Sharkis S., Dexter M., Heyworth C., Enver T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.* **6** : 774-785.

In 't Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., Kruisselbrink A.B., van Bezooijen R.L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H.H., Fibbe W.E. (2003). *Haematologica*. **88** : 845-852.

Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med.***6** : 88-95

Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* **64** : 295-312.

Jaiswal R.K., Jaiswal N., Bruder S.P., Mbalaviele G., Marshak D.R., Pittenger M.F. (2000). Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *JBC* **13** : 9645-9652.

Kang T.J., Yeom J.E., Lee H.J., Rho S.H., Han H., Chae G.T. (2004). Growth kinetics of human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord blood. *Acta Haematol.* **112** : 230-233

Kim I.S., Otto F., Zabel B., Mundlos S. (1999). Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev.* **80** : 159-170.

Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y.H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S., Kishimoto T. (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89** : 755-764.

Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *PNAS* **96**: 10711-10716.

Kumar S., Mahendra G., Nagy T.R., Ponnazhagan S. (2004). Osteogenic differentiation of recombinant adeno-associated virus 2-transduced murine mesenchymal stem cells and development of an immunocompetent mouse model for ex vivo osteoporosis gene therapy. *Hum Gene Ther.* **15** : 1197-1206.

Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S., Satomura K., Bianco P., Robey P.G. (2001). Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* **153** : 1133-1140.

Laemli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (Lond.)., **227**: 680-685.

Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., Grompe M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* **6** : 1229-1234

Le Blanc K., Gotherstrom C., Ringden O., Hassan M., McMahon R., Horwitz E., Anneren G., Axelsson O., Nunn J., Ewald U., Norden-Lindeberg S., Jansson M., Dalton A., Astrom E., Westgren M. (2005). Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. **79** : 1607-1614.

Lee M.W., Choi J., Yang M.S., Moon Y.J., Park J.S., Kim H.C., Kim Y.J. (2004). Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun.* **320** : 273-278.

Lendahl U., Zimmerman L.B., McKay R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60** : 585-595.

Leveille S.G. (2004). Musculoskeletal aging. Curr Opin Rheumatol. 16: 114-118.

Lewis I.D., Verfaillie C.M. (2000). Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol.* **28** : 1087-1095.

Li Y., Chen J., Wang L., Zhang L., Lu M., Chopp M.(2001). Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* **316** : 67-70.

Lievremont M., Potus J., Guillou B. (1982). Use of alizarin red S for histochemical staining of Ca^{2+} in the mouse; some parameters of the chemical reaction in vitro. *Acta Anat* **114** : 268-280.

Lowell B.B. (2000). PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* **99** : 239-242.

Magnusson P., Larsson L., Magnusson M., Davie M.W.J., Sharp C.A. (1999) Isoforms of bone alkaline phosphatase: Characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res.*; **14**: 1926–19233.

Mansilla E., Marin G.H., Sturla F., Drago H.E., Gil M.A., Salas E., Gardiner M.C., Piccinelli G. Bossi S., Salas E., Petrelli L., Iorio G., Ramos C.A., Soratti C. (2005). Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant Proc.* **37** : 292- 294.

Marks S.C., Popoff S.N. (1988) Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. *Am J Anat.*; **183**: 1–44.

Mackenzie TC, Flake AW. Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. (2001). *Blood Cells Mol Dis*. **27** : 601-614.

Mendes S.C., Tibbe J.M., Veenhof M., Bakker K., Both S., Platenburg P.P., Oner F.C., de Bruijn J.D., van Blitterswijk C.A.(2002). Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng.* **8** : 911-920.

Mendes S.C., Tibbe J.M., Veenhof M., Both S., Oner F.C., van Blitterswijk C.A., de Bruijn J.D.(2004). Relation between in vitro and in vivo osteogenic potential of cultured human bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med* **15** : 1123-1128.

Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A., McKercher S.R.(2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290 : 1779-1782.
Minguell J.J., Conget P., Erices A. (2000) Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res.* 33 : 881-887.

Minguell J.J., Erices A., Conget P. (2001) Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med 226:507-520.

Moursi A.M., Damsky C.H., Lull J., Zimmerman D., Doty S.B., Aota S., Globus R.K.(1996) Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci.* **109** : 1369-80

Mueller SM, Glowacki J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* **4** : 583-590.

Muraglia A., Cancedda R., Quarto R.(2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* **113** : 1161-1166.

Newberry E.P., Boudreaux J.M., Towler D.A.(1997). Stimulus-selective inhibition of rat osteocalcin promoter induction and protein-DNA interactions by the homeodomain repressor Msx2. *J Biol Chem.***272** : 29607-29613.

Namiki J., Tator C.H.(1999). Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. **58** : 489-498.

Noort W.A., Kruisselbrink A.B., in't Anker P.S., Kruger M., van Bezooijen R.L., de Paus R.A., Heemskerk M.H., Lowik C.W., Falkenburg J.H., Willemze R., Fibbe W.E.(2002). Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* **8** : 870-888.

O'Donoghue K., Fisk N.M.(2004). Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* **18** : 853-875.

Offield M.F., Jetton T.L., Labosky P.A., Ray M., Stein R.W., Magnuson M.A., Hogan B.L., Wright C.V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development.* **122** : 983-995.

Oreffo R.O., Bord S., Triffitt J.T.(1998). Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci* **94** : 549-555.

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Limana F., Jakoniuk I., Quaini F., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. (2001). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *PNAS* **98** : 10344-10349.

Ortiz L.A., Gambelli F., McBride C., Gaupp D., Baddoo M., Kaminski N., Phinney D.G.(2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *PNAS* **100** : 8407-8411.

Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhauser M., Werner C.(2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. **22** : 377-384

Otto F., Thornell A.P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K.C., Rosewell I.R., Stamp G.W., Beddington R.S., Mundlos S., Olsen B.R., Selby P.B., Owen M.J. (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* **89** : 765-771.

Perry R.L., Rudnick M.A.(2000). Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci.* **5**: D750-D767.

Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S., Goff J.P. (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284** : 1168-1170

Petersen H.V., Serup P., Leonard J., Michelsen B.K., Madsen O.D.(1994). Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *PNAS* **91** : 10465-10469

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** : 143-147.

Prockop DJ.(1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276** : 71-77.

Ramirez-Zacarias J.L., Castro-Munozledo F., Kuri-Harcuch W.(1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. Histochemistry **97** : 493-497.

Rattner A., Sabido O., Massoubre C., Rascle F., Frey J.(1997). Characterization of human osteoblastic cells: influence of the culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **33**:757-762

Rosada C., Justesen J., Melsvik D., Ebbesen P., Kassem M.(2003) The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int.***72** : 135-142.

Rosen E.D., Spiegelman B.M.(2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.***16** : 145-171

Sakano S., Murata Y., Iwata H., Sato K., Ito T., Kurokouchi K., Seo H.(1997). Protooncogene expression in osteogenesis induced by bone morphogenetic protein. *Clin Orthop.* **338** : 240-246.

Shake J.G., Gruber P.J., Baumgartner W.A., Senechal G., Meyers J., Redmond J.M., Pittenger M.F., Martin B.J.(2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* **73** : 1919-1925.

Seshi B., Kumar S., King D.(2003). Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis. *Blood Cells Mol Dis.* **2**:268-285.

Satokata I., Ma L., Ohshima H., Bei M., Woo I., Nishizawa K., Maeda T., Takano Y., Uchiyama M., Heaney S., Peters H., Tang Z., Maxson R., Maas R.(2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet.* **24** : 391-395.

Shamblott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Gearhart J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *PNAS* **95**:13726-13731.

