

UC14-FC
DOC- B
E 681
C.1

**"CELULAS PROGENITORAS MESENQUIMÁTICAS:
Caracterización y su potencial uso en terapias biológicas"**

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias



por

Alejandro Antonio Erices Ocampo

Mayo, 2002

Director de Tesis: Dr. José J. Minguell Uribe

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Alejandro Antonio Erices Ocampo

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 30 de abril de 2002.

Director de Tesis:

Dr. José J. Minguell U.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. María Rosa Bono

Dra. María Paz Marzolo

Dr. Marco Tulio Nuñez

Dr. Luis Valladares

*“Lo que me emociona tanto en este Principito dormido
es su fidelidad por una flor,
es la imagen de una rosa que resplandece en él
como la llama de una lámpara, aún cuando duerme....*

Y lo sentí más frágil todavía.

*Es necesario proteger a las lámparas;
un golpe de viento puede apagarlas...”*

Antoine de Saint-Exupéry, “El Principito”

Para DIEGO, mi Chinito.

AGRADECIMIENTOS

Querido Diego, agradezco tu compañía, tu quizás poco comprendida presencia. Me enseñaste a no tener que entenderlo y explicarlo todo, y hoy solo espero algún día poder entenderte a tí. Curiosamente estuvimos juntos el mismo tiempo que duró el trabajo de éste, nuestro "cuento".

Quizás debiese nombrar a muchas personas que me han permitido llegar a este día. Esas personas a quienes agradezco, y que tú conoces a través mío, fueron más allá del apoyo; fueron y son presencia y permanente compañía. Estoy seguro y confiado en que todos ellos sabrán leer sus nombres entre estas palabras, y sentirán mi humilde y comprometido aprecio.

Querido Diego, agradezco la fuerza de tu primer llanto, tu mano apretando mi dedo, tus ojos abiertos en nuestros encuentros, la calidez de tu cuerpo contra mi pecho, esa sonrisa secreta que solo tú y yo conocemos, aquella lágrima en tus ojos, la extraña e incomprensible fuerza de tu presencia, tu resistencia, la desgarradora violencia de tu primera y el silencio de tu segunda partida. Agradezco que sigas conmigo, aprendí y seguiré aprendiendo contigo.

FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias al apoyo de:

- Beca CONICYT para estudiantes de Doctorado.
- Beca Dr. Abraham Stekel, INTA, Univesidad de Chile.
- Proyecto FONDECYT para estudiantes de Doctorado N° 2980017. Célula progenitora mesenquimática: expresión de citoquinas y moléculas adhesivas, y su potencial uso en terapias biológicas del sistema hematopoyético.
- Proyectos FONDECYT N° 89700-28 y 1010566.
- Proyecto International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology N° CRP/CHI97-01, Italia.

INDICE DE MATERIAS

TITULO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
FINANCIAMIENTO.....	iv
INDICE DE MATERIAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMECLATURA.....	xv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUCCION.....	1
1. Mesengénesis.....	4
2. Residencia de las CPM.....	6
3. Caracterización de las CPM de MO.....	7
4. Potencial de diferenciación de las CPM.....	8
5. ¿Existen microambientes moleculares mesenquimáticos?.....	12
6. Proyecciones terapéuticas para el uso de CPM.....	13
Propósitos de esta tesis.....	14
MATERIALES Y METODOS.....	16
A. Materiales.....	16

B. Métodos.....	18
1. Cultivos celulares.....	18
a. Obtención y cultivo de CPM humanas desde SCU.....	18
b. Obtención y cultivo de CPM humanas desde MO.....	19
c. Separación de células quiescentes de los cultivos de CPM.....	20
d. Obtención y cultivo de CPM murinas.....	20
e. Cultivo de células 3T3.....	21
f. Ensayos de colonias hematopoyéticas.....	21
2. Recuentos celulares.....	22
3. Viabilidad celular.....	24
4. Caracterización de poblaciones celulares en distintas fases del ciclo celular.....	25
a. Distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo celular por cuantificación del contenido total de DNA genómico.....	25
b. Cuantificación simultánea de DNA y RNA para identificación de células quiescentes G0.....	25
5. Inmunomarcación.....	27
a. Inmunodetección de antígenos de superficie.....	27
b. Inmunodetección de antígenos intracelulares.....	29
c. Inmunodetección de moléculas de matriz extracelular.....	29
6. Expresión de marcadores citoquímicos.....	30

7. Expresión génica de marcadores moleculares de compromiso a los linajes osteo o adipogénico.....	31
8. Diferenciación terminal de los linajes osteo o adipogénico.....	34
9. Transferencia génica por vectores adenovirales.....	37
a. Infección de CPM-SCU con Ad5CMVGFP.....	37
b. Análisis <i>in situ</i> de la expresión del transgen GFP.....	38
c. Análisis de la expresión del transgen GFP por citometría de flujo..	38
10. Estudios para evaluar la movilización y residencia de CPM-SCU trasplantadas sistémicamente.....	39
a. Trasplante a ratones inmunodeficientes.....	39
b. Presencia de CPM humanas en cultivos secundarios de MO murina.....	39
c. Detección de CPM humanas trasplantadas en tejidos murinos...	40
d. Purificación de DNA a partir de tejidos murinos.....	40
e. Amplificación de la secuencia génica humana específica de β -globina.....	41
11. Expresión génica de citoquinas de la familia IL-6 y sus receptores.....	43
a. Síntesis de sonda.....	43
b. Hibridización.....	43
c. Ensayo de protección a ribonucleasa.....	43
12. Producción de citoquinas de la familia IL-6 y de sus cadenas de	

receptores.....	44
a. Producción de citoquinas y de cadenas solubles de receptores.....	44
b. Detección de cadenas de receptores.....	45
13. Efectos de citoquinas de la familia IL-6 sobre proliferación y diferenciación de CPM.....	46
a. Ensayos de proliferación en presencia de IL-6, LIF y/o cadenas solubles de receptores.....	46
b. Ensayos de diferenciación en presencia de IL-6, LIF y/o cadenas solubles de receptores.....	47
c. Inhibición de la actividad biológica de IL-6/sIL-6R.....	47
d. Activación de gp130 por el complejo IL-6/sIL-6R.....	48
RESULTADOS.....	49
1. Cultivos de células progenitoras mesenquimáticas de sangre de cordón umbilical humana (CPM-SCU).....	49
1.1. ¿Existen CPM en la SCU humana?.....	49
a) Caracterización morfológica.....	49
b) Proliferación y estado del ciclo celular.....	53
c) Selección de células quiescentes.....	53
d) Inmunotipificación.....	53
e) Caracterización citoquímica.....	55
f) Marcadores moleculares y potencial de diferenciación.....	55

1.2. ¿Están las CPM en la SCU presentes durante todas las etapas de la gestación?.....	60
1.3. Transducción adenoviral de CPM-SCU.....	62
1.4. ¿Son equivalentes las CPM de MO y SCU?.....	64
2. TRASPLANTABILIDAD DE CPM-SCU.....	69
2.1. Presencia de células humanas en MO de ratones trasplantados según estudios de generación de colonias secundarias.....	69
a) Ensayos de diferenciación osteogénica en colonias secundarias.	71
b) Búsqueda de células humanas a través de la amplificación de la secuencia del gen de β -globina humana.....	71
2.2. Presencia de células humanas en tejidos de ratones trasplantados con CPM-SCU.....	74
3. DEFINICIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN PUTATIVO MICROAMBIENTE MOLECULAR MESENQUIMÁTICO.....	77
3.1. Producción de citoquinas de la familia IL-6 por CPM.....	78
3.2. ¿Las CPM expresan receptores para IL-6 y LIF?.....	80
3.3. ¿Pueden las citoquinas producidas por la CPM conformar un microambiente con capacidad de regular la proliferación y/o diferenciación de estas mismas células?.....	83
A) Efectos de citoquinas IL-6 y LIF sobre la proliferación y diferenciación de CPM no comprometidas al linaje osteogénico.....	83

B) ¿Pueden las citoquinas IL-6 y LIF modular la proliferación y diferenciación de CPM comprometidas el linaje osteogénico?..	85
a) Efecto de citoquinas IL-6 y LIF sobre la actividad fosfatasa alcalina de CPM estimuladas con dexametasona.....	85
b) Efecto de IL-6 + sIL-6R sobre la actividad fosfatasa alcalina de CPM estimuladas con dexametasona.....	86
c) Efecto de sIL-6R sobre la actividad fosfatasa alcalina de CPM estimuladas con dexametasona.....	88
d) Efecto de IL-6 y sIL-6R sobre la expresión de los marcadores moleculares de diferenciación osteogénica cbfa-1 y osteocalcina.....	88
e) Efecto de LIF sobre proliferación y diferenciación osteogénica de CPM.....	89
C) Los efectos del complejo IL-6/sIL-6R sobre la diferenciación osteogénica de CPM estimuladas con dexametasona dependen de la formación del complejo y la activación de la vía gp130.....	89
D) ¿Hay transducción de señales por la activación de gp130 en las CPM estimuladas con dexametasona?.....	91
DISCUSIÓN.....	94
1. CPM-SCU y significado de su presencia a este nivel.....	95

2. CPM-SCU son trasplantables, reconocen y establecen residencia en la MO (homing): significado de la presencia de células humanas en tejidos murinos.....	100
A) ¿Qué significa la presencia de células humanas en la MO murina?.....	101
B) ¿Qué significa la presencia de células humanas en tejidos murinos?.....	102
C) Las CPM-SCU son equivalentes funcionales de las CPM-MO.....	103
3. Jerarquía de progenitores mesenquimáticos.....	103
4. ¿Existe/n microambiente/s mesenquimático/s?.....	104
CONCLUSIONES.....	109
BIBLIOGRAFIA.....	111
ANEXOS.....	120

INDICE DE TABLAS

MATERIALES Y METODOS

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en esta tesis..... 28

Tabla 2: Partidores utilizados para RT-PCR..... 33

RESULTADOS

Tabla 3: Inmunofenotipo de CPM-SCU..... 57

Tabla 4: Caracterización citoquímica de células adherentes en cultivos
de SCU..... 58

Tabla 5: Características de las muestras de SCU utilizadas en cultivos 63

Tabla 6: Análisis comparativo de las características de CPM-SCU
y CPM-MO..... 67

Tabla 7: Ensayo de unidades formadoras de colonias..... 68

Tabla 8: Detección de células humanas en órganos de ratones
trasplantados..... 76

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCION

Figura 1: Esquema de diferenciación de una célula troncal.....	2
Figura 2: Mesengénesis.....	5
Figura 3: Distribución jerárquica de los progenitores mesenquimáticos..	10

RESULTADOS

Figura 4: Cultivos de CPO y CPM obtenidas de SCU humanas.....	50
Figura 5: Caracterización de CPO.....	52
Figura 6: Proliferación y distribución en etapas del ciclo celular de cultivos de CPM-SCU.....	54
Figura 7: Caracterización inmunofenotípica de CPM-SCU.....	56
Figura 8: Expresión de marcadores moleculares de diferenciación en cultivos de CPM-SCU.....	59
Figura 9: Diferenciación terminal de los linajes osteo o adipogénico en cultivos de CPM-SCU.....	61
Figura 10: Transducción adenoviral de CPM-SCU.....	65
Figura 11: Modelo de xenotrasplante utilizando CPM-SCU.....	70
Figura 12: Diferenciación osteogénica de colonias secundarias derivadas de MO de ratones trasplantados con CPM-SCU.	72
Figura 13: Detección de células humanas en colonias secundarias generadas a partir de MO de ratones trasplantados con	

CPM-SCU.....	73
Figura 14: Detección de células humanas en órganos de ratones trasplantados con CPM-SCU.....	75
Figura 15: Expresión de mensajeros de RNA para citoquinas en cultivos de CPM.....	79
Figura 16: Expresión de mensajeros de RNA para receptores de citoquinas en cultivos de CPM.....	81
Figura 17: Expresión de subunidades de receptores.....	82
Figura 18: Efecto de citoquinas de la familia IL-6 sobre la proliferación y diferenciación osteogénica de CPM.....	84
Figura 19: Efecto de citoquinas de la familia IL-6 sobre la proliferación y diferenciación osteogénica de CPM expuestas a dexametasona.....	87
Figura 20: Efecto de IL-6 sobre la expresión de mensajeros de RNA para cbfa-1 y osteocalcina.....	90
Figura 21: Ensayos de inhibición del efecto osteogénico de sIL-6R en CPM expuestas a dexametasona.....	92
Figura 22: Fosforilación de stat-3 en CPM expuestas a dexametasona en respuesta a sIL-6R.....	93
DISCUSIÓN	
Figura 23: Efecto osteogénico de IL-6/sIL-6R en CPM: modelo de actividad biológica.....	107

LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

³² P-UTP	uridin trifosfato
5-FU	5 fluorouracilo
Ad5CMVGFP	adenivirus codificante para GFP
AO -	naraja de acridina
ASMA	α -actina de músculo liso
bFGF	factor de crecimiento fibroblástico básico
BMP-2	proteína morfogénica de hueso tipo 2
BMP-4	proteína morfogénica de hueso tipo 4
BSA	albúmina sérica bovina
cbfa-1	Core Binding Factor alpha subunit 1
CFU-GM	unidad formadora de colonias de granulocito-macrófagos
CMN	células mononucleadas
CPM	células progenitoras mesenquimáticas
CPM-SCU	células progenitoras mesenquimáticas derivadas de sangre de cordón umbilical
CPM-MO	células progenitoras mesenquimáticas derivadas de médula ósea
CPO	células precursoras de osteoclastos
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	deoxirribonucleótidos
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGF	factor de crecimiento epidermal
ELISA	enzima inmunoensayo
FDA	fluoresceína diacetato
FITC	tiocianato de fluoresceína
G-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos
GFP	proteína fluorescente verde
gp130	subunidad común del receptor de citoquinas de la familia IL-6
IBMX	isobutilmetilxantina
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular tipo 1
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-6	interleuquina 6
IL-6R	subunidad específica del receptor de IL-6
sIL-6R	forma soluble de sIL-6R
LDL	lipoproteína de baja densidad
LIF	factor inhibidor leucémico
LIFR	subunidad específica del receptor de LIF
M-CSF	factor estimulador de colonias de monocitos
MO	médula ósea

MRF4	factor regulador miogénico tipo 4
MyoD	miogenina D
NEM	N-etilmaleimida
NGF	factor de crecimiento neural
OSM	oncostatina M
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	ficoeritrina
PI	ioduro de propidio
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
PPAR γ 2	receptor activado por proliferadores peroxisomales tipo γ 2
PVDF	polivinildivinilfluoruro
RNA	ácido ribonucleico
RPE	R-ficoeritrina
RPE-Cy5	R-ficoeritrina conjugada con cianina 5
RT-PCR	reacción de transcripción reversa acoplado a reacción en cadena de la polimerasa
SCF	factor de crecimiento de células troncales
SCU	sangre de cordón umbilical
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
TA	temperatura ambiente
TAE	tampón Tris- ácido acético-EDTA
TBS	tampón Tris salino
TGF β	factor de crecimiento transformante tipo β
VCAM-1	molécula de adhesión celular vascular tipo 1
vWF	factor von Willebrand

RESUMEN

Las células progenitoras mesenquimáticas forman parte del estroma de la médula ósea, pueden ser mantenidas y amplificadas *ex vivo*, e inducidas a diferenciar a células de distintos tejidos óseo, cartilaginoso, muscular, adiposo, nervioso y estroma hematopoyético.

Las células progenitoras mesenquimáticas establecen una estrecha relación funcional con otra población de células troncales presentes en la médula ósea, las hematopoyéticas. Se desconoce la relación entre estas poblaciones celulares durante el desarrollo fetal del conjunto sistemas hematopoyético y mesenquimático (ontogenia de la relación progenitor mesenquimático - progenitor hematopoyético). Sobre la base que la sangre de cordón umbilical contiene células progenitoras hematopoyéticas, este trabajo tiene como hipótesis que las células progenitoras mesenquimáticas también se encontrarían presentes a este nivel.

El trabajo desarrollado en este tesis demuestra que la sangre de cordón umbilical humana contiene células progenitoras mesenquimáticas con características morfológicas, inmunofenotípicas y funcionales equivalentes a las de células obtenidas de médula ósea adulta. Adicionalmente, a través de estudios de xenotrasplante se demostró que estas células pueden ser trasplantadas y se localizan en la médula ósea y otros tejidos del organismo receptor. Esta observación sugiere que estos progenitores representan una

población de células en tránsito, en conjunto con los progenitores hematopoyéticos presentes a este nivel, dirigida a colonizar la médula ósea.

Durante la vida adulta, será este tejido el que sustentará los procesos hematopoyético y mesenquimático para lo cual se conforman microambientes específicos, ricos en señales que regulan la funcionalidad de ambas poblaciones celulares. Así, en este trabajo se demuestra también que IL-6, citoquina reguladora del metabolismo óseo, puede modular la diferenciación osteogénica de los progenitores mesenquimáticos, mecanismo regulado por la expresión y biodisponibilidad de la citoquina y las cadenas de receptores en el microambiente.

La presencia de células progenitoras mesenquimáticas en sangre de cordón umbilical representa una nueva visión de la ontogenia de los sistemas hematopoyético y mesenquimático, y en conjunto con la modulación de la capacidad osteogénica de los progenitores mesenquimáticos por IL-6, representan una valiosa opción para el desarrollo y uso de estas células en terapias biológicas de estos sistemas.

ABSTRACT

The mesenchymal stem cell has been isolated, expanded and characterised *ex vivo*, mainly by its differentiation properties into several mesenchymal lineages like, bone, cartilage, muscle, adipose, neural and cells of the hematopoietic-supporting stroma. It has been reported that the adult bone marrow is the unique site of residency of mesenchymal stem cells, where it established a close relationship with the hematopoietic stem cell.

Since umbilical cord blood is the vehicle by which during development, hematopoietic stem cells reaches the new forming marrow, we hiphotetyzed that mesenchymal stem cells may also be present in the cord blood, mimicking what happens in the adult marrow. In this thesis we investigated for the presence of mesenchymal stem cells in cord blood at different gestational ages and whether the putative cells exhibited the same characteristics of marrow-derived mesenchymal stem cells.

Results demonstrate that human umbilical cord blood contains mesenchymal stem cells with morphological, immunophenotypic and functional characteristics equivalent to those of cells obtained from adult bone marrow. In addition, xenotransplant studies demonstrated that human cord blood derived mesenchymal stem cells, can be transplanted and located both in the bone marrow and selected tissues of the recipient. These observations suggest that cord blood derived mesenchymal stem cells, as it occurs with the hematopoietic

stem cells, represent a population of progenitor cells travelling during development from undetermined sites into the newly formed marrow.

In term, in the adult marrow the coexistence of hematopoietic and mesenchymal stem cells suggests the conformation of specific microenvironment (s) rich in signals that regulate the functionality of both cellular populations. One of these signals is IL-6, which is produced by several cells in the marrow stroma, including the mesenchymal cell itself. In this work it is demonstrated that IL-6, despite its effect as a potent modulator of osteogenesis, does not affect mesenchymal stem cell osteodifferentiation. However, after mesenchymal stem cells commit to osteogenic lineage, IL-6 enhances osteodifferentiation of these cells by a mechanism that depends on the availability of the cytokine, its soluble receptor subunit and membrane associated-gp130.

The presence of mesenchymal progenitors cells in human umbilical cord blood represents a new ontogenic vision for the hematopoietic and mesenchymal systems, which in conjunction with the observed effect of IL-6 (a common "microenvironmental modulator"), seems to represent a valuable option for the derivation of adults stem cells and its uses in biological therapies.

INTRODUCCION

La capacidad de un organismo adulto para mantener la homeostasis celular de sus tejidos u órganos, como asimismo, para reparar o reconstruir un tejido dañado, se sustenta en poblaciones de células troncales indiferenciadas. Una célula troncal debe tener la capacidad de proliferar y mantener una población con estas características (autorenovación) y frente a estímulos específicos, proliferar y diferenciar hacia un linaje celular determinado. El desarrollo del proceso de diferenciación de una célula troncal implica la transición desde un estado pluri o multipotente hacia un estado de compromiso con un determinado linaje. La progresión a través de la vía de diferenciación de estos progenitores comprometidos, culminará con la maduración y expresión del fenotipo terminal (Figura 1)(Hall, 1983; Potten y Loeffler, 1990; Morrison y col, 1997)

La médula ósea (MO) contiene dos poblaciones de células troncales: a) las células progenitoras hematopoyéticas que sustentan el proceso hematopoyético (Orkin, 1995), y b) las células progenitoras mesenquimáticas (CPM), que sustentan el proceso mesenquimático (Caplan, 1994; Prockop, 1997). La caracterización del proceso de diferenciación hematopoyética, cumple con el modelo celular planteado en la Figura 1, sin embargo estos eventos no han sido establecidos para la diferenciación mesenquimática.

Las CPM fueron identificadas originalmente como células presentes en la MO con capacidad para diferenciar al linaje osteogénico (Friedenstein y col,

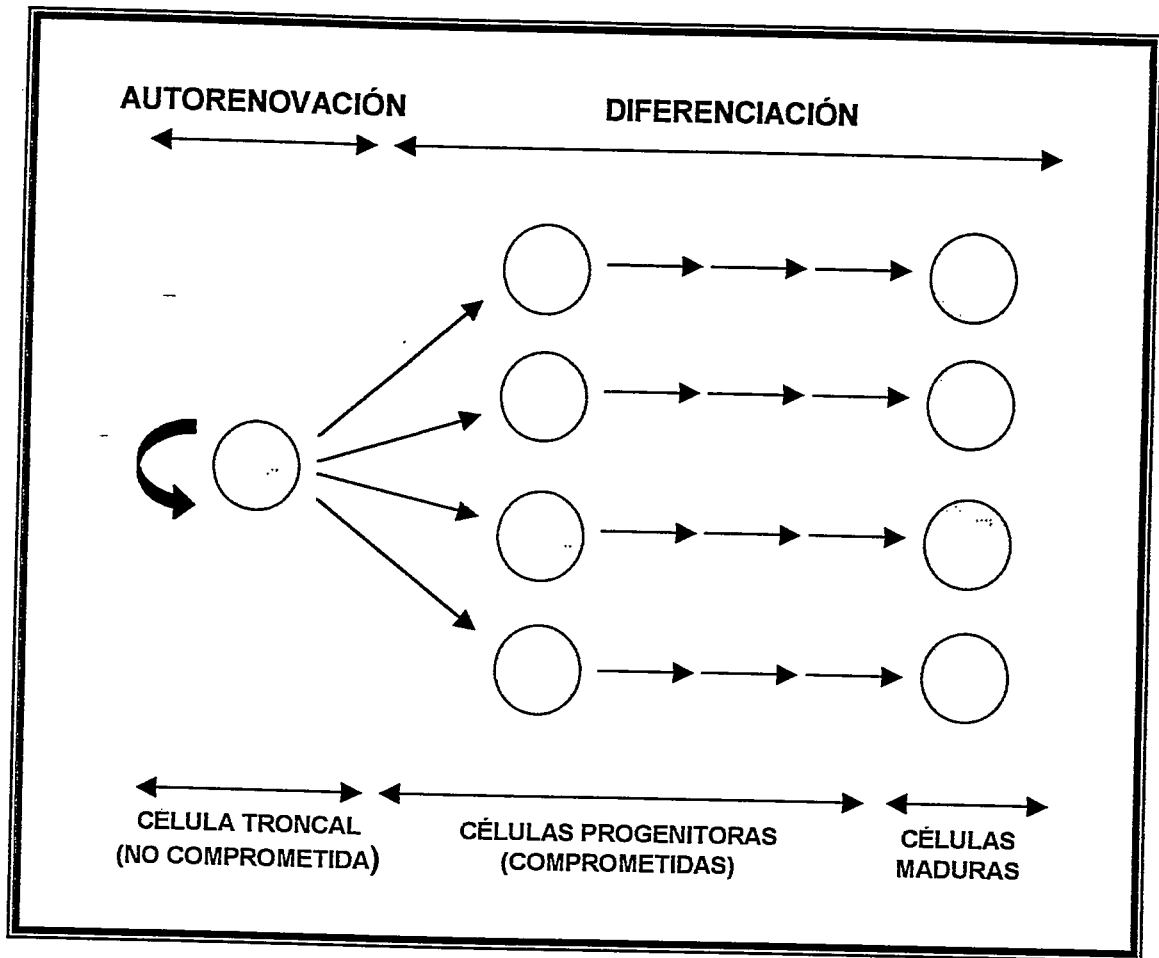


FIGURA 1: Esquema de diferenciación de una célula troncal.

Las células troncales se caracterizan por su potencial de proliferar sin diferenciar, autorenovación, que asegura la mantención de una dotación de células troncales en el tejido, y su potencial de diferenciación, en el cual se pueden reconocer células troncales no comprometidas, progenitores comprometidos y las células maduras correspondientes a un linaje específico.

1968; Friedenstein y col, 1976; Castro-Malaspina y col, 1980; Sale y Storb, 1983; Piersma y col, 1985). Posteriormente se ha logrado determinar que estas son células multipotenciales, con capacidad de diferenciar a varios linajes mesenquimáticos que forman tejidos tales como: hueso, cartílago, tendón, músculo, tejido adiposo y estroma hematopoyético. (Pereira y col, 1995; Galmiche, 1993; Ferrari y col, 1998; Conget y Minguell, 1999; Dennis y col, 1999; Pittenger y col, 1999) Distintas denominaciones han sido utilizadas para identificar a esta población celular. CFU-F ("colony forming unit-fibroblast"), MSF ("marrow stromal fibroblast"), MSC ("mesenchymal stem cells"), o MPC ("mesenchymal progenitor cells") corresponden a algunas de estas denominaciones (Castro-Malaspina y col, 1980; Piersma y col, 1985; Kuznetsov y col, 1997). El uso de la denominación CPM, permite considerar la existencia tanto de una célula troncal mesenquimática (CPM no comprometida) como de progenitores mesenquimáticos con algún grado de compromiso hacia linajes determinados (Zohar y col 1997; Minguell y col, 2001).

En los últimos años la investigación con CPM ha estado centrada en establecer los potenciales de diferenciación de estas células y posibles proyecciones para su uso terapéutico (Prockop, 1997; Bordignon y col, 1999; Weissman, 2000; Minguell y col, 2000). Existe una limitada, aunque creciente cantidad de información respecto a la caracterización de estas células (expresión de marcadores específicos, fuentes de origen, trasplantabilidad, reguladores biológicos de sus procesos de diferenciación, etc) (Dominici y col, 2001; Minguell y col, 2001). Al iniciar este trabajo de tesis (1998), la

información disponible permitía establecer un esquema parcial de las características, fisiología y rol de las CPM en el organismo, lo cual ha sido complementado por el desarrollo de este y otros trabajos en los últimos años.

1. MESENGÉNESIS

Durante el desarrollo embrionario, el mesodermo diferencia a tejidos tales como hueso, cartílago, músculo, tendón, estroma de médula ósea, tejido adiposo, dermis y otros tejidos conectivos. La génesis de estos tejidos mesodérmicos es denominada *Mesengénesis* (Caplan, 1994)(Figura 2).

El proceso mesengénico continúa a través del desarrollo y vida adulta, con la función de mantener los tejidos mesenquimáticos y asegurar su adecuada reparación frente a una injuria. Tales procesos implicarían la reedición de los eventos celulares asociados a la diferenciación mesenquimática observado en el embrión. Sin embargo, en el organismo adulto, el proceso mesenquimático está sustentado por una población de CPM ubicada en la MO (Friedenstein y col, 1976; Owen y col, 1985; Caplan, 1991).

Frente al requerimiento regenerativo o reparador de un tejido mesenquimático, el proceso de diferenciación comprende el compromiso de la CPM trocal a seguir un linaje mesenquimático específico, y la posterior maduración a través de esta vía. Paralelamente al proceso de diferenciación, debe existir una migración de las CPM comprometidas desde la MO, hacia los sitios de regeneración/reparación donde el fenotipo terminal es requerido y

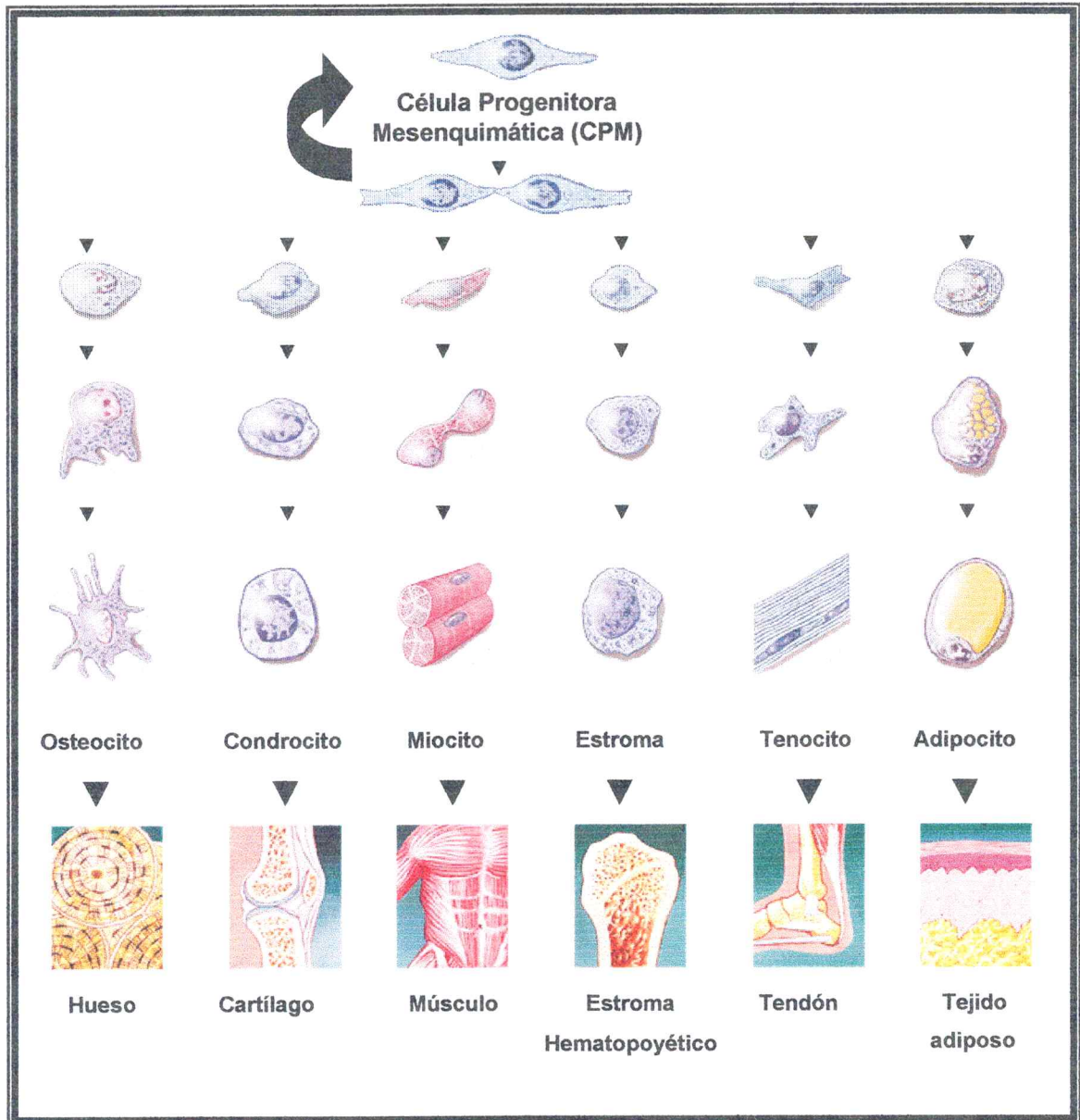


FIGURA 2: Mesengénesis.

El proceso mesenquimático está sustentado en CPM presentes en la MO. El esquema representa las etapas postuladas para la diferenciación de la CPM a los distintos tejidos mesenquimáticos.

expresado (Caplan, 1994). Los mecanismos reguladores tanto de la diferenciación de un linaje en particular, como de la migración de las CPM desde la MO, son desconocidos, aunque algunas citoquinas podrían participar en este proceso (Urist, 1983; Ahrens y col, 1993; Gimble y col 1995; Kuznetsov y col, 1997)

2. RESIDENCIA DE LAS CPM.

En el organismo adulto las CPM troncales residen en el estroma de la MO y desde este lugar sustentan el proceso mesenquimático (Caplan, 1994; Prockop, 1997). Adicionalmente se han detectado CPM comprometidas en otros tejidos tales como hueso, cartílago y músculo (Urist y col, 1978; Grigoriadis y col, 1988; Bernard-Beaubois y col, 1997; Caplan y col, 1997), lo que es interpretado como la migración de estos progenitores que se han movilizado desde la MO en respuesta al requerimiento del tejido en particular. Cualquiera sea el caso, es evidente que las CPM pueden moverse a través de la sangre, lo cual ha sido demostrado en ratones (Piersma y col, 1983) y observado en humanos bajo ciertas condiciones (Fernández y col, 1997).

Los sitios de residencia, funcionalidad y posible migración de CPM durante el desarrollo fetal no han sido evaluados. De ocurrir, el proceso de migración debiese ser a través de la circulación fetal. Por ello, la presencia de CPM en la sangre de cordón umbilical (SCU) puede representar valiosa información para el uso de estas células en el desarrollo y aplicación de

terapias biológicas. Es el caso de lo que actualmente ocurre con las células progenitoras hematopoyéticas presentes en SCU (Rubinstein, 1995), lo que ha permitido la existencia de bancos de SCU que se utilizan en procedimientos de trasplantes de estas células (Dennis-Kendall y col, 1996).

3.- CARACTERIZACIÓN DE CPM DE MO.

La CPM que se encuentra en el estroma de la MO, puede ser aislada, mantenida y expandida *ex vivo* (Bruder y col, 1997a). Originalmente fue identificada sobre la base de su morfología fibroblastoide, capacidad adhesiva y potencial osteogénico (Friedenstein, 1976; Castro-Malaspina, 1980). El potencial proliferativo presenta como requerimiento el uso de medios de cultivo enriquecidos con suero fetal bovino (SFB) seleccionado (Prockop, 1997), aunque algunos reguladores fisiológicos de la proliferación tales como PDGF, TGF β , bFGF, EGF han sido postulados (Kimura y col, 1988, Kuznetsov, 1997).

Se han identificado algunos marcadores definidos como específicos del linaje mesenquimático y que son expresados por las CPM: antígenos de la familia SH (SH2, SH3 y SH4), α -smooth muscle actin (actina de músculo esquelético, ASMA) y STRO-1 (Simmons y Torok-Storb, 1991; Haynesworth y col, 1992; Galmiche y col, 1993). Por otra parte, estas células no expresan

marcadores de linaje hematopoyético (CD14, CD34 y CD45) o endotelial (CD31, vWF).

Estas células producen moléculas de matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágenos tipo I, III, IV, VI) y expresan moléculas de adhesión en su superficie (VCAM-1, ICAM-1) (Prockop, 1997; Chichester y col, 1993), las cuales han sido asociadas a su rol como soporte físico y regulador de la biodisponibilidad de citoquinas reguladoras de la hematopoyesis (Gordon y col, 1987)

Se ha demostrado que las CPM producen algunas citoquinas o factores de crecimiento hematopoyéticos tales como IL-6, G-CSF, M-CSF, SCF y LIF (Hayneswoth y col, 1996; Majumdar y col, 1998), lo cual refleja su contribución en la constitución del estroma de la MO. Por otra parte, expresan en su superficie algunas cadenas de receptores para factores como PDGF, EGF, IGF-1, NGF (Gronthos y Simmons, 1995; Conget y Minguell, 1999; Satomura y col, 1998; Pittenger y col 1999), aunque el rol de éstos en la fisiología de estas células no ha sido evaluado.

4. POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN DE CPM.

Las primeras evidencias sobre el potencial de diferenciación de las CPM fueron obtenidas en forma secundaria a ensayos *in vivo* de trasplantes de MO (Friedenstein y col, 1968; Sale y Storb, 1983; Prockop, 1997). Con posterioridad, estudios *in vitro* o *in vivo* realizados con CPM han permitido

demostrar que estas células tienen el potencial para diferenciar a fenotipos correspondientes a tejidos tales como hueso (Goshima y col, 1991; Pereira y col, 1995; Kadiyala y col, 1997), cartílago (Pereira y col, 1995; Kadiyala y col, 1997), tendón (Young y col, 1998), músculo (Ferrari y col, 1998), tejido adiposo (Nuttall y col, 1998) y estroma de MO (Kuznetsov y col, 1997; Majumdar y col, 1998).

Los cultivos de CPM están conformados por una población heterogénea de células dentro de las cuales una subpoblación corresponde células troncales mesenquimáticas no comprometidas, y las demás representan progenitores con distinto grado de compromiso hacia los linajes mesenquimáticos (Zohar y col, 1997; Colter y col, 2000; Muraglia y col, 2000). Trabajo realizado en nuestro laboratorio ha permitido postular un esquema de diferenciación en el que se establece una jerarquía divergente de progenitores mesenquimáticos, desde la célula troncal hasta los linajes (Minguell y col, 2001)(Figura 3) En este esquema de diferenciación, a partir de la célula troncal mesenquimática se generan distintos progenitores que adquieren un compromiso hacia un linaje mesenquimático, y como consecuencia de ello restringen su potencial de diferenciación. (Figura 1). Los progenitores comprometidos presentan características intermedias entre la célula troncal y los progenitores maduros, pueden compartir algunas características comunes entre sí, aunque adquirirán características específicas a medida que maduren y expresen el fenotipo terminal.