Shirakabe K., Terasawa K., Miyama K., Shibuya H., Nishida E.(2001). Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells* **10**: 851-856

Shui C., Spelsberg T.C., Riggs B.L., Khosla S. (2003). Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* **18** : 213-221.

Sierra O.L., Cheng S.L., Loewy A.P., Charlton-Kachigian N., Towler D.A.(2004). MINT, the Msx2 interacting nuclear matrix target, enhances Runx2-dependent activation of the osteocalcin fibroblast growth factor response element. *J Biol Chem.* **279** : 32913-32923.

Snider L., Tapscott S.J.(2003) Emerging parallels in the generation and regeneration of skeletal muscle. *Cell* **113**: 811-812

Stein G.S., Lian J.B., van Wijnen A.J., Stein J.L., Montecino M., Javed A., Zaidi S.K., Young D.W., Choi J.Y., Pockwinse S.M. (2004). Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* **23** : 4315-4329

Stelnicki E.J., Komuves L.G., Holmes D., Clavin W., Harrison M.R., Adzick N.S., Largman C. (1997). The human homeobox genes MSX-1, MSX-2, and MOX-1 are differentially expressed in the dermis and epidermis in fetal and adult skin. *Differentiation*. **62** : 33-41.

Sutherland M.S., Rao L.G., Muzaffar S.A., Wylie J.N., Wong M.M., McBroom R.J., Murray T.M. (1995). Age-dependent expression of osteoblastic phenotypic markers in normal human osteoblasts cultured long-term in the presence of dexamethasone. *Osteoporos Int.* **5** : 335-343.

Tanavde V.M., Malehorn M.T., Lumkul R., Gao Z., Wingard J., Garrett E.S., Civin C.I.(2000) Human stem-progenitor cells from neonatal cord blood have greater hematopoietic expansion capacity than those from mobilized adult blood. *Exp Hematol.* **30** : 816-823.

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.

Tondreau T., Lagneaux L., Dejeneffe M., Massy M., Mortier C., Delforge A., Bron D.(2004) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* **72** : 319-26.

Tremain N., Korkko J., Ibberson D., Kopen G.C., DiGirolamo C., Phinney D.G.(2003). MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells* **5** : 408-418.

Tuan R.S., Boland G., Tuli R.(2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* **5** : 32-45

Ueda T, Yoshida M, Yoshino H, Kobayashi K, Kawahata M, Ebihara Y, Ito M, Asano S, Nakahata T, Tsuji K. (2001). Hematopoietic capability of CD34+ cord blood cells: a comparison with CD34+ adult bone marrow cells. *Int J Hematol* **73** : 457-462.

Wakitani S., Mitsuoka T., Nakamura N., Toritsuka Y., Nakamura Y., Horibe S.(2004). Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant*.**13** : 595-600.

Weissman I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* **100** : 157-168

Whyte M.P. (1994) Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrinol Rev.*; **15** : 439–461.

Wiese C., Rolletschek A., Kania G., Blyszczuk P., Tarasov K.V., Tarasova Y., Wersto R.P., Boheler K.R., Wobus A.M.(2004). Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* **61** : 2510-2522.

Yaaguchi A., Komori T., Suda T.(2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* **21** : 393-411

Yong K.L., Fahey A., Pahal G., Linch D.C., Pizzey A., Thomas N.S., Jauniaux E., Kinnon C., Thrasher A.J.(2002). Fetal haemopoietic cells display enhanced migration across endothelium. *Br J Haematol.* **116** : 392-400.

Yoshizawa T., Takizawa F., Iizawa F., Ishibashi O., Kawashima H., Matsuda A., Endo N., Kawashima H. (2004). Homeobox protein MSX2 acts as a molecular defense mechanism for preventing ossification in ligament fibroblasts. *Mol Cell Biol.***24** : 3460-3472.

Young I. T. (1977). Proof without prejudice: use of the Kolmogorov-Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources. *J. Histochem. Cytochem.* **25**: 935-941.