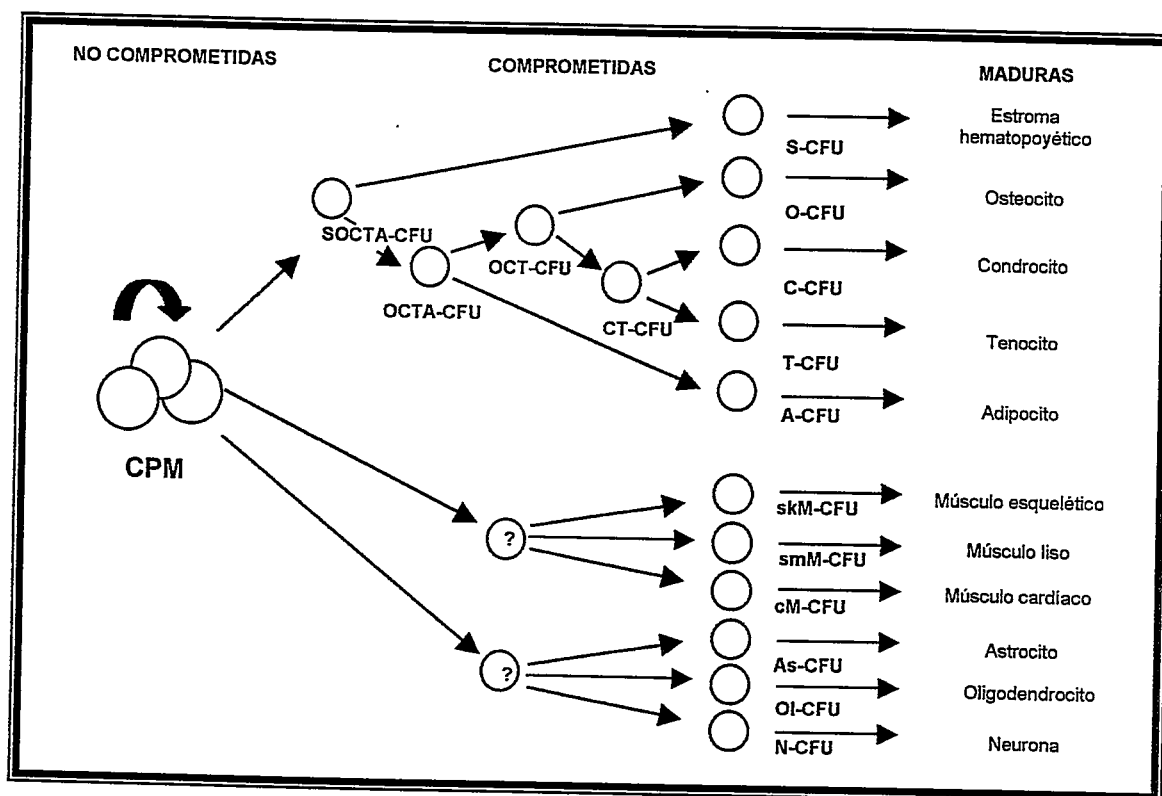


FIGURA 3: Distribución jerárquica de los progenitores mesenquimáticos.

En este esquema de diferenciación los progenitores mesenquimáticos se encuentran subdivididos en tres subpoblaciones: células troncales mesenquimáticas correspondientes a CPM no comprometidas, progenitores mesenquimáticos comprometidos con un linaje mesenquimático y células maduras. Los progenitores comprometidos han sido denominados como unidades formadoras de colonias (CFU) y su potencial de diferenciación por S, estroma hematopoyético; O, osteoblastos; C, condrocitos; T, tenocitos; A, adipocitos; skM, células de músculo esquelético; smM, células de músculo liso; cM, células de músculo cardíaco; As, astrocitos; Ol, oligodendrocitos y N, neuronas. El esquema ha sido estructurado en base a estudios con cultivos expandidos de células progenitoras mesenquimáticas de la médula ósea adulta (Minguell, JJ y col, 2001, anexo 3).

El compromiso de las CPM hacia un linaje específico implica la expresión y/o activación de factores de transcripción determinados. Así, los factores Cbfa-1, PPAR γ 2 y MyoD que no se expresan en la CPM troncal, si lo hacen en CPM comprometidas hacia los linajes osteo/condrogénico, adipogénico y muscular respectivamente (Ducy y col, 1997; Nuttall y col, 1998)

La maduración implica la expresión y/o activación de genes y proteínas asociadas a la funcionalidad del fenotipo. De esta forma, para la vía osteogénica se observa la expresión de los genes que codifican para fosfatasa alcalina, osetocalcina, osteopontina, sialoproteína del hueso y colágeno I (Stein and Lian, 1993) En el caso de la vía condrogénica, se expresan colágeno II y IX y proteoglicanos y en la vía adipogénica, aP2, adiposina, leptina y lipasa lipoproteica (Ailhaud et al, 1990). La vía miogénica se caracteriza por la expresión de miogenina, MRF4 y miosina (Smith et al, 1993).

La expresión de estos marcadores de compromiso y maduración permite evaluar el curso del proceso de diferenciación. Finalmente, también es posible analizar el fenotipo maduro de cada linaje al evaluar la aparición de características específicas como la acumulación de depósitos de hidroxapatita en la matriz extracelular, gotas de grasa en el citoplasma o la formación de miotubos multinucleados para la diferenciación osteogénica, adipogénica o miogénica respectivamente (Friedenstein, 1976; Owen, 1988; Wakitani y col, 1995)

5.- ¿EXISTEN MICROAMBIENTES MOLECULARES MESENQUIMÁTICOS?.

Existe escasa información respecto a los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la diferenciación de las CPM a los linajes mesenquimáticos. Algunos de los inductores utilizados en los ensayos de diferenciación *in vitro* son estímulos fisiológicos, tales como glucocorticoides (Beresford y col, 1992) y miembros de la super-familia de los TGF β , entre los que destacan BMP-2 y BMP-4 (Ahrens y col, 1993; Gimble y col, 1995) que promueven la diferenciación osteo/condrogénica. Otros moduladores como LIF y lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL), han mostrado capacidad para inducir la diferenciación adipogénica (Aubert y col, 1999; Parhami y col, 1999).

La mayor parte de los inductores utilizados *in vitro* corresponden a estímulos químicos artificiales sin relevancia fisiológica (dexametasona, IBMX, indometacina, β -glicerofosfato, ácido ascórbico, 5-azacitidina, etc.) (Grigoriadis y col, 1988; Wakitani y col, 1995; Bruder y col, 1997b). Sin embargo la existencia y composición de microambientes moleculares comunes o exclusivos para modular la diferenciación a los distintos linajes mesenquimáticos no se conoce.

6. PROYECCIONES TERAPÉUTICAS PARA EL USO DE CPM.

Los potenciales de autorenovación y diferenciación de las CPM ofrecen interesantes proyecciones para su uso en terapias biológicas dirigidas a reemplazar o reparar un tejido determinado. Así, se han desarrollado variadas líneas de investigación para estimular aplicaciones terapéuticas dirigidas a los tejidos mesenquimáticos o indirectamente al sistema hematopoyético.

Las primeras observaciones respecto de la transplantabilidad de las CPM han sido obtenidas en forma secundaria a trasplantes de médula ósea en los cuáles se han observado no sólo la reconstitución del linaje hematopoyético, sino también de algunos tejidos mesenquimáticos (Sale y Storb, 1983; Horwitz y col, 1999)

La posibilidad de utilizar CPM en aplicaciones clínicas ha sido evaluada considerando la posibilidad de dirigir las células a tejidos mesenquimáticos definidos, ya sea por inyección directa o implante local, proceso que busca producir la reparación o regeneración local del tejido aprovechando su potencial de diferenciación. Esta alternativa ha sido utilizada en hueso (Goshima y col, 1991; Richards y col, 1999), cartílago (Johnstone y Yoo, 1999) y tendón (Young y col, 1998). Alternativamente han sido infundidas en forma sistémica con el fin de obtener la destinación hacia la MO (Lazarus y col, 1995) y repoblar el organismo con una nueva dotación de CPM orientada a sustentar un nuevo proceso mesengénico en reemplazo de uno funcionalmente

deficiente o dañado, aprovechando su capacidad de ser trasplantable y su potencial de autorenovación (Figuras 2 y 3).

El uso de las CPM en terapias biológicas debe ser ampliado considerando el atractivo blanco que este modelo celular representa para la terapia génica. En este contexto se logró transducir eficientemente CPM humanas con un vector retrovirales y adenovirales (Li y col, 1995; Conget y Minguell, 2000).

PROPOSITOS DE ESTA TESIS.

La propuesta original de esta tesis fue estructurada sobre la base de la información existente hasta 1997. Considerando la rápida evolución y generación de información en el ámbito de las CPM de MO, la propuesta original presentó algunas redefiniciones a fin de dirigir el desarrollo de la tesis hacia aspectos no abordados por otros estudios.

Los objetivos principales de este trabajo son detectar la presencia de CPM en la SCU humana y evaluar la posible constitución molecular de microambientes específicos que regulen la capacidad de proliferación y/o diferenciación de la CPM

Sobre la base de lo propuesto, el trabajo realizado tuvo como objetivos específicos:

- 1.- Evaluar la presencia de CPM en SCU, y realizar la caracterización fenotípica y funcional de estas células.
- 2.- Evaluar el impacto de citoquinas de la familia IL-6 en la proliferación y diferenciación osteogénica de CPM humanas, como alternativa para definir un microambiente molecular regulador para estas células.
- 3.- Realizar estudios de trasplante de CPM para evaluar su capacidad de reconocer y establecer residencia en la MO y/u otros tejidos mesenquimáticos.
- 4.- Evaluar el potencial uso de CPM en aplicaciones terapéuticas dirigidas al sistema hematopoyético o mesenquimático, por medio de estudios de xenotrasplante.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES.

De *ABIC*, se obtuvo 5-FU.

De *Bio-Rad* se obtuvo acrilamida, bis-acrilamida, marcadores de peso molecular para proteínas, membrana para transferencia de proteínas PVDF, kit para determinación de concentración de proteínas.

De *Chemicon*, se obtuvo el anticuerpo monoclonal MAB1470.

De *Dako*, se obtuvieron los anticuerpos anti-CD14 y anti CD-34 conjugados con PE, anti-CD38 conjugado con RPE, anti-CD45 conjugado con RPE-Cy5, y las respectivas inmunoglobulinas controles de isotipo.

De *HyClone*, se obtuvo SFB definido.

De *Merck*, se obtuvo ácido acético glacial, etanol absoluto, formaldehído, urea.

De *NEN* se obtuvo ^{32}P -UTP.

De *Life Technologies*, se obtuvo α -MEM, M199, DMEM, IMDM, PBS, TGF β 1, estándar de peso molecular λ DNA/HindIII.

De *Operon Tech. Inc*, se obtuvieron los partidores para amplificar β -actina.

De *Osiris*, se obtuvieron los anticuerpos monoclonales SH2, SH3, SH4.

De *Pharmingen*, se obtuvo el anticuerpo anti-CD130 conjugado con RPE, el kit para ensayo de protección a ribonucleasa Riboquant, los set de templados hCK-4 y hCR-2 para transcripción *in vitro*.

De *Polaroid*, se obtuvo película instantánea en blanco y negro tipo 667.

De *Promega. Inc.*, se obtuvo *Taq* DNA polimerasa, dATP, dGTP, dTTP, dCTP estándar de peso molecular DNA ladder 100 bp y los kit para purificación de RNA "SV total RNA Isolation System", para RT-PCR "Access RT-PCR System"

De *Sigma Chemicals Co.*, se obtuvo Ficoll-Hypaque, tripsina, BSA, EDTA, HEPES, Tris, IBMX, indometacina, FDA, X-Gal, DEPC, agarosa, bromuro de etidio, PI, AO, Cristal Violeta, Azul Tripan, Nile Red, Oil Red O, Sudan Black, Alizarin Red S, los kits para determinación citoquímica de actividad fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, α -naftil acetato esterasa y naftol AS-D acetato esterasa, de polisacáridos (ácido peryódico/Schiff) y lípidos (Sudan black B)

De *R&D Systems* se obtuvieron los anticuerpos anti-IL6 receptor, anti-LIF receptor, anti-gp130, las proteínas IL-6, LIF, sgp130, SCF, y los kit ELISA para determinación de IL-6, LIF, sgp130 y sIL-6R.

De *Santa Cruz Biotechnology* se obtuvo el anticuerpo monoclonal contra stat-3 fosforilado (B-7).

De *Stem Cells* medio de cultivo Mesenculth, kit para selección de progenitores hematopoyéticos Rosettep.

B. MÉTODOS.

1. CULTIVOS CELULARES.

1.a. Obtención y cultivo de CPM humanas desde SCU.

CPM humanas se aislaron a partir de cosechas de SCU obtenidas de partos con rangos de edad gestacional entre 28 y 42 semanas, siguiendo protocolos de los Comité de Ética de los Hospitales Salvador y Barros Luco, Santiago.

Las muestras de SCU fueron colectadas en botellas conteniendo 10 ml de medio de cultivo M-199 con heparina (2.500 UI), y fueron procesadas dentro de las 24 horas siguientes a la cosecha. A cada muestra se realizó recuento celular y de progenitores hematopoyéticos por citometría de flujo. Cada muestra fue diluída con un volúmen de M-199 y luego se separaron células mononucleadas (CMN) en una gradiente continua de Ficoll-Hypaque (densidad $1,077 \text{ g/cm}^2$) y se centrifugó a $400 \times g$ por 30 min a temperatura ambiente (TA). Las CMN fueron extraídas desde la interfase de la gradiente, lavadas con α -MEM, centrifugando a $700 \times g$ por 10 min a TA. Las CMN así obtenidas, se resuspendieron en α -MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) 20 % (v/v) y se sembraron a una densidad de $1 \times 10^6 \text{ CMN/cm}^2$. Cuando la monocapa de células adherentes establecida se hizo confluyente (días 20-25), se eliminaron las células no adherentes y las adherentes se tripsinizaron. Para ello, las monocapas se incubaron con tripsina 0,25% (p/v) en tampón fosfato

salino (PBS, 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) por 10 - 20 min a 37 °C y luego, la tripsina se inhibió agregando 1 volumen de α -MEM + SFB 10% (v/v) y se eliminó centrifugando las células a 600 x g por 10 min a TA. Los subcultivos de CPM se establecieron a partir de estas células, las cuales se resuspendieron en α -MEM suplementado con SFB 10%(v/v) (medio completo) y se sembraron a una densidad de 10.000 células/ cm^2 . Los cultivos expandidos de CPM fueron subcultivados cada 5 días aproximadamente, evitando alcanzar confluencia.

Luego del segundo subcultivo las células fueron utilizadas para los experimentos o criopreservadas. Para esto, las CPM fueron resuspendidas en medio de criopreservación (α -MEM, 10% dimetilsulfóxido, 80% SFB) y congeladas (fase gaseosa de nitrógeno líquido, 40 minutos) y luego mantenidas en nitrógeno líquido.

1.b. Obtención y cultivo de CPM humanas desde MO.

CPM humanas se aislaron a partir del material sobrante de cosechas de MO obtenidas de individuos sanos, que participaban como donantes en trasplantes alogeneicos, de acuerdo a protocolos del Comité de Ética de Clínica Las Condes, Santiago

Las células de MO fueron colectadas usando heparina 100 U/ml como anticoagulante y luego se diluyeron 3 veces con α -MEM. Tres volúmenes de esta suspensión celular se cargaron sobre dos volúmenes de una gradiente continua de Ficoll-Hypaque según ha sido previamente descrito (1.a). El inicio y

mantención de los cultivos generados a partir de estas muestras fue similar al procesamiento de muestras de SCU.

1.c. Separación de células quiescentes de los cultivos de CPM.

Para seleccionar las células quiescentes G₀, desde los cultivos expandidos, se sembraron 12.500 CPM/cm² en α -MEM + SFB 10%(v/v). Uno o 2 días más tarde, el medio se reemplazó por medio de cultivo suplementado con 5-fluorouracilo (5-FU) 0,6 mg/ml y se incubó 15 h a 37 °C. Luego, se eliminó el 5-FU y las células se cultivaron por 7 días más, cambiando todo el medio cada 48 h, para eliminar así las células muertas. Estas últimas corresponden a todas aquellas células que estaban en las fases activas del ciclo celular (G₁, S, G₂ o M), al momento de exponerlas al 5-FU. A los 7 días de cultivo, las células quiescentes (G₀) resistentes al 5-FU se analizaron según Métodos 4.

1.d. Obtención y cultivo de CPM murinas.

Las CPM murinas se obtuvieron a partir de MO de ratones balb/c inmunodeficientes (nude). Para ello, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y, en condiciones asépticas, se disectaron los fémures y las tibias. Luego de cortar las epífisis de estos huesos se hizo pasar 1,5 ml de α -MEM a presión utilizando una aguja de 26G por el interior de ellos. La

suspensión de células así obtenida se cultivó directamente en forma similar a las CMN obtenidas de SCU humanas.

1.e. Cultivo de células 3T3.

Las células 3T3 (ATCC CRL-1658) corresponden a una línea celular de fibroblastos murino. Estas células se cultivaron en DMEM suplementado con SFB 10%(v/v). Para subcultivar, las células se incubaron con tripsina 0,25%(p/v) en PBS (50 ul/cm²) 5 min a 37 °C, se lavaron en medio con SFB y luego, se resembraron al 10% de la densidad inicial. Estas células fueron utilizadas como controles para ensayos de sustento de hematopoyesis en ensayos de colonias y ensayos de PCR y RT-PCR.

1.f. Ensayos de colonias hematopoyéticas.

La capacidad de proliferación de progenitores hematopoyéticos fue evaluada por ensayos de formación de colonias de granulocitos-macrofagos (CFU-GM) en medio semisólido (agar)(Coutinho y col, 1993).

Para ello se purificaron células progenitoras hematopoyéticas CD34+ a partir de SCU, utilizando un sistema de selección negativa (Rosettep, Stem Cells). Este consiste en un conjunto de anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de células hematopoyéticas maduras (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b, glicoforina A). Las muestras de SCU fueron incubadas 20 minutos con los anticuerpos, diluidas con PBS 2% SFB (1:1), separadas luego separadas en una gradiente continua de Ficoll-Hypaque y la

población enriquecida de progenitores hematopoyéticos CD34+ fue recuperada de la interfase.

Los ensayos de colonias se iniciaron sembrando 10.000 células CD34+ en placas de 35 mm en medio suplementado con medios condicionados de cultivos de CPM-SCU, células 3T3 o con GM-CSF. Luego de 10 días de cultivo se contabilizaron colonias CFU-GM formadas por más de 20 células.

Todos los cultivos celulares se mantuvieron bajo atmósfera húmeda O₂-CO₂ 95/5% a 37 °C y los medios de cultivo utilizados incluían sulfato de gentamicina 80 mg/l.

2. RECUENTOS CELULARES.

2.a. La fórmula hematológica (hematocrito, blancos totales, recuento diferencial de blancos, etc) de las muestras de sangre, MO y SCU se determinó en contador electrónico de partículas Cell-Dyne.

2.b. Para muestras de sangre, MO y SCU, el número de células nucleadas se determinó en cámara de Neubauer. Para ello, las células se diluyeron 10 veces con ácido acético 5% (v/v) + Cristal Violeta 0,05%(p/v) y se contaron en 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer. La concentración de células se calculó usando la fórmula:

concentración de células ($10^6/\text{ml}$) = recuento promedio $\times 10^4 \times 10$.

2.c. Para cultivo en botellas o placas de 100 mm, el número de células se determinó en cámara de Neubauer. Para ello, las células se soltaron de la placa de cultivo, se diluyeron 2 veces con Azul Tripan 0,4% (ver Métodos 3) y se contaron en 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer. La concentración de células se calculó usando la fórmula:

concentración de células ($10^6/\text{ml}$) = recuento promedio $\times 10^4 \times 2$.

2.d. Para cultivos en pozos (placas de 24 o 96 pozos), el número de células se determinó espectrofotométricamente tiñendo las células adheridas. Para ello, las células se lavaron con PBS ($250 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) y se tiñeron con Cristal Violeta 0,2%(p/v) + etanol 10%(v/v) ($100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) por 5 min a TA. Después de lavar 4 veces con PBS ($250 \mu\text{l}/\text{cm}^2$), para remover el exceso de tinción, se solubilizó el colorante unido a las células incubándolas con una mezcla 50/50 de NaH_2PO_4 0,1 M pH 4,5 y etanol 50%(v/v) ($100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) por 5 min a TA. Finalmente, se determinó la absorbancia a 570 nm en lector de microplaca y se calculó el número de células interpolando los datos en curva estándar (A_{570} {0,1 - 0,5} vs. número de células { $1 - 6 \times 10^3$ }) obtenida a partir de recuentos en cámara de Neubauer (Métodos 2.c).

3. VIABILIDAD CELULAR.

El criterio de viabilidad utilizado fue la exclusión de colorantes vitales. Para ello las células se tripsinizaron, se lavaron y resuspendieron en medio conteniendo SFB (α -MEM + SFB 10%(v/v) o PBS + SFB 2%(v/v)) y luego:

3.a se diluyeron con Azul Tripan 0,4% (1:1) y se determinó el número de células vivas y muertas (azules) en cámara de Neubauer (Métodos 2.c).

3.b se les agregó yoduro de propidio (PI) $10 \mu\text{g}/10^6$ células y se analizaron inmediatamente en citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson, CA, USA). La fluorescencia emitida por PI se detectó en el canal FL-3 y las células que la emiten corresponden a células muertas. que incorporaron el PI. Se adquirieron al menos 10.000 eventos, los cuales se analizaron utilizando el software CELLQUEST.

La VB se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{VB (\%)} = \frac{\text{células totales} - \text{células que no excluyen el colorante vital}}{\text{células totales}} \times 100$$

4. CARACTERIZACION DE POBLACIONES CELULARES EN DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR.

4.a. Distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo celular por cuantificación del contenido total de DNA genómico (Juan y Darzynkiewicz, 1998).

Las CPM se tripsinizaron, se lavaron con PBS (1ml/10⁶ células) y luego, se permeabilizaron con etanol 70%(v/v) (0,6 ml/10⁶ células), 10 min a 4 °C, agitando cada 5 min. Posteriormente se lavaron con PBS, centrifugando a 2.000 x g por 15 min a TA, y se tiñeron con PI 10 µg/ml durante la noche a 4 °C. Para eliminar el RNA, que también se tiñe con PI, las células se incubaron con RNAsa libre de DNAsa 0,1 mg/ml 15 min a 37 °C. Finalmente, las células se analizaron en citómetro de flujo. La fluorescencia emitida por PI se detectó en el canal FL-3. Se adquirieron al menos 10.000 eventos, los cuales se analizaron utilizando el software ModFIT.

Cada fase del ciclo celular fue asignada en función del contenido total de DNA genómico, así fue posible distinguir células normoploides que estaban en las fases Go/G1 (2n, 2c) de aquellas que estaban en G2/M (2n, 4c) y de aquellas que estaban en fase S (2n, xc; donde $2 < x < 4$).

4.b. Cuantificación simultánea de DNA y RNA para identificación de células quiescentes G0 (Juan y Darzynkiewicz, 1998).

Dado que con la metodología anterior no se puede discriminar entre células que tiene el mismo contenido de DNA pero están en distintas fases del ciclo celular, en especial G₀ vs G₁, se utilizó la tinción con naranja de acridina (AO) para discriminar ambas fases.

Las CPM se tripsinizaron y resuspendieron en PBS + SFB 2%(v/v) (0,5 ml/10⁶ células). Luego, se incubaron con la solución de permeabilización y denaturación de ácidos nucleicos (Triton X-100 0,1%(v/v) + HCl 80 mM + NaCl 0,86%(p/v); 0,5 ml/10⁶ células) por 15 s a 4 °C y con la solución de tinción (ácido cítrico 37 mM + Na₂HPO₄ 126 mM pH 6 + EDTA 0,034%(p/v) + NaCl 0,86%(p/v) + AO 6 µg/ml; 1 ml/10⁶ células) por 2 min a 4 °C. Durante los siguientes 8 min, las células se analizaron en citómetro de flujo. En las condiciones experimentales usadas, la AO unida a DNA emite fluorescencia que se detecta en el canal FL-1 y unida a RNA, fluorescencia que se detecta en canal FL-3. Se adquirieron al menos 10.000 eventos, los cuales se analizaron utilizando el software CELLQUEST.

Las células quiescentes G₀ corresponden a aquellas normoploides (2n, 2c) con un bajo contenido de RNA (FL-3H < 300). Las células en ciclo celular (fases activas) corresponden a células normoploides con contenido variable de DNA y RNA.

5. INMUNOMARCACIÓN.

5.a. Inmunodetección de antígenos de superficie.

Las muestras de sangre se marcaron directamente para lo cual 100 μ l de cada muestra se incubaron con 10 μ l de anticuerpos marcados (1 a 3 anticuerpos simultáneamente) durante 30 min a 4 °C. Los glóbulos rojos se lisaron por incubación con solución de lisis durante 10 min a TA, y las células fueron lavadas con PBS + SFB 2%(v/v) dos veces. Las células inmunomarcadas se analizaron en citómetro de flujo. La fluorescencia emitida por FITC se detectó en el canal FL-1, la de PE en FL-2, y la de RPE-Cy5 en FL3. Se adquirieron 30.000 eventos, los cuales se analizaron utilizando el software CELLQUEST.

Las CPM se lavaron 2 veces con PBS y luego se incubaron con EDTA 0,07%(p/v) (50 μ l/cm²) o con Cell Dissociation Solution (CDS, 50 μ l/cm²) por 30 - 60 min a 37 °C. Alternativamente, las CPM se tripsinizaron y luego se incubaron con agitación en α -MEM + SFB 10%(v/v) por 1-3 h a TA para permitir la recuperación de las moléculas de superficie sensibles a la tripsinización. En ambos casos, una vez lavadas con PBS + SFB 2%(v/v), 1 x 10⁵ células se incubaron con 20 μ l de diluciones óptimas de los anticuerpos listados en la Tabla 1 por 30 min a 4 °C. En el caso de las inmunofluorescencias indirectas, las células se lavaron nuevamente para eliminar el primer anticuerpo y luego, se incubaron con 20 μ l anti-IgG murina total conjugado con FITC o PE (Tabla 1)

TABLA 1. Anticuerpos utilizados en esta tesis.

clon (fluorocromo)	Antígeno	origen
MΦP9 (PE)	CD14	<i>Beckton Dickinson</i>
P4C10	CD29	<i>Sigma</i>
9G11	CD31 (PECAM-1)	<i>R&D Systems</i>
8G12 (PE)	CD34	<i>Beckton Dickinson</i>
F7101 (FITC)	CD38	<i>DAKO</i>
2D1 (FITC)	CD45	<i>Beckton Dickinson</i>
C7099 (RPE-Cy5)	CD45	<i>Dako</i>
L25 (PE)	CD49d ($\alpha 4$)	<i>Beckton Dickinson</i>
P1D6	CD49e ($\alpha 5$)	<i>Gibco, BRL</i>
23C6 (FITC)	CD51/CD61 ($\alpha v\beta 3$)	<i>Pharmingen</i>
P1F6	CD51/ $\beta 5$ ($\alpha v\beta 5$)	<i>Gibco, BRL</i>
BBIG-I1 (FITC)	CD54 (ICAM-1)	<i>R&D Systems</i>
BBIG-V3 (FITC)	CD106 (VCAM-1)	<i>R&D Systems</i>
SH2	Antígeno (Ag) asociado a CPM	<i>Osiris Therapeutics</i>
SH3	Ag asociado a CPM	<i>Osiris Therapeutics</i>
SH4	Ag asociado a CPM	<i>Osiris Therapeutics</i>
MAB1470	Ag específico endotelial	<i>Chemicon</i>
202D3	Factor von Willebrand (vWF)	Dr. M.R.Bono
1A4	α -actina de músculo liso (ASMA)	<i>Sigma</i>
B-7	p-stat-3	<i>Santa Cruz</i>
28126.111	gp130	<i>Biotechnology</i>
17506.111	IL-6 receptor	<i>R&D Systems</i>
IST-4	Fibronectina	<i>R&D Systems</i>
LAM-89	Laminina	<i>Sigma</i>
COL-1	Colágeno tipo 1	<i>Sigma</i>
5C6	Colágeno tipo 6	<i>Sigma</i>
X38	Control isotipo	<i>Beckton Dickinson</i>
X39 (PE)	Control isotipo	<i>Beckton Dickinson</i>
X40 (FITC)	Control isotipo	<i>Beckton Dickinson</i>
X9055 (RPE-Cy5)	Control isotipo	<i>DAKO</i>
FITC	anti-IgG murina total	<i>DAKO</i>
PE	anti-IgG murina total	<i>Sigma</i>

por 30 min a 4 °C. Las células inmunomarcadas se analizaron en citómetro de flujo. La fluorescencia emitida por FITC se detectó en el canal FL-1 y la de PE, en FL-2. Se adquirieron 10.000 eventos, los cuales se analizaron utilizando el software CELLQUEST.

5.b. Inmunodetección de antígenos intracelulares.

Las CPM se tripsinizaron, se lavaron con PBS (1ml/10⁶ células) y luego, se permeabilizaron con etanol 70%(v/v) (0,6 ml/10⁶ células), 10 min a 4 °C, agitando cada 5 min. Posteriormente se lavaron con PBS + SFB 2%(v/v), centrifugando a 2.000 x g por 15 min y 1 x 10⁵ células se incubaron con 20 µl de diluciones óptimas de los anticuerpos listados en la Tabla 1 por 30 min a 4 °C. En el caso de las inmunofluorescencias indirectas, las células se lavaron nuevamente para eliminar el primer anticuerpo y luego, se incubaron con 20 µl anti-IgG murina total conjugado con FITC o PE por 30 min a 4 °C.

Las células inmunomarcadas se analizaron en citómetro de flujo tal como se describió para marcación de CPM en Métodos 5.a.

5.c. Inmunodetección de moléculas de matriz extracelular.

Las CPM se sembraron a una densidad de 2.500 células/cm² en α-MEM + SFB 10%(v/v) sobre cubreobjetos de vidrio. Al día siguiente, las células adheridas se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con formaldehído 0,5%(p/v) (0,1 ml/cm²) por 20 min a TA. Después de lavar 3 veces con PBS + SFB

2%(v/v), las células se incubaron con 200 μ l de diluciones óptimas de los anticuerpos monoclonales anti-fibronectina, anti-colágeno I, anti-colágeno VI, anti-laminina por 30 min a 4 °C. Luego, las células se lavaron para eliminar el primer anticuerpo y se incubaron con 200 μ l anti-IgG murina total conjugado con FITC (Tabla 1) por 30 min a 4 °C. Las células inmunomarcadas se analizaron en microscopio de epifluorescencia equipado con filtro para fluoresceína (470 - 490 nm).

En todas las inmunomarcaciones se incluyeron controles negativos sin primer anticuerpo y/o usando un control de isotipo para el primer anticuerpo.

6. EXPRESIÓN DE MARCADORES CITOQUÍMICOS.

Utilizando células adheridas, se analizó la expresión de los marcadores citoquímicos fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, Sudan black B, periodic acid-Schiff, naftol AS-D cloroacetato esterasa y α -naftil acetato esterasa. Estos ensayos fueron realizados utilizando sistemas de detección comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma Diagnostic Kits).

7. EXPRESION GÉNICA DE MARCADORES MOLECULARES DE COMPROMISO A LOS LINAJES OSTEO O ADIPOGÉNICO.

La presencia, en los cultivos de CPM, de células comprometidas a los linajes adipo u osteogénico se determinó evaluando la expresión génica de los marcadores de compromiso PPAR γ 2 y Cbfa-1, respectivamente. Para ello:

7.a. se extrajo RNA total a partir de cultivos de CPM utilizando el kit SV Total RNA Isolation System siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se lisaron directamente en la placa de cultivo agregando 17,5 μ l/cm² de solución de lisis que contenía tiocianato de guanidina 4 M + Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 + β -mercaptoetanol 0,97%(v/v). Después de centrifugar a 12.000 x g por 10 min a TA, para eliminar los precipitados de proteínas y los restos celulares, el RNA se precipitó con 0,4 volúmenes de etanol 95%(v/v) y se unió a una membrana de sílica centrifugando a 12.000 x g por 1 min a TA. Para eliminar el DNA genómico contaminante, se agregó directamente a la membrana de sílica DNAsa I libre de RNAasa y se incubó 15 min a TA. Finalmente, el RNA unido se lavó con acetato de potasio 60 mM + Tris-HCl 10 mM pH 7,5 + etanol 60%(v/v) y se eluyó de la membrana de sílica con agua libre de nucleasas. La pureza del RNA se estimó determinando simultáneamente la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro Gene Quant, *Pharmacia*. Se consideraron puros aquellos RNA que presentaban un

cuociente A_{260}/A_{280} entre 1,7 y 2,1. La recuperación se calculó a partir de la relación ssRNA (RNA hebra simple) ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $A_{260} \times 40$, fue 5-10 $\mu\text{g}/10^6$ células.

7.b. Se realizó RT-PCR utilizando el kit Access RT-PCR System y los partidores mostrados en Tabla 2. Brevemente, en un único tubo cuyo volumen final de reacción era 25 μl , se agregaron 500 ng de RNA total, MgSO_4 1 mM, una mezcla de dNTPs 0,2 mM cada uno, partidores sentido y antisentido 1 μM cada uno, transcriptasa reversa *AMV* 0,1 U/ μl , *Tfl* DNA polimerasa 0,1 u/ μl y el tampón de reacción común, todo a 4 °C. La transcripción reversa se realizó por 45 min a 48 °C y luego, los templados generados se denaturaron por 2 min a 94 °C. La reacción de PCR se realizó con la siguiente programación: 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55° C y 30 s a 72° C y extensión final de 7 min a 72° C.

7.c. Los productos de la reacción de RT-PCR (10 μl) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 2%(p/v) en TAE que contenían bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La electroforesis se realizó a corriente constante de 60 mA durante 2 h a TA. Se utilizó como estándar de peso molecular DNA ladder 100 bp (100 - 1500 bp). Los geles se visualizaron en un transiluminador UV (312 nm) y se fotografiaron con película blanco y negro.

Como controles positivos se utilizaron cultivos de CPM inducidos a diferenciarse a adipocitos u osteoblastos (ver Métodos 8). En estas condiciones se detectaron los fragmentos del tamaño esperado para cada gen (Tabla 2).

TABLA 2: Partidores utilizados para RT-PCR.

Partidores utilizados para evaluar la expresión génica de marcadores de compromiso y diferenciación a los linajes adipo y osteogénico. Se indica la pareja de partidores usados (5' - 3') y el tamaño del amplificado generado (pb).

Marcador	partidor sentido	partidor antisentido	pb
PPAR γ 2	cagtggggatgctcataa	ctttggcatactctgtgat	390
Cbfa-1	ccgcacgacaaccgcacat	cgctccggcccacaaatctc	267
Leptina	gctttggccctatctttct	cacgtttctggaagcaac	227
OCN	gcagcgaggtagtgaagagaccag	gaagcgccgataggcctcctgaaag	164
GAPDH	cccacagtccatgccatcac	tccaccaccctgttgctgta	540

8. DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE LOS LINAJES OSTEO O ADIPOGÉNICO.

El potencial de diferenciación de las CPM fue determinado en función de la capacidad de estas células de generar *in vitro* y bajo estímulos adecuados, osteoblastos o adipocitos maduros.

Para evaluar el potencial de diferenciación osteogénico:

Se sembraron CPM a una densidad de 25.000 células/cm² en α -MEM + SFB 10%(v/v). Al día siguiente, el medio de cultivo fue reemplazado por el medio de diferenciación que contenía dexametasona 0,1 μ M + β -glicerofosfato 10 mM + ácido ascórbico 50 μ g/ml, este último se agregó diariamente y el medio total se cambio cada 4 días. La aparición de osteoblastos fue evaluada:

8.a. midiendo la expresión de la actividad fosfatasa alcalina por método citoquímico (Métodos 6.a.) .

8.b. midiendo la expresión de la actividad fosfatasa alcalina por método espectrocolorimétrico. Para esto las células adheridas se lavaron 2 veces con TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5 + NaCl 150 mM; 0,15 ml/cm²), se fijaron con etanol:formaldehído (90:10; 0,15 ml/cm²) incubando 30 s a TA y se lavaron nuevamente 3 veces con TBS. Luego, se agrego el sustrato p-nitrofenilfosfato 1

mg/ml en tampón bicarbonato 100 mM pH 9,6 + $MgCl_2$ 1 mM (0,15 ml/cm²) y se incubó 20 min a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo sacando la solución anterior de los pozos y agregándole 0,5 volúmenes de NaOH 3 N. Finalmente, se determinó la absorbancia a 405 nm en lector de microplaca. La actividad enzimática se expresó en función de la formación del producto p-nitrofenol (pNF) cuya concentración se calculó interpolando los valores de absorbancia en curva estándar obtenida a partir de pNF puro (A_{405} {0,2 - 1,4} vs. nmoles pNF {3 - 25}). Los resultados se expresaron como nmoles de pNF/min/ 10^6 células, para lo cual el número de células analizadas se determinó tiñéndolas directamente en los pozos con cristal violeta (Métodos 2.d.).

8.c. midiendo la producción del mensajero de RNA para osteocalcina por RT-PCR a partir del 7º día de estimulación. Las condiciones experimentales utilizadas son equivalentes a las descritas en la sección Métodos 7 y los partidores utilizados se muestran en la Tabla 2.

8.d. evaluando la capacidad de formar depósitos de calcio (mineralización de la matriz) por tinción von Kossa (después de dos semanas). Para ello, las células se lavaron 2 veces con PBS frío, se fijaron con formaldehído 10%(p/v) por 30 min a TA y se lavaron nuevamente 2 veces con agua bidestilada. Luego, se agregó nitrato de plata 2%(p/v) preparado en agua y se incubó en oscuridad por 10 min a TA. Después de lavar 5 veces con agua, las placas se expusieron a luz brillante (100 W) por 15 min a TA sobre papel aluminio. Finalmente, se

lavaron 3 veces con agua y se deshidrataron con etanol absoluto. Los focos de mineralización se visualizaron en microscopio de luz, apareciendo como precipitados negros.

Para evaluar el potencial de diferenciación adipogénico:

Las CPM se sembraron a una densidad de 25.000 células/cm² en α -MEM + SFB 10%(v/v). Al día siguiente, el medio de cultivo fue reemplazado por el medio de diferenciación que contenía dexametasona 1 μ M + IBMX 100 μ g/ml + insulina 5 μ g/ml + indometacina 60 nM, el cual se cambió cada 4 días. La aparición de células con el fenotipo de adipocitos fue evaluada por:

8.e. observación de células que acumulaban gotas de lípidos, lo cual fue monitoreada a diario observando los cultivos en microscopio de luz invertido.

8.f. tinción de lípidos acumulados con Oil Red O, después de 10-15 días. Para ello las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con Oil Red O saturado en isopropanol 60%(v/v) (0,15 ml/cm²) por 1 h a TA. Luego, se lavaron con PBS (0,25 ml/cm²) y se visualizaron en microscopio de luz. Los adipocitos aparecen como células grandes con abundantes gotas teñidas intensamente de color rojo.

8.g. evaluando la expresión génica de leptina por RT-PCR. Las condiciones experimentales utilizadas son equivalentes a las descritas en la sección Métodos 7 y los partidores utilizados se muestran en la Tabla 2.

9. TRANSFERENCIA GÉNICA POR VECTORES ADENOVIRALES.

En esta tesis se utilizó el vector Ad5CMVGFP, gentilmente donado por el Dr. Rainier de Martin (University of Vienna, Vienna, Austria). El virus recombinante derivado del serotipo Ad5 es deficiente en su replicación y la expresión del transgen reportero codificante para proteína fluorescente verde (GFP) está bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), él cual funciona eficientemente en células de estroma de MO.

9.a. Infección de CPM-SCU con Ad5CMVGFP.

Uno a dos días antes de la infección se sembraron las CPM a una densidad de 25.000 células/cm² en α -MEM + SFB 10%(v/v) directamente sobre la placa de cultivo o sobre cubreobjetos de vidrio. El día de la infección, las células se lavaron con α -MEM y se incubaron con diluciones de Ad5CMVGFP en medio libre de SFB (0,1 ml/cm²) por tiempos variables (12 h) a 37 °C. La cantidad de Ad5CMVGFP agregada se ajustó para que la MOI (multiplicity of infection, razón partículas adenovirales/células) final fuera 500 pfu/célula (Conget y Minguell 2000).

Una vez infectadas, las células se cultivaron por 48 horas para permitir la expresión de los transgenes. El medio utilizado para ello fue α -MEM + SFB 2%(v/v), en el cual las células no proliferan.

Como controles negativos de la infección alternativamente se utilizaron células:

- no infectadas.
- expuestas al solvente en el cual se almacena Ad5CMVGFP.

9.b. Análisis *in situ* de la expresión del transgen GFP.

Las células adheridas a cubreobjetos se lavaron con PBS, se montaron en portaobjetos de vidrio usando el medio Quantafluor y se visualizaron en microscopio de epifluorescencia equipado con filtro para fluoresceína (470 - 490 nm). Las células transducidas presentan fluorescencia verde en todo el citoplasma.

9.c. Análisis de la expresión del transgen GFP por citometría de flujo.

Las células se tripsinizaron, se lavaron, se resuspendieron en PBS + SFB 2%(v/v) conteniendo PI 5 μ g/ml ($0,3 \times 10^6$ células/ml) y se analizaron por citometría de flujo. La fluorescencia emitida por GFP se detectó en el canal FL-1 y la de PI en FL-3. Se adquirieron al menos 10.000 eventos y se analizaron sólo las células vivas (PI-) usando el software CELLQUEST. Puesto que el perfil de autofluorescencia de las células no infectadas es polidisperso, sólo las células

con intensidad de fluorescencia mayor que el límite superior del coeficiente de variación para la autofluorescencia fueron consideradas como transducidas.

10. ESTUDIOS PARA EVALUAR LA MOVILIZACIÓN Y RESIDENCIA DE CPM-SCU TRASPLANTADAS SISTÉMICAMENTE.

La capacidad de las CPM-SCU para movilizarse y reconocer la sitios de residencia, fue estudiada en un modelo de xenotrasplante, utilizando como receptores ratones balb/c inmunodeficientes. La putativa presencia de CPM en tejidos murinos de destinación, se realizó a través de amplificación de una secuencia génica humana específica correspondiente a β -globina.

10.a. Trasplante a ratones inmunodeficientes.

En estos experimentos se utilizaron ratones balb/c nude de 3 a 5 meses que pesaban entre 15-25 g. Los ratones fueron trasplantados inyectando intravenosamente 5×10^5 CPM/animal. Para ello, los animales se mantuvieron temperados (27 °C) e inmovilizados y recibieron en la vena de la cola, hasta 0,5 ml de suspensión celular en medio de cultivo libre de SFB. Los animales se mantuvieron bajo control diario hasta por 6 meses.

10.b. Presencia de CPM humanas en cultivos secundarios de MO murina.

A partir de MO extraída de ratones trasplantados se realizaron cultivos de colonias secundarias (CPM-secundarias humanas) según se ha descrito en Métodos 1.d. Estos cultivos fueron expandidos y se purificó DNA para amplificar la secuencia génica humana específica correspondiente a β -globina.

10.c. Detección de CPM humanas trasplantadas en tejidos murinos.

Luego de 6 meses post-transplante los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron (en condiciones asépticas) muestras de sangre, MO, bazo, oreja, cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñón, gónadas, músculo esquelético y cola, los cuales fueron congelados a -20°C hasta su procesamiento. La búsqueda de células humanas en estos órganos se realizó por amplificación por PCR de la secuencia humana específica de β -globina (Conget y col. 2001).

10.d. Purificación de DNA a partir de tejidos murinos.

A partir de los órganos procurados se purificó DNA genómico total utilizando el sistema Wizard (Genomic DNA Purification Kit, Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La integridad del DNA purificado se determinó por electroforesis en geles de agarosa 0,8%(p/v) en TAE que contenían bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La electroforesis se realizó a corriente constante de 60 mA durante 1 h. Se utilizó como estándar de peso molecular el DNA del bacteriofago lambda cortado con

la enzima de restricción HindIII (λ DNA/HindIII). Los geles se visualizaron en transiluminador UV (312 nm), se fotografiaron y se analizaron en densitómetro. La pureza del DNA se estimó determinando simultáneamente la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro Gene Quant. Se consideraron puros aquellos DNA que presentaban un cociente A_{260}/A_{280} entre 1,7 y 2,1. La recuperación se calculó a partir de la relación dsDNA (DNA doble hebra) ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times 50$.

10.e. Amplificación de la secuencia génica humana específica de β -globina.

La búsqueda de CPM humanas se realizó mediante PCR de tiempo real en el sistema LightCycler, utilizando el kit LightCycler-DNA Master SYBR Green I. Brevemente, las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 μl que contenía 200 ng de DNA, MgCl_2 4 mM, primarios sentido y antisentido (la secuencia de estos primarios no puede ser presentada debido a protecciones por patentes comerciales del fabricante, *Roche*) 0,5 μM cada uno y mezcla de PCR LightCycler-DNA Master Sybr Green 1 x que contiene: Taq DNA polimerasa, buffer de reacción, mezcla de dNTPs (0,2 mM cada uno con dUTP en vez de dTTP), MgCl_2 10 mM, Sybr Green que al intercalarse en la doble hebra de DNA emite fluorescencia a 490 nm.

La programación usada para la PCR fue: 1 ciclo de denaturación de 30 s a 94 °C con un variación de temperatura de 20 °C/s, 40 ciclos de amplificación de 0 s a 95 °C, 5 s a 64 °C, 10 s a 72 °C todos con variación de temperatura de

20 °C/s, 1 ciclo de melting de 0 s a 95 °C, 15 s a 65 °C con variación de temperatura de 20 °C/s, 0 s a 95 °C con variación de temperatura de 0,1 °C/s. La fluorescencia del Sybr Green fue detectada en el canal F1 al final de cada ciclo de amplificación y durante toda la etapa de melting, utilizando los siguientes valores de ganancia F1 5, F2 15, F3 30.

Como controles se utilizaron los siguientes:

- blanco: sin DNA.
- negativo: 200 ng de DNA de ratón que no recibió CPM humanas.
- positivo: 3 pg de DNA humano que corresponde a la cantidad mínima de DNA humano amplificable.
- positivo: 3 pg de DNA humano en 200 ng de DNA de ratón que no recibió CPM humanas.

La presencia de células humanas en los distintos tejidos murinos fue determinada de acuerdo a la aparición de un pico de amplificación por sobre el control negativo, con temperatura de denaturación de 84.5-85.5°C en la curva de melting (temperatura °C vs fluorescencia (-dF/dT)). En las condiciones de análisis descritas, la sensibilidad de este método fue de 1 célula humana en 70.000 células de ratón.

11.- EXPRESION GÉNICA DE CITOQUINAS DE LA FAMILIA IL-6 Y SUS RECEPTORES.

Para estos estudios se utilizó un ensayo de protección a ribonucleasa comercial (RiboQuant, Pharmingen), el cual permite la detección de múltiples especies de RNA mensajeros en forma simultánea. Las muestras de RNA total utilizadas en estos ensayos fueron obtenidas de cultivos de CPM según Métodos 7.a. El ensayo consta de tres etapas, las cuales fueron realizadas siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente:

11.a. Síntesis de sonda: se utilizó un conjunto de plasmidios linearizados codificantes para secuencias de RNA antisentido de los mensajeros a estudiar. La síntesis de estas secuencias se encuentra bajo el control del promotor del bacteriofago T7, fue realizada utilizando la RNA polimerasa T7 en presencia de ^{32}P -UTP y posteriormente purificadas.

11.b. Hibridización: exceso de sondas sintetizadas fueron hibridizadas en solución con las mensajeros de RNA presentes en las muestras de RNA total (12-16 horas).

11.c. Ensayo de protección a ribonucleasa: El RNA y las sondas no hibridadas fueron digeridas con RNAsa. Los híbridos de RNA protegidos fueron purificados, analizados por separación en geles denaturantes de poliacrilamida.

y autorradiografía. La identificación de las especies de RNA protegidas fue asignada sobre la base del tamaño del fragmento protegido.

Se utilizaron los set de templados:

- hCK-4 para mensajeros de RNA de citoquinas (IL-3, IL-6, IL-7, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LIF, SCF, OSM), y
- hCR-2 para cadenas de receptores de citoquinas (IL-3R α , IL-5R α , IL-6R α , GM-CSFR α , LIFR α , G-CSFR α , GM-CSFR α , gp130, β c).

12.- PRODUCCION DE CITOQUINAS DE LA FAMILIA IL-6 Y DE SUS CADENAS DE RECEPTORES.

12.a. Producción de citoquinas y de cadenas solubles de receptores.

La producción de las proteínas correspondientes a las citoquinas IL-6 y LIF, y a las cadenas solubles de los receptores sIL-6R y sgp130, fue evaluada a través de ensayos ELISA (R&D Systems) específicos para las especies humanas de estas moléculas.

Se analizaron muestras de medios de cultivos de CPM, los cuales luego de ser obtenidos, fueron centrifugados (12.000 rpm, 4 °C, 5 min) y mantenidos a -20 °C hasta el momento del ensayo.

La concentración de las especies encontradas fue normalizada con respecto a la concentración total de proteínas en el medio.

12.b. Detección de cadenas de receptores.

La detección de las cadenas IL-6R, LIFR y gp130 en la membrana de CPM fue analizada por inmunofluorescencia según Métodos 5.

En forma alternativa se realizó la detección por western blot. Para esto cultivos de CPM fueron lavadas con PBS frío y lisadas directamente en la placa (tampón de lisis: PBS, EDTA 2 mM, Nonidet NP-40 10%, NEM 200 mM, PMSF 100 mM, β -glicerofosfato 200 mM, orto-vanadato 200 mM, fluoruro de sodio 200 mM). El lisado fue centrifugado para eliminar el material insoluble (12.000 rpm, 5 min, 4 °C) y se midió el contenido de proteínas en el sobrenadante (Bio-Rad). Cantidades equivalentes de proteína fueron separadas en gel de poliacrilamida 8% con SDS, en condiciones reductoras. Los geles fueron electrotransferidos a membranas de PVDF, y éstas utilizadas para la inmunodetección de IL-6R, LIFR y gp130. Los sitios de unión inespecífica en la membrana fueron bloqueados por incubación en TBS-Tween con 5% de leche descremada (2 horas, temperatura ambiente, con agitación). Posteriormente la membrana fue lavada con TBS-Tween dos veces y luego incubada en la misma solución de bloqueo suplementada con los anticuerpos contra IL-6R, LIFR o gp130 (diluciones 1/1000, 12 horas, 4 °C, con agitación). Los sitios de unión del

anticuerpo en la membrana fueron revelados utilizando el sistema quimioluminiscente ECL (Amersham. Pharmacia)

13.- EFECTOS DE CITOQUINAS DE LA FAMILIA IL-6 SOBRE PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE CPM.

La capacidad de IL-6 y LIF para regular la proliferación y diferenciación de CPM fue evaluada en cultivos suplementados con estas citoquinas, y los efectos analizados por:

13.a. Ensayos de proliferación en presencia de IL-6, LIF y/o cadenas solubles de receptores:

Para los ensayos de proliferación se sembraron CPM a baja densidad (2.500 células/pozo), se incubaron en medio completo durante 3 horas para permitir su adhesión y luego se cambio el medio por α -MEM + 0,1% BSA o SFB suplementado por las citoquinas y/o cadenas solubles de receptores. Como controles se utilizaron células incubadas en medio completo, α -MEM 0,1% BSA sin suplementación de citoquinas. Duplicados de cada condición fueron utilizados para el recuento diario de células como se especifica en 2d.

13.b. Ensayos de diferenciación en presencia de IL-6, LIF y/o cadenas solubles de receptores:

Los ensayos de diferenciación se iniciaron con cultivos confluentes de CPM, según se ha descrito (Métodos 8). Para evaluar el efecto de citoquinas sobre la diferenciación osteogénica o adipogénica, IL-6 y LIF, solos o en las respectivas combinaciones con las cadenas de receptores solubles sIL-6R, sLIFR o sgp130, fueron adicionadas al medio de cultivo o a los medios de diferenciación, y se evaluó la expresión de los marcadores de diferenciación hasta los 15 días de exposición. Para la diferenciación osteogénica se evaluó la actividad fosfatasa alcalina y la mineralización de matriz por tinción de von Kossa, y para la diferenciación osteogénica se evaluó la acumulación de gotas de lípidos por visualización directa o tinción Oil red O (Métodos 8). Como controles positivos se utilizaron cultivos de CPM inducidos a diferenciarse a adipocitos u osteoblastos. En cada caso se realizó el recuento de células para cada medición, según se ha descrito en 2.d.

13.c. Inhibición de la actividad biológica de IL-6/sIL-6R.

Para evaluar la especificidad de los efectos observados por IL-6/sIL-6R, se realizaron los ensayos de diferenciación descritos en 13.a. en presencia de moléculas con capacidad de inhibir la actividad del complejo IL-6/sIL-6R. Las moléculas utilizadas fueron anticuerpos monoclonales dirigidos contra sIL-6R o gp130, y sgp130. Para los ensayos, los cultivos fueron suplementados con IL-6, sola o en conjunto con sIL-6R, más una de las moléculas inhibitorias: Este

medio fue cambiado cada dos días por medio fresco preparado de la misma forma. A distintos tiempos se evaluó la actividad fosfatasa alcalina como expresión de diferenciación osteogénica.

13.d. Activación de gp130 por el complejo IL-6/sIL-6R.

La activación de gp130 de membrana por IL-6 gatilla intracelularmente vías de transducción de señales. La activación de la vía JAK-STAT, particularmente fosforilación de stat-3, fue evaluada por western blot luego de la exposición de CPM al medio de estimulación osteogénica e IL-6. Para ello CPM mantenidas en medio de estimulación osteogénica fueron estimuladas con IL-6 sola o en presencia de sIL-6R durante 10 minutos, lavadas rápidamente con PBS frío dos veces y lisadas directamente en la placa. La presencia de stat-3 fosforilado fue evaluada por western blot según descripción en Métodos 12.b.

RESULTADOS

1.- CULTIVOS DE CÉLULAS PROGENITORAS MESENQUIMÁTICAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL HUMANA (CPM-SCU):

A pesar que la SCU es una fuente exquisita de progenitores hematopoyéticos que circulan en busca de su localización y residencia definitiva en la MO, la presencia de CPM a este nivel no había sido demostrada al iniciar este trabajo de tesis.

1.1.- ¿Existen CPM en la SCU humana?

Para evaluar la presencia de CPM, se iniciaron cultivos con CMN de muestras de SCU (n=82), bajo las condiciones de cultivo habituales de CPM (Conget y Minguell, 1999). Las poblaciones de células adherentes resultantes en estos cultivos fueron utilizadas para realizar los estudios de caracterización.

a) Caracterización morfológica:

Las CMN de SCU fueron cultivadas en medio suplementado sólo con SFB 20%, y la aparición de células adherentes fue monitoreada diariamente. En el 95% de las muestras se obtuvo células adherentes. De estos cultivos, en el 70% se obtuvo células adherentes con características morfológicas de osteoclastos o sus precursores (CPO) (Figura 4A). En el 30% de los cultivos restantes se obtuvo colonias o focos de células con morfología fibroblastoide

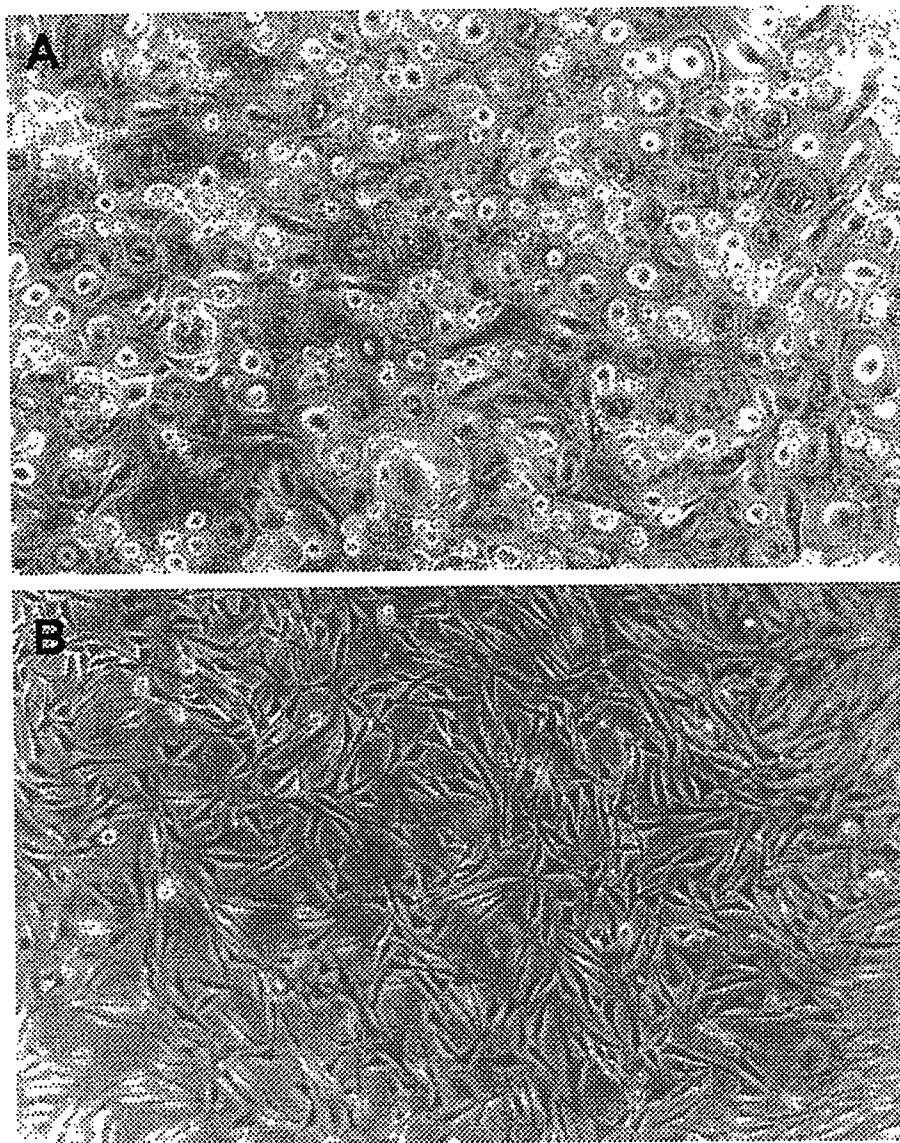


FIGURA 4: Cultivos de CPO y CPM obtenidas de SCU humanas.

Cultivos de CMN obtenidas de SCU generaron células adherentes con características morfológicas de precursores osteoclásticos (CPO) (A) o células progenitoras mesenquimáticas (CPM) (B). Aumento 40X.

(CPM), las cuales proliferaron hasta alcanzar una confluencia homogénea (Figura 4B).

Las CPO aparecen tempranamente en los cultivos (5-7 días), observándose una transición desde formas celulares alargadas (fibroblastos bipolares) a formas ovoides-redondeadas (25-30 días). No se observa un incremento numérico significativo de la población de estas células, sino más bien se produce un crecimiento del tamaño celular acompañado de la fusión de ellas. De esta forma se generan grandes células multinucleadas, de bordes irregulares que no proliferan (Figura 5A). Estas células son resistentes a la tripsinización y a la liberación con EDTA, y no pueden ser subcultivadas exitosamente. Estas características, similares a las de progenitores osteoclasticos, fueron confirmadas por la expresión de marcadores linaje específicos (fosfatasa ácida tartrato resistente TRAP⁺, CD45⁺⁺/CD14^{+/-}, CD51/CD61⁺) y la ausencia del antígeno CD64 (Figura 5B). Estas células no expresan marcadores del linaje mesenquimático como el antígeno SH2 (Figura 5B).

Por otro lado, las CPM, aparecen como pequeñas colonias de 10-15 células a partir de los 15 días de iniciado el cultivo. Proliferan hasta formar una monocapa homogénea (20-30 días), para lo cual presentan como único requerimiento la suplementación con SFB y pueden ser fácilmente subcultivadas y criopreservadas. En estas células se estudiaron las siguientes características:

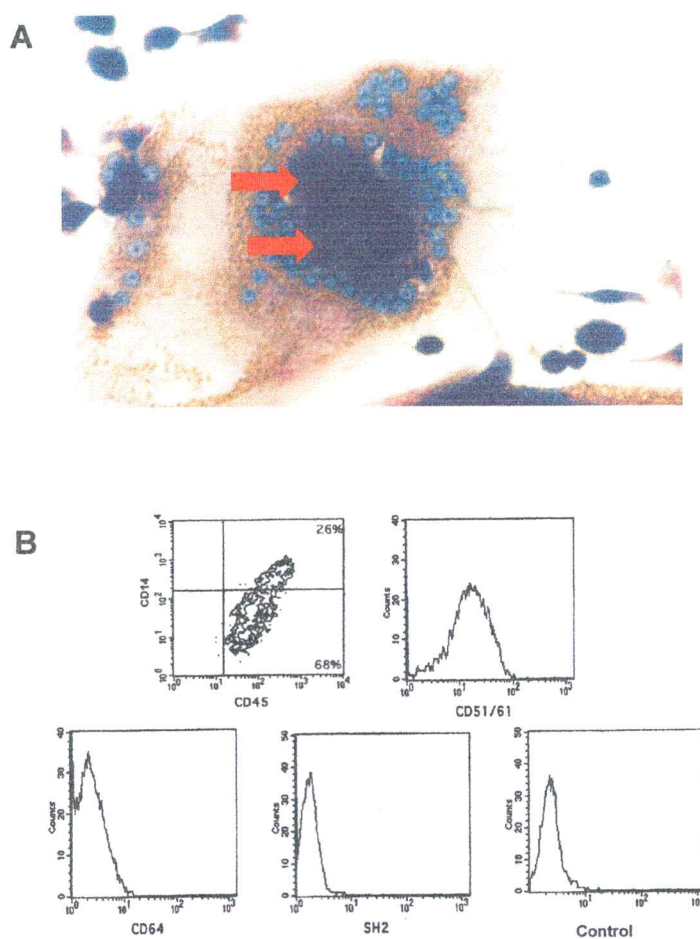


FIGURA 5: Caracterización de CPO.

Las CPO se caracterizan por ser células de gran tamaño, con bordes irregulares, multinucleadas y presentar actividad fosfatasa ácido tarttrato resistente (A, la actividad enzimática corresponde a zona azul-negro, flecha). Estas células expresan los marcadores CD14, CD45, CD51/61 y son negativas para CD64 y el antígeno SH2 (B).

b) Proliferación y estado del ciclo celular:

Los subcultivos de estas células proliferan con un tiempo de duplicación poblacional de 40-48 horas (Figura 6A). El análisis de ciclo celular de estos subcultivos muestra que el 85% de estas células se encuentran en fase G0/G1 (Figura 6B), y al disociar metodológicamente las células en G0 (tinción con naranja de acridina), se pudo determinar que aproximadamente el 5% estaría en estado quiescente G0 (Figura 6C).

c) Selección de células quiescentes:

Utilizando el análogo de base 5-FU, es posible seleccionar células que se encuentran en fase G0 de aquellas en fases activas del ciclo celular. Dado que este análogo se incorpora sólo a células en las fases del ciclo celular, se produce la muerte de éstas al finalizar la exposición al 5-FU. Los resultados muestran que antes de la exposición a 5-FU, los cultivos de CPM-SCU contienen 5-10% de células quiescentes G0, las que presentan un contenido de DNA diploide y bajo contenido de RNA. Luego de la incubación con 5-FU, un 90-95% de la población celular resultante tiene estas características (Figura 6D).

d) Inmunotipificación:

El estudio inmunofenotípico en CPM-SCU reveló expresión de antígenos típicos de células mesenquimáticas, como aquellos de la familia SH (SH2, SH3,

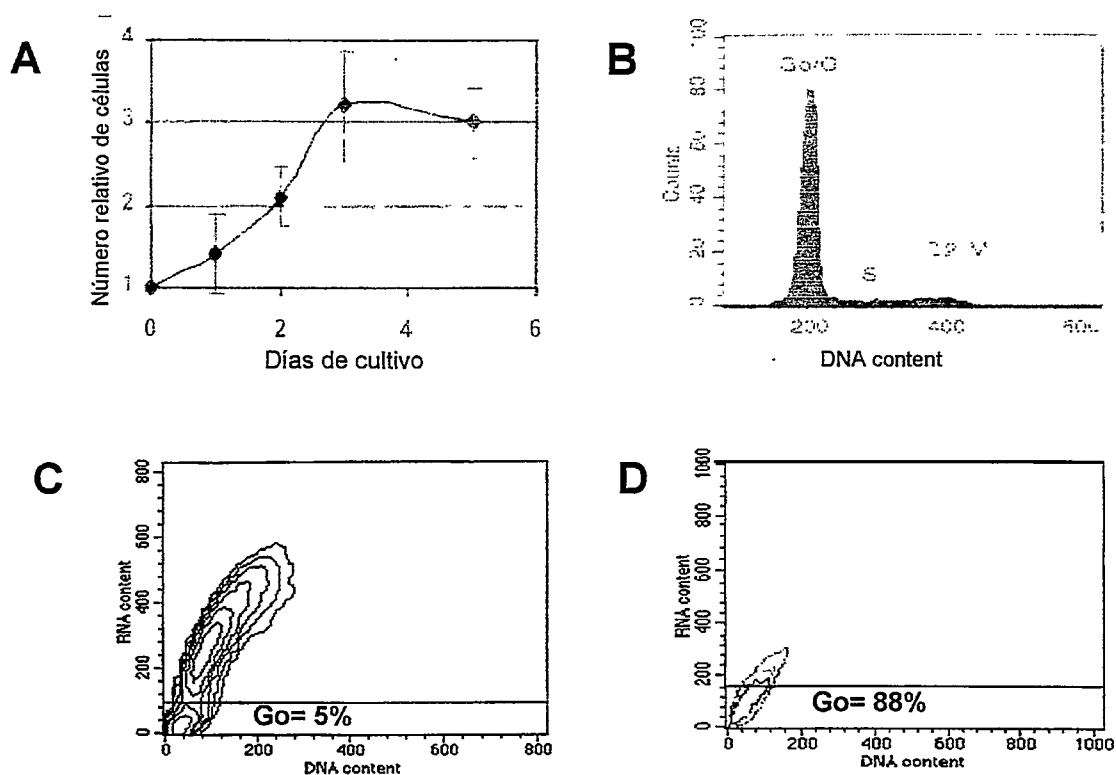


FIGURA 6: Proliferación y distribución en etapas del ciclo celular de cultivos de CPM-SCU.

Los cultivos de CPM-SCU presentan una cinética de proliferación con un tiempo de duplicación poblacional de 48 horas (A). La población de células se encuentra mayoritariamente de las fases G₀/G₁ del ciclo celular (B). La población de células quiescentes G₀ alcanza a un 5% en los cultivos de CPM (C) y puede ser enriquecida hasta con un 90-95% de pureza luego de la selección con 5-FU (D).

SH4), ASMA (α -sma) y MAB1470 (Figura 7). Además estas células expresan los antígenos CD13, CD29, CD49e, CD54, CD90, CD117, fibronectina, laminina y colágenos I y VI (Tabla 3). Estas células no expresan los antígenos hematopoyéticos CD14, CD34 y CD45, endoteliales CD31 y factor von Willebrand, ni CD49d, CD106 y HLA-DR (Figura 7 y Tabla 3).

e) Caracterización citoquímica:

Las CPM-SCU expresan los marcadores citoquímicos α -naftil acetato esterasa no específica y ácido periódico-Schiff, y no fosfatasa ácida, fosfatasa ácida tartrato-resistente, fosfatasa alcalina, sudan black B y naftol AS-D cloroacetato esterasa (Tabla 4). Considerando que al inicio los cultivos de CPO presentan células con morfología fibroblastoide, la expresión de estos marcadores permitió diferenciar CPO y CPM-SCU.

f) Marcadores moleculares y potencial de diferenciación:

Las CPM-SCU expresan débilmente marcadores de compromiso hacia linajes osteogénico (cbfa1 y osteocalcina) y adipogénico (ppar- γ y leptina) (Figura 8), según análisis por RT-PCR, pero no presentan características fenotípicas de los linajes mesenquimáticos maduros (Figura 9A). Sin embargo, cuando son cultivadas en condiciones que inducen la diferenciación osteogénica se observa que estas células sufren un cambio morfológico y adquirieron una forma cuboidal (2-3 días). Conjuntamente, se induce de una

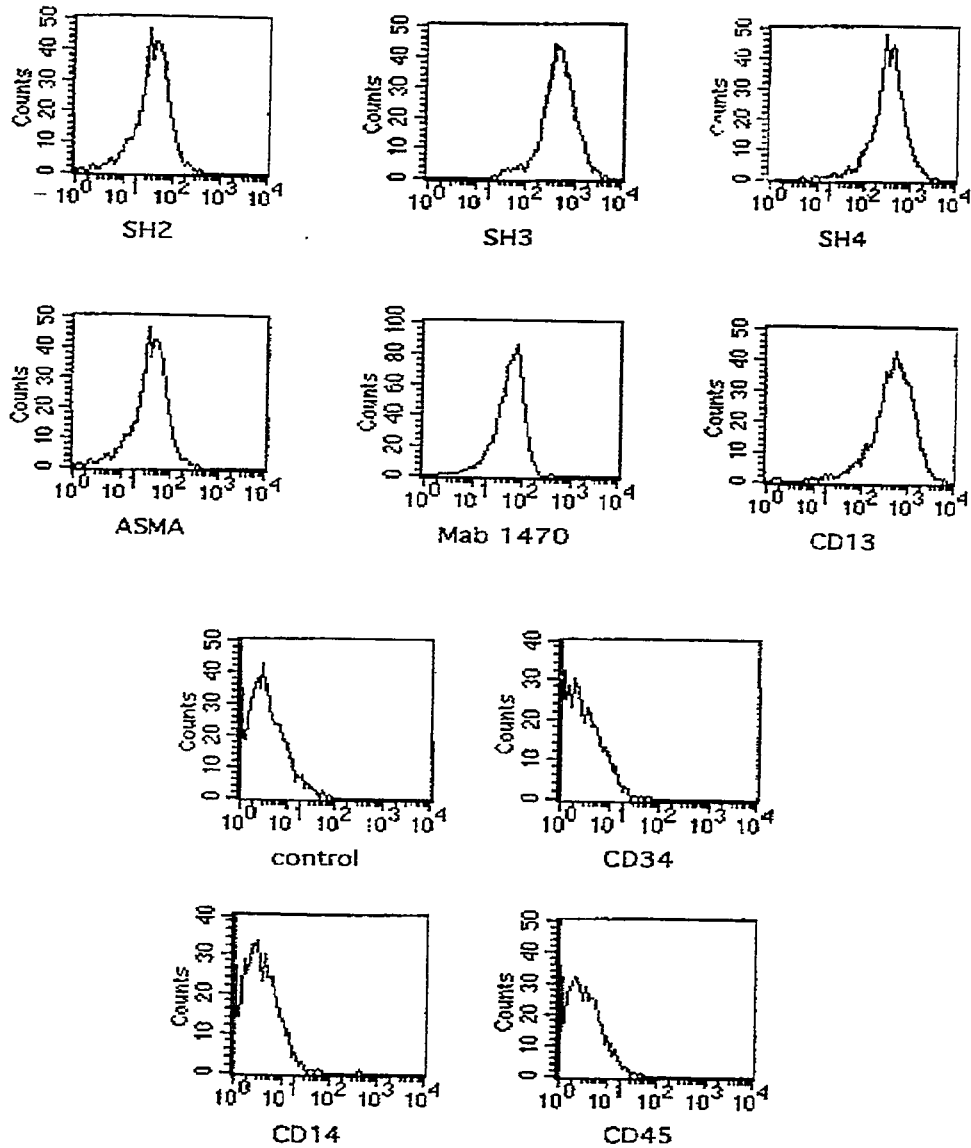


FIGURA 7: Caracterización inmunofenotípica de CPM-SCU.

CPM-SCU fueron marcadas con anticuerpos monoclonales y luego analizadas por citometría de flujo. Las CPM-SCU expresan marcadores del linaje mesenquimático y no expresan marcadores de progenitores hematopoyéticos. Los histogramas muestran el número relativo de células (counts) versus la intensidad media de fluorescencia (IMF).

TABLA 3: Inmunofenotipo de CPM-SCU

La caracterización inmunofenotípica se realizó por inmunofluorescencia a través de citometría de flujo y/o microscopía de epifluorescencia. (+/-: expresado por una fracción de la población).

INMUNOFENOTIPO DE CPM- SCU	
Antígenos	
Mesenquimáticos:	
SH2, SH3, SH4	+
ASMA	+
MAB1470	+
Hematopoyéticos:	
CD14	-
CD34	-
CD45	-
Moléculas de adhesión:	
α 4	+/-
α 5	+
β 1	+
α v β 3	+/-
α v β 5	+/-
Moléculas de matriz extracelular:	
Colágeno I	+
Colágeno VI	+
Fibronectina	+
Laminina	+
Endoteliales:	
CD31	-
vWF	+/-
Otros:	
CD13	+
CD126 (IL-6R)	-
CD130 (gp130)	+
HLA-DR	-

TABLA 4: Caracterización citoquímica de células adherentes en cultivos de SCU.

Cultivos de células adherentes derivadas de SCU conteniendo CPO o CPM fueron teñidas *in situ* para: TRAP: fosfatasa ácida tartrato-resistente; FA: fosfatasa ácida; NSE: α -naftil acetato esterasa (esterasa no específica); PAS: ácido peryódico-Schiff; SBB: sudan Black B; Falc: fosfatasa alcalina; SE: naftol AS-D cloroacetato esterasa (esterasa específica).

Tipo Celular	TRAP	FA	NSE	PAS	SBB	Falc	SE
CPO	+	+	+	-	-	-	-
CPM	-	-	+	+	-	-	-

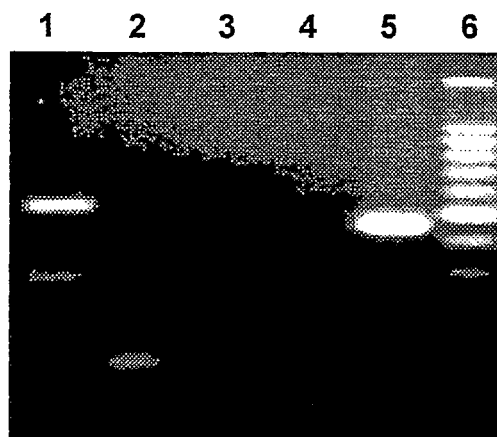


FIGURA 8: Expresión de marcadores moleculares de diferenciación en cultivos de CPM-SCU.

La expresión de marcadores moleculares de diferenciación a los linajes osteo y adipogénico fue analizada por RT-PCR y los amplificados obtenidos como producto de la reacción fueron analizados en geles de agarosa. Las CPM-SCU expresan los marcadores osteogénicos *cbfa1* (1) y *osteocalcina* (2) y débilmente los marcadores adipogénicos *ppar- γ* (3) y *leptina* (4). La expresión de *GAPDH* (5) fue utilizada como control y la identificación de los amplificados se realizó con respecto a la migración de los marcadores de tamaño molecular (6).

manera tiempo dependiente la expresión de marcadores del linaje osteogénico; entre los 4-7 días la inducción de fosfatasa alcalina (marcador temprano), (Figura 9B) y sobre los 15 días se observa el depósito de una matriz mineralizada de fosfato de calcio (marcador tardío, tinción de von Kossa) (Figura 9C). De manera similar, cuando las células son expuestas a un estímulo adipogénico (≥ 7 días), éstas se diferencian a adipocitos, con la consiguiente acumulación intracelular gradual de gotas de lípidos que pueden ser visualizados directamente al microscopio o después de tinción con Oil red O, (Figura 9D).

El conjunto de estos resultados muestra que la SCU contiene células adherentes con las mismas propiedades y características descritas para CPM de MO. Por lo tanto, la denominación utilizada de CPM-SCU, es correcta.

1.2.- ¿Están las CPM en la SCU presentes durante todas las etapas de la gestación?

La composición celular de la SCU humana es variable durante la vida intrauterina. Entre otras variaciones es sabido que el contenido total de células progenitoras hematopoyéticas CD34+, varía con el curso de la gestación, disminuyendo al aumentar la edad gestacional (Shields y Andrews, 1998).

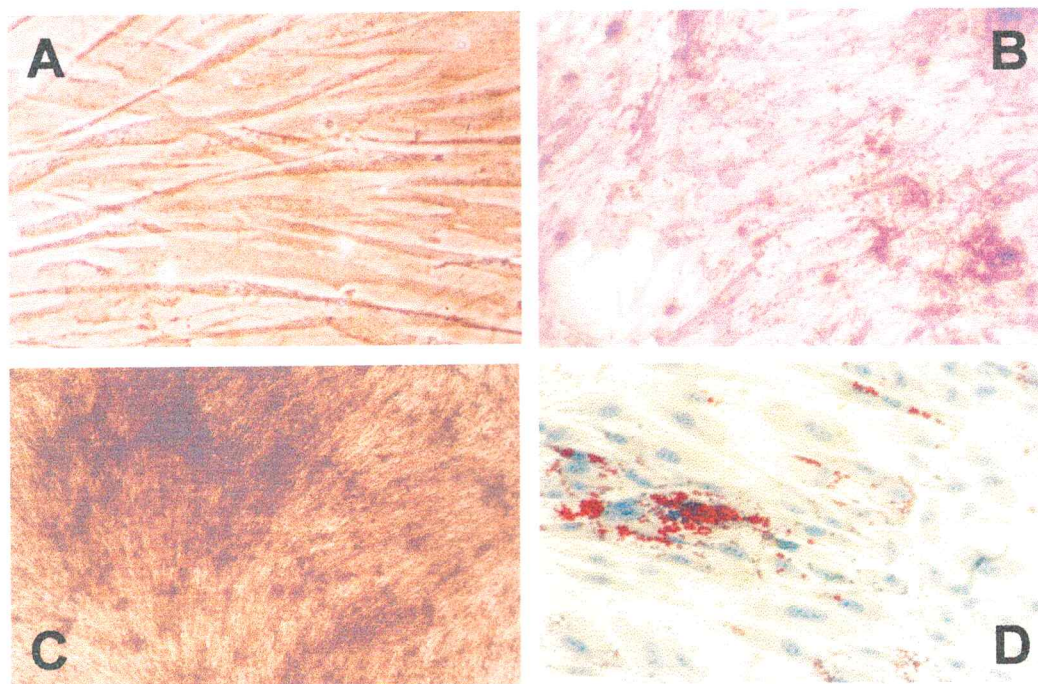


FIGURA 9: Diferenciación terminal de los linajes osteo o adipogénico en cultivos de CPM-SCU.

Cultivos de CPM-SCU (A) fueron expuestos a los estímulos de diferenciación osteogénico y adipogénico. Los procesos de diferenciación fueron monitoreados periódicamente. Luego de 7 días de estimulación osteogénica se evaluó la actividad de fosfatasa alcalina (B) la cual resulta expresada en todas las células del cultivo. Luego de 15 días la diferenciación terminal en condiciones osteogénicas se caracteriza por el depósito de una matriz mineralizada visualizada por tinción von Kossa (C). En condiciones adipogénicas, la aparición y acumulación citoplasmática de gotas de lípidos representa la etapa de maduración en esta vía de diferenciación. Éstas pueden ser mejor visualizadas con Oil red O (D). En las CPM-SCU no estimuladas no se observa ninguno de estos marcadores.

Esta característica generó la interrogante sobre la constancia del contenido de CPM en SCU durante el último trimestre de gestación. Por razones de acceso a muestras de SCU, sólo se recolectaron muestras (n=82) de partos ocurridos entre las 28 y 42 semanas de gestación. Para cada muestra obtenida se realizó recuento diferencial de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, se determinó el contenido de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+/CD38+ y CD34+/CD38-) y se evaluó la aparición de CPM en cultivo. Las características celulares de las distintas muestras de SCU son resumidas en la (Tabla 5). Las muestras de término (≥ 37 semanas) tienen mayor celularidad, hematocrito y porcentaje de células mononucleares, aunque una menor cantidad de progenitores hematopoyéticos CD34+. Al evaluar la aparición de CPM se observó que esta correspondía mayoritariamente a muestras de SCU provenientes de embarazos con edad estacional menor a 37 semanas (70%). Así, tanto el contenido de CPM como de progenitores hematopoyéticos parecen estar relacionados con la edad gestacional.

1.3. Transducción adenoviral de CPM-SCU.

Las CPM de MO han sido consideradas como atractivos blancos celulares para protocolos de terapia génica. Para evaluar si CPM-SCU también pueden ser modificadas genéticamente, se evaluó la posibilidad de transducir

TABLA 5: Características de las muestras de SCU utilizadas en cultivos.

Algunos parámetros analizados en las muestras de SCU pueden ser correlacionados con el tipo de cultivo, CPM o CPO, originado a partir de la muestra.

Características de SCU	Tipo de cultivo originado (nº muestras que originaron cada cultivo)	
	CPM	CPO
Edad gestacional (semanas)	15	7
28 - 36 (n=22)	6	54
37 - 41 (n=60)		
Contenido CD34+ (%)		
< 0,5	3	45
≥ 0,5	15	19

estas células con un vector adenoviral. Esta alternativa fue considerada en base a que las CPM-SCU expresan las integrina $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ (Tabla 3) reconocidas por vectores adenovirales para la unión y posterior internación de partículas virales a la célula. Para los estudios de transducción de CPM-SCU, se utilizó el vector Ad5CMVGFP, que codifica para proteína fluorescente verde (GFP).

Las CPM-SCU son eficientemente transducidas por el vector, sin observarse efectos sobre la viabilidad celular, ni en características morfológicas a la dosis de infección utilizada. Luego de 24 horas de transcurrida la infección, la expresión del gen reportero permite observar una abundante y homogénea distribución citoplasmática de GFP (Figura 10A). El análisis por citometría de flujo muestra que un 15-25% de las CPM, fueron transducidas por el vector adenoviral (Figura 10B).

1.4.- ¿Son equivalentes las CPM de MO y SCU?

En forma previa y/o paralela a los estudios con CPM-SCU, se realizaron cultivos de CPM de MO (CPM-MO) para evaluar similitudes o diferencias entre ambas poblaciones celulares. Las características de las CPM-MO han sido reportadas en la literatura y complementadas por el trabajo de nuestro laboratorio, por lo cual los estudios realizados tenían como único objetivo

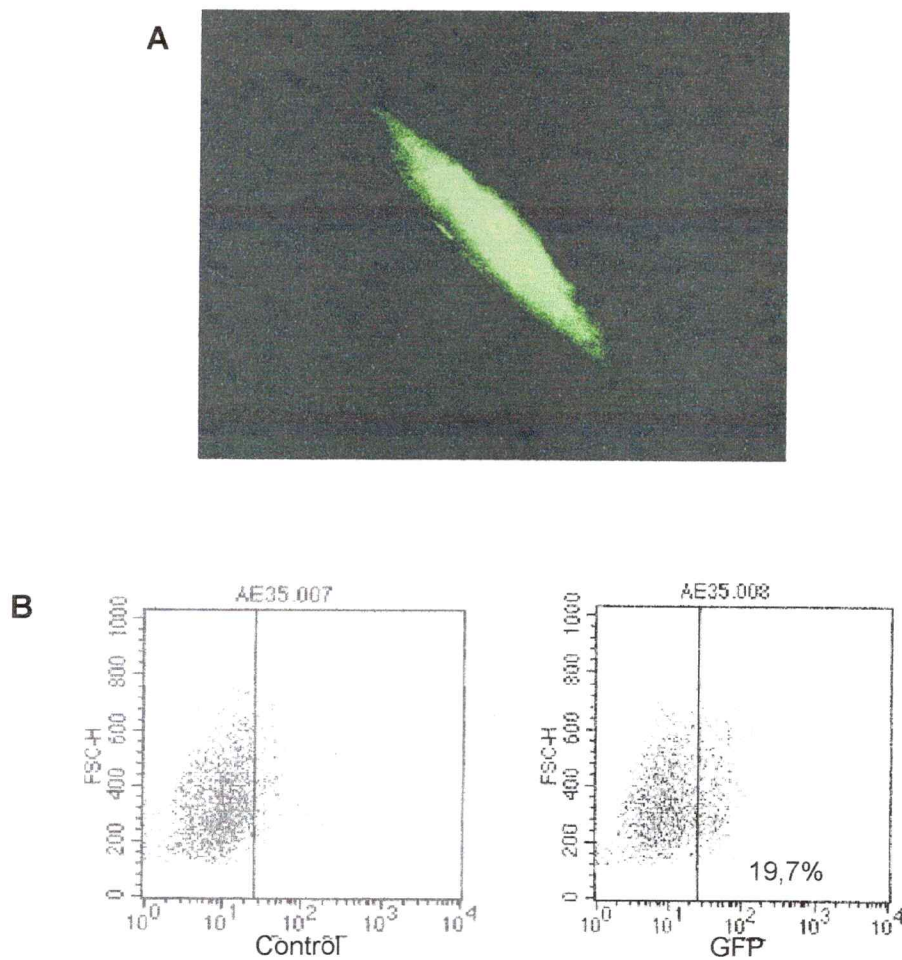


FIGURA 10: Transducción adenoviral de CPM-SCU.

CPM-SCU fueron transducidas con el vector Ad5CMVGFP. La expresión del transgen GFP fue analizada 48 horas luego de la infección. La detección de células expresando GFP fue analizada por microscopía de fluorescencia (A) o citometría de flujo (B).

comprobar que las CPM-MO y CPM-SCU corresponden a un mismo fenotipo celular.

Morfológicamente las CPM-MO y CPM-SCU son indistinguibles, y ambas presentan perfiles similares de expresión de marcadores mesenquimáticos (SH, ASMA, Mab1470), y de otros antígenos intracelulares y de membrana. Al igual que las CPM-SCU, las CPM-MO expresan marcadores moleculares de linaje osteogénico y adipogénico, y se diferencian in vitro a estos tipos celulares cuando son estimuladas apropiadamente. Una comparación resumida de las características más relevantes de ambas poblaciones celulares es mostrada en la Tabla 6.

La expresión de otros marcadores de linaje como condrogénico o miogénico, no fue analizada. Sin embargo, tanto CPM-SCU y CPM-MO producen señales que sustentan la proliferación y diferenciación de colonias granulocito-macrófago en ensayos de colonias CFU-GM. Como se observa en la Tabla 7, el número de colonias obtenidas con medios de cultivo provenientes de CPM-SCU y CPM-MO es similar, y muy superior al control sin suplementación de GM-CSF. O suplementado con medio condicionado por células 3T3.

El conjunto de estas observaciones muestra que tanto SCU como MO adulta, contienen CPM con características equivalentes.

TABLA 6: Análisis comparativo de características de CPM-SCU y CPM-MO.

Característica	CPM-SCU	CPM-MO
Morfología	Fibroblastoide	Fibroblastoide
Imunofenotipo		
Positivo	SH2, SH3, SH4 ASMA, Mab1470	SH2, SH3, SH4 ASMA, Mab1470
Negativo	CD14, CD34, CD45	CD14, CD34, CD45
Proliferación (tiempo de duplicación)	35 - 40 horas	30 - 35 horas
Células quiescentes G0 (% G0)	5 - 10	10 - 20
Marcadores moleculares de diferenciación	cbfa-1, ppar- γ osteocalcina leptina	cbfa-1, ppar- γ osteocalcina leptina
Potencial de diferenciación (estudiado <i>in vitro</i>)	osteogénico adipogénico	osteogénico adipogénico condrogénico
Transducción con adenovirus	SI	SI

TABLA 7: Ensayo de unidades formadoras de colonias.

La capacidad de CPM-SCU para sustentar hematopoyesis *in vitro* fue evaluada por un ensayo de formación de unidades de colonias. 10.000 células CD34+ aisladas por selección negativa fueron sembradas en medio semisólido suplementado con sobrenadantes de cultivos de CPM-SCU, sobrenadantes de cultivos de células 3T3, GM-CSF recombinante humano o medio solo. Luego de 10 días se contaron las colonias generadas en cada condición. Los resultados corresponden a un ensayo realizado con 3 muestras de CPM-SCU analizadas en duplicado.

Cultivo suplementado con	Número de colonias/10.000 CD34+
Medio solo (control negativo)	4 ± 1
Medio condicionado CPM-SCU	45 ± 7
Medio condicionado 3T3	5 ± 2
GM-CSF (10 UI/ml)	53 ± 6

2.- TRASPLANTABILIDAD DE CPM-SCU.

Utilizando un modelo de xenotrasplante humano-murino se evaluó la capacidad de las CPM-SCU de movilizarse a través del sistema circulatorio y reconocer y establecer residencia en sitios (tejidos u órganos) particulares.

Ratones inmunodeficientes jóvenes recibieron 5×10^5 CPM-SCU por inyección intravenosa, procedimiento que no representó riesgo para la sobrevivencia del animal. Luego de 6 meses los animales fueron sacrificados, se obtuvieron muestras de sangre, MO y se procuraron distintos órganos para evaluar la presencia de células humanas, tanto en cultivo de MO como en los órganos directamente, por amplificación de una secuencia humana específica por PCR (Figura 11).

2.1. Presencia de células humanas en MO de ratones trasplantados según estudios de generación de colonias secundarias.

La presencia de células humanas viables y funcionales en la MO de los ratones trasplantados con CPM-SCU fue evaluada en cultivos de colonias secundarias. Para esto se iniciaron cultivos a partir de MO obtenida de estos ratones ($n=3$). Las muestras fueron sembradas en placas de 24 pozos y diariamente se monitoreó la aparición de colonias de células adherentes. Luego de 15 días de cultivo se observó que en el 80% de los pozos (35/44) había una o más colonias de células adherentes con morfología fibroblastoide. Algunas de las colonias obtenidas proliferaron (11/44), alcanzando la confluencia (Figura

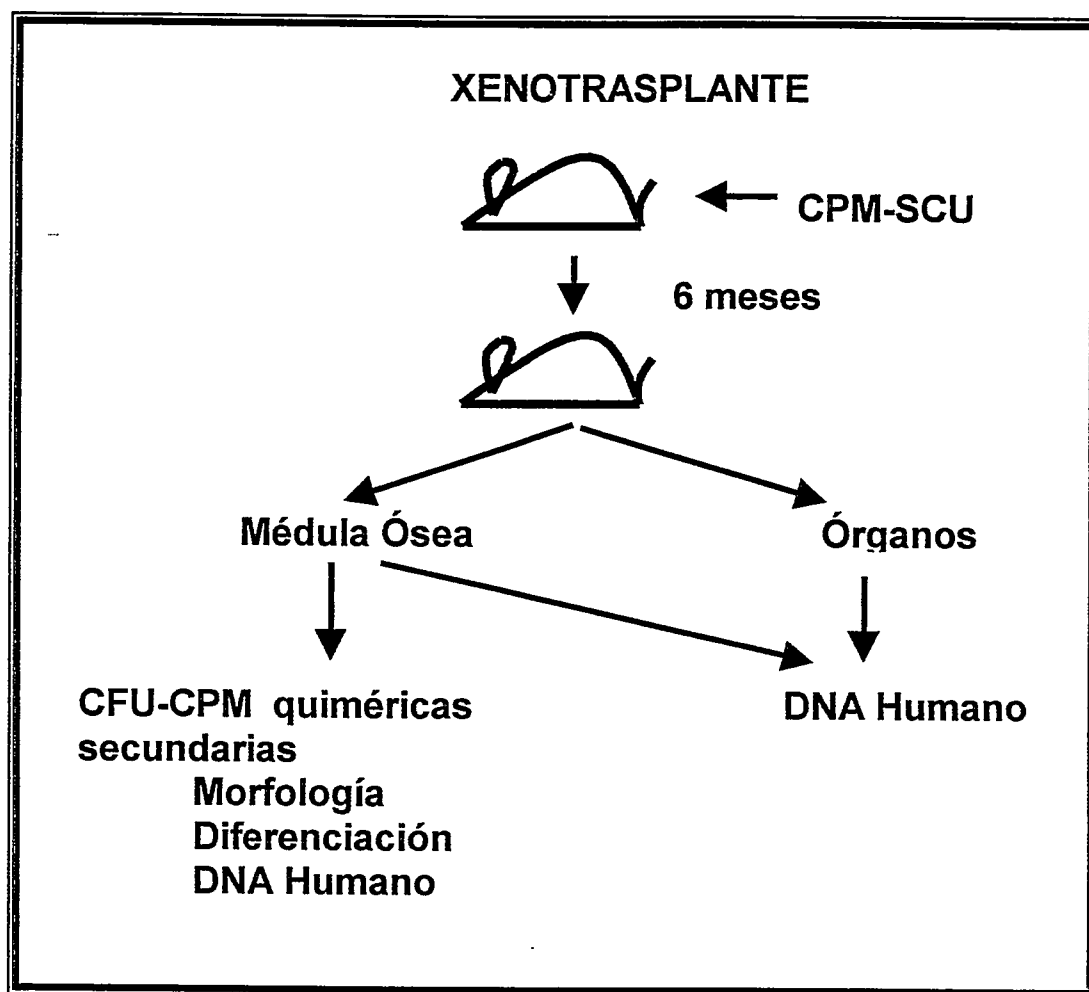


FIGURA 11: Modelo de xenotrasplante utilizando CPM-SCU.

CPM-SCU fueron trasplantadas a través de la infusión sistémica por inyección en la cola de ratones balb/c nude jóvenes (3 - 5 meses de edad). Luego de 6 meses, los animales fueron sacrificados y se obtuvo muestras de MO para realizar cultivos de colonias secundarias de CPM. Del mismo animal se obtuvieron muestras de distintos órganos y tejidos. Tanto las muestras de MO, las colonias generadas a partir de éstas y las muestras de tejido y órganos se utilizaron para investigar la presencia de células humanas a través de la amplificación de la secuencia especie específica del gen de β -globina a través de PCR.

12A). Estos cultivos pudieron ser subcultivados exitosamente y se utilizaron para:

a) ensayos de diferenciación osteogénica en colonias secundarias:

Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación osteogénica y se evaluó la inducción de la actividad fosfatasa alcalina como marcador de diferenciación. Aunque al inicio del ensayo los cultivos son positivos para la actividad de esta enzima, luego de 4 días de estimulación se observa un incremento tanto del número de células como de la actividad relativa en éstas (Figura 12 B y C)

b) búsqueda de células humanas a través de la amplificación de la secuencia del gen de β -globina humana:

DNA obtenido de estas células fue utilizado para amplificar la secuencia del gen de β -globina humana. De las muestras analizadas el 27% de las muestras provenientes de ratones trasplantados con CPM-SCU (3/11) amplificó la secuencia para el gen de β -globina humana (Figura 13). Es necesario considerar que la sensibilidad de nuestro sistema es 1/70000, lo que significa que en 3 muestras existiría más de una célula humana por cada 70000 en cultivo.

Como control de estos cultivos se utilizaron muestras de MO de ratones que no fueron trasplantados con CPM-SCU (n=2). Las muestras fueron procesadas de la misma forma, obteniéndose resultados similares en cuanto a

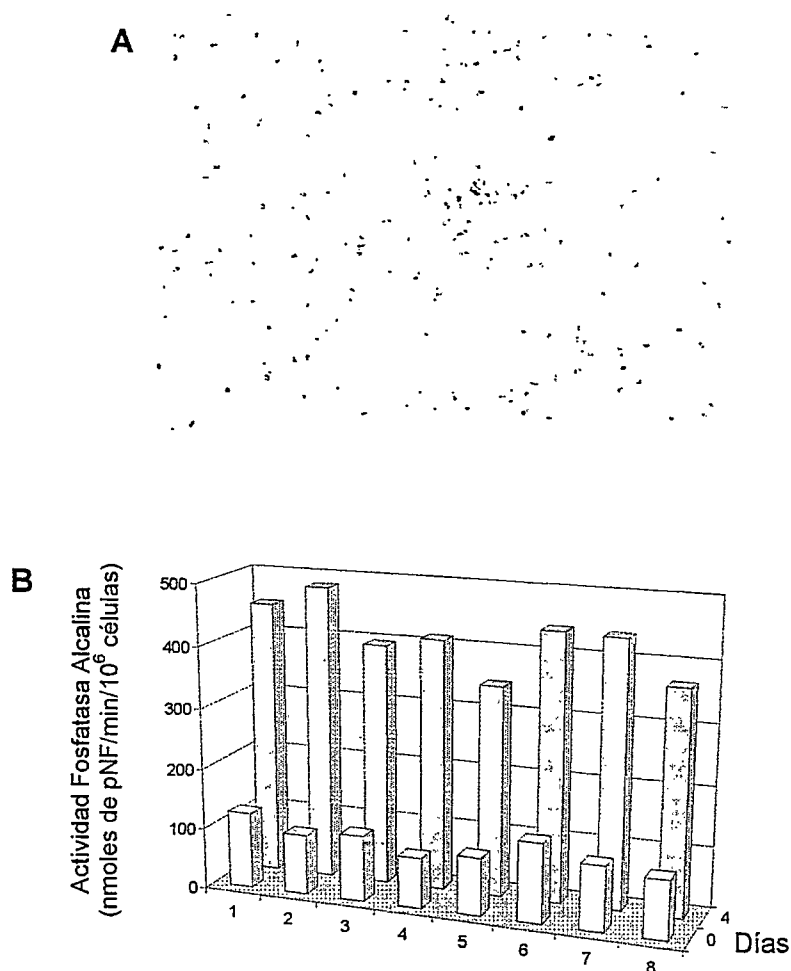


FIGURA 12: Diferenciación osteogénica de colonias secundarias derivadas de MO de ratones trasplantados con CPM-SCU.

A partir de MO de ratones trasplantados con CPM-SCU se obtuvo colonias secundarias de células adherentes (A). Estas células presentaban características morfológicas de CPM, proliferaron hasta alcanzar la confluencia y pudieron ser expandidas. Para evaluar el potencial de diferenciación de estas células, se midió la respuesta al estímulo osteogénico. En condiciones basales, estas células presentaron una actividad fosfatasa alcalina mínima (8 muestras: 1 - 8). Sin embargo, al ser expuestas al estímulo osteogénico durante 4 días se produjo un incremento de esta actividad enzimática (B). Los valores de actividad enzimática fueron obtenidos de un experimento realizado en triplicado para cada muestra, con una desviación estándar menor al 5%.

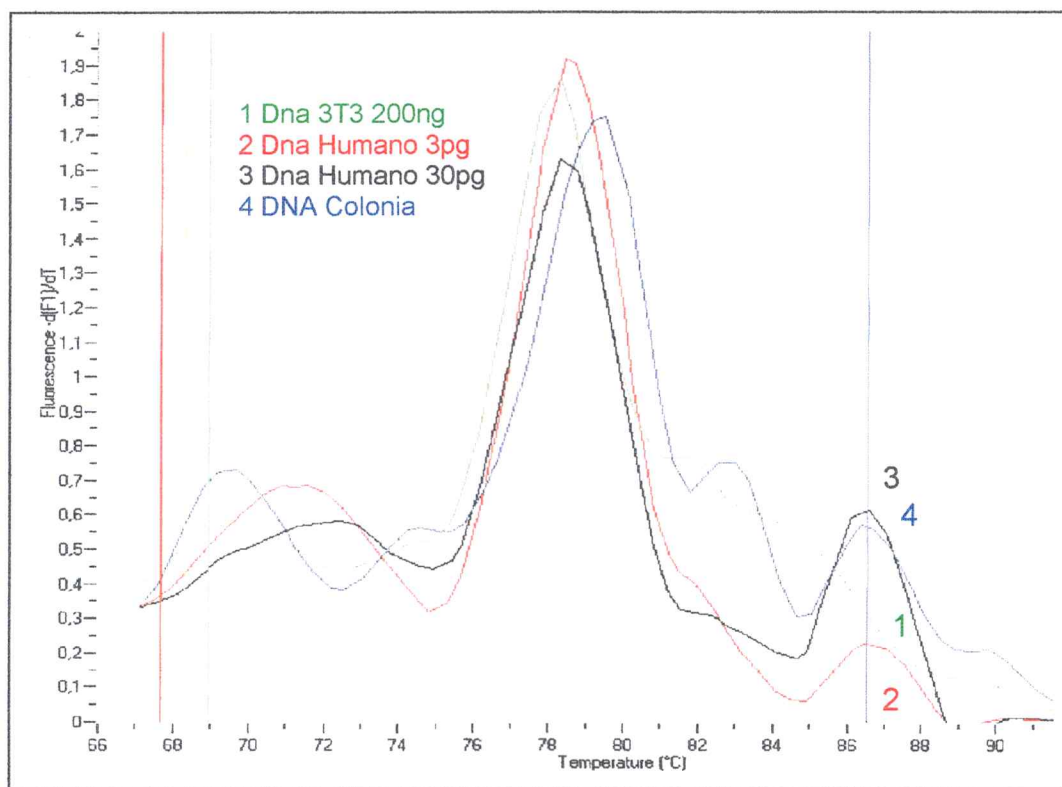


FIGURA 13: Detección de células humanas en colonias secundarias generadas a partir de MO de ratones trasplantados con CPM-SCU.

DNA extraído de colonias secundarias generadas a partir de MO de ratones trasplantados con CPM-SCU fue utilizado como muestra para amplificar el gen β -globina humano ($n=11$). En el 27% de las muestras (3/11) se obtuvo el amplificado correspondiente al gen analizado. Cada muestra fue analizada en al menos dos experimentos separados.

las características morfológicas, proliferación y diferenciación osteogénica de las células en estos cultivos. DNA de estas células también fue utilizado para el análisis de la secuencia del gen de β -globina humana sin encontrarse amplificación de la secuencia humana en ninguna de ellas (0/8).

Esta observación muestra que la MO de ratones trasplantados es una quimera de células humanas y murinas, por cuanto existe una población de células humanas viables y funcionales luego de 6 meses de realizado el trasplante. Esto sugiere que las CPM-SCU trasplantadas se han localizado en la MO murina, logrando establecer una residencia permanente en este tejido.

2.2. Presencia de células humanas en tejidos de ratones trasplantados con CPM-SCU.

Al momento del sacrificio de los ratones trasplantados con CPM-SCU, además de obtener MO, se procuraron los siguientes tejidos u órganos: sangre, bazo, hígado, corazón, pulmón, hueso, diente y cerebro. Muestras de DNA de cada uno de estos tejidos fueron utilizadas para analizar la presencia de células humanas a través del ensayo de amplificación de la secuencia del gen de β -globina humana.

De los tejidos analizados se obtuvo amplificación en: médula ósea, músculo cardíaco, diente, bazo y pulmón (Figura 14). No hubo amplificación en: sangre, hueso, cola, oreja, músculo esquelético, hígado, cerebro, riñón y gónadas. La Tabla 8 resume los resultados obtenidos de la

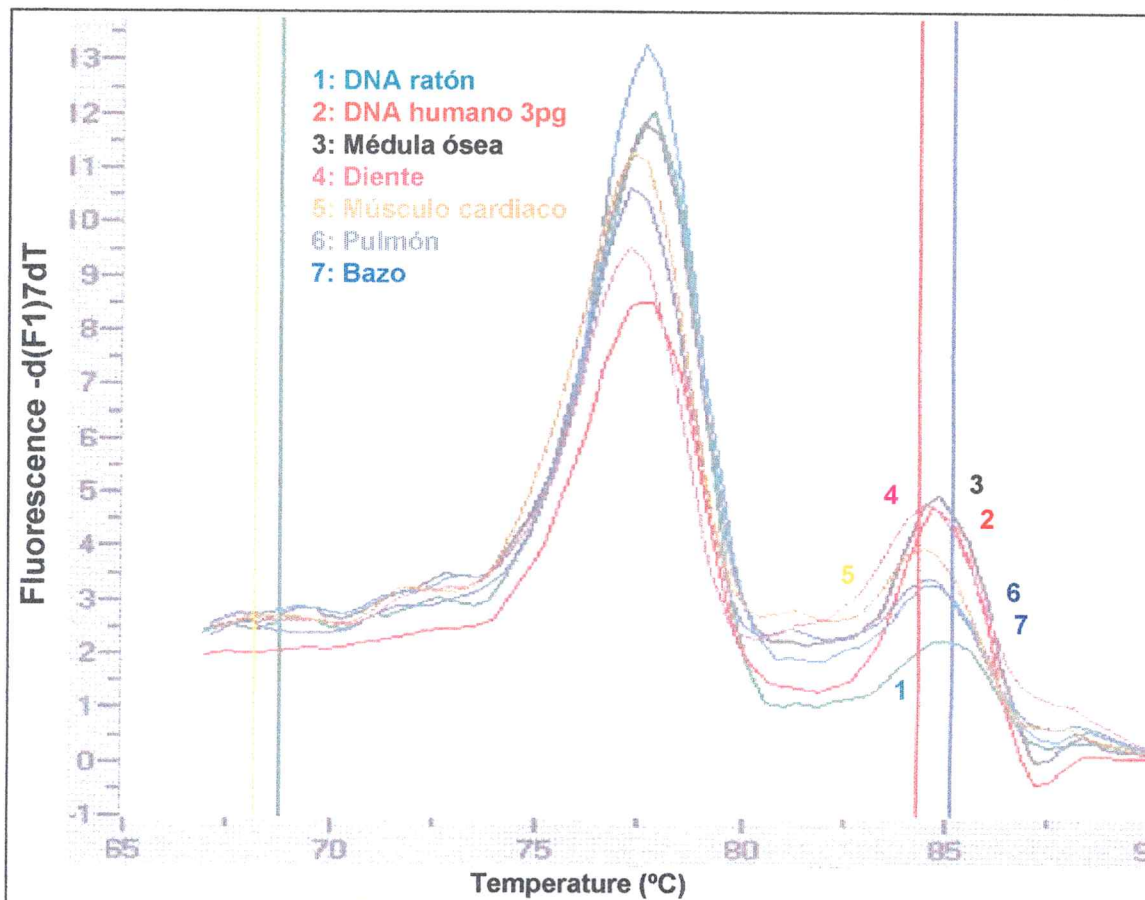


FIGURA 14: Detección de células humanas en órganos de ratones trasplantados con CPM-SCU.

DNA extraído de tejidos y órganos obtenidos de ratones trasplantados ($n=3$) con CPM-SCU fue utilizado para amplificar el gen β -globina humano. En la figura se muestra la amplificación obtenida con médula ósea, músculo cardiaco, diente, bazo y pulmón. Cada muestra fue analizada en al menos dos experimentos separados.

TABLA 8: Detección de células humanas en órganos de ratones trasplantados.

Órganos positivos	Organos negativos
Médula Ósea Músculo cardíaco Diente Bazo Pulmón	Sangre Hueso Cola Oreja Músculo esquelético Hígado Cerebro Riñón Gónadas

amplificación de la secuencia del gen de β -globina humana en los órganos de los ratones trasplantados.

Esta observación sugiere que células humanas derivadas de las CPM-SCU trasplantadas, que corresponderían a progenitores comprometidos con un determinado linaje, pueden reconocer y probablemente establecer residencia en algunos tejidos murinos.

El conjunto de los estudios presentados en 1 y 2 demuestra la SCU humana contiene CPM con propiedades y características equivalentes a las descritas para aquellas obtenidas a partir de la MO humana. En base a ello, ambas poblaciones celulares pueden ser utilizadas indistintamente para otros estudios en consideración a la disponibilidad de una u otra fuente celular. Esta situación tiene un precedente similar en uso de progenitores hematopoyéticos provenientes de SCU o MO.

3.- DEFINICIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN PUTATIVO MICROAMBIENTE MOLECULAR MESENQUIMÁTICO.

El estroma de la MO es un ambiente rico en señales solubles (citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas, etc) y no solubles (moléculas de adhesión, matriz extracelular) que pueden regular no solo la

diferenciación de células hematopoyéticas, sino que la de otras poblaciones celulares presentes, como las CPM (Orkin, 1995). Por lo tanto, la conformación de un microambiente mesenquimático, puede depender tanto de señales paracrinias provenientes de las células presentes en el entorno (estroma, endotelio, progenitores hematopoyéticos) como de señales autocrinas generadas por la misma CPM.

La información existente al inicio de este trabajo era escasa respecto a conocer el posible rol modulador de citoquinas y factores de crecimiento (presentes en el estroma de la MO), sobre la diferenciación de las CPM hacia los distintos linajes mesenquimáticos. Sin embargo, dada la existencia de antecedentes que sugerían la participación de citoquinas de la familia IL-6, específicamente IL-6 y LIF, en la maduración de precursores osteoblásticos derivados del tejido óseo (Bellido y col, 1997; Nishimura y col, 1998), los estudios se enfocaron en evaluar la capacidad regulatoria de estas citoquinas en la diferenciación de CPM.

3.1.- Producción de citoquinas de la familia IL-6 por CPM.

Para comprobar si CPM producen citoquinas de la familia IL-6, la expresión de RNA mensajeros para citoquinas y factores de crecimiento fue analizada a través de un ensayo múltiple de protección a ribonucleasa. Así se pudo determinar que las CPM expresan mensajeros de RNA para IL-6, LIF, OSM G-CSF, GM-CSF, M-CSF y SCF. (Figura 15). A través de ensayos de ELISA y utilizando medios de cultivos de CPM en condiciones confluentes, se

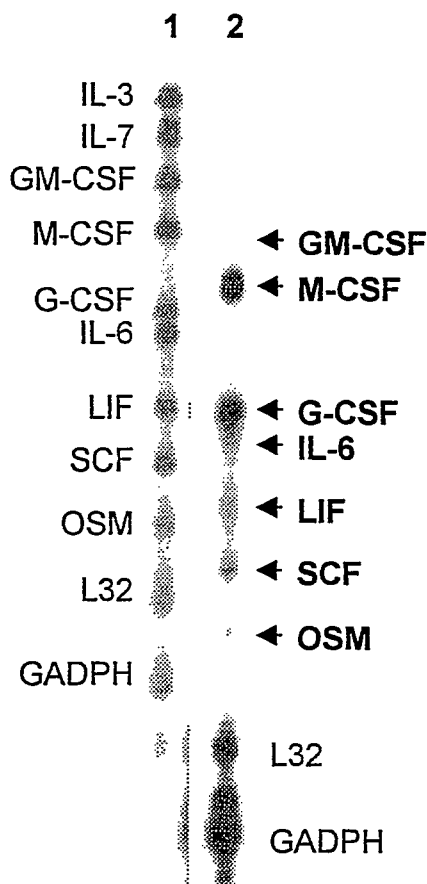


FIGURA 15: Expresión de mensajeros de RNA para citoquinas en cultivos de CPM.

La expresión de mensajeros de RNA para citoquinas en cultivos de CPM fue analizada por un ensayo de protección a RNAsa múltiple. La autorradiografía muestra el patrón de bandas correspondientes a las sondas sintetizadas (1) y el patrón de protección obtenido indicando las especies correspondientes para cada banda (2).

confirmó la producción de IL-6 ($4,8 \pm 1,1$ ng/mg proteína) y LIF ($50,3 \pm 13,2$ pg/mg proteína).

3.2.- ¿Las CPM expresan receptores para IL-6 y LIF?

De manera similar a la utilizada para estudiar la producción de citoquinas, se analizó la expresión de mensajeros para cadenas de receptores de estas moléculas. En este caso, el ensayo de protección a ribonucleasa sólo detectó la expresión del mensajero de RNA para la subunidad común gp130 del receptor de citoquinas de la familia IL-6 (Figura 16), y no los correspondientes a las cadenas específicas de receptores IL-6R α , LIFR α , G-CSFR α , IL-5R α , IL-3R α , GM-CSFR α y β c.

La presencia de las cadenas de receptores IL-6R, LIFR y gp130 fue evaluada por inmunofluorescencia y western blot. Confirmando los resultados obtenidos al evaluar la expresión de los mensajeros, sólo se detectó la expresión de gp130 en la membrana de la CPM la que pudo ser analizada por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (Figura 17A). La inmunodetección por western blot muestra la presencia de dos especies de tamaño molecular correspondientes a gp130, que podrían corresponder a las formas asociada a membrana y soluble descritas para algunos tipos celulares (Figura 17B) A través de ensayos de ELISA se detectó la producción de la cadena soluble sgp130 (212 ± 33 pg/mg proteína), apoyando la observación

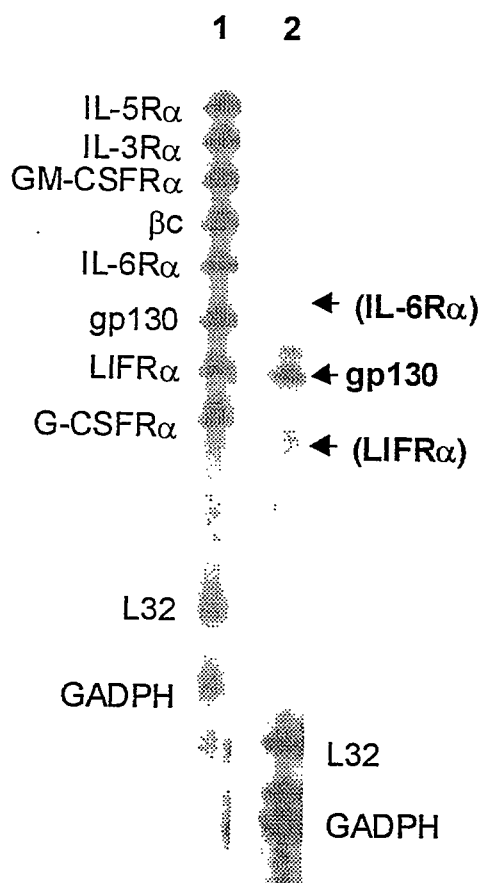


FIGURA 16: Expresión de mensajeros de RNA para receptores de citoquinas en cultivos de CPM.

La expresión de mensajeros de RNA para receptores de citoquinas en cultivos de CPM fue analizada por un ensayo de protección a RNAsa múltiple. La autorradiografía muestra el patrón de bandas correspondientes a las sondas sintetizadas (1) y a gp130 (2). Además, la posición teórica para las cadenas IL-6R y LIFR es indicada entre paréntesis (2).

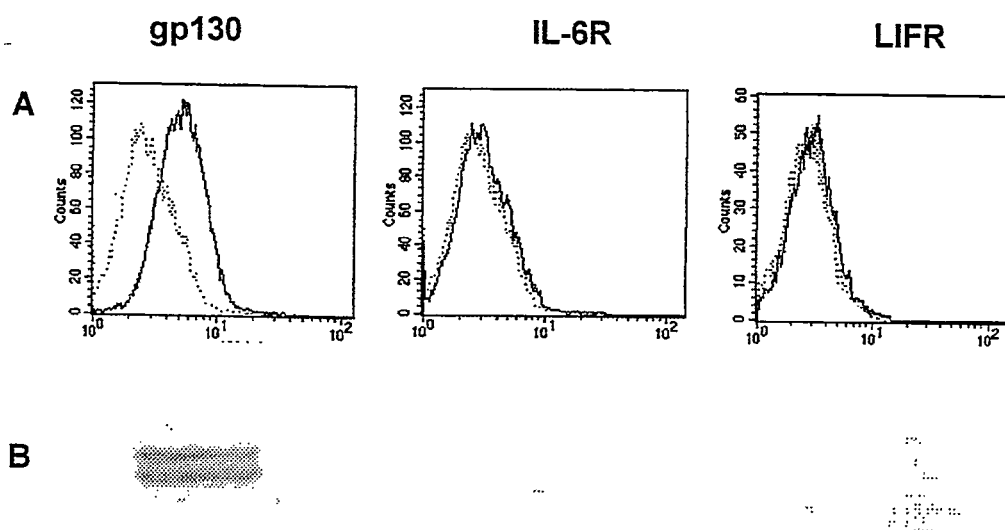


FIGURA 17: Expresión de subunidades de receptores.

La expresión de los receptores gp130, IL-6R y LIFR en CPM fue analizada por citometría de flujo (A) y western blot (B). Los histogramas muestran el número relativo de células (counts) versus la intensidad media de fluorescencia IMF. La inmunodetección por western blot fue realizada utilizando un lisado total de CPM y la posición de las proteínas buscadas definida de acuerdo a la migración relativa de marcadores de tamaño molecular.

obtenida por western blot, pero no la producción de sIL-6R (límite detección 30 pg/ml)

3.3.- ¿Pueden las citoquinas producidas por la CPM conformar un microambiente con capacidad de regular la proliferación y/o diferenciación de estas mismas células?

A). Efectos de citoquinas IL-6 y LIF sobre la proliferación y diferenciación de CPM no comprometidas al linaje osteogénico

Cultivos de CPM fueron suplementados con IL-6 y LIF para evaluar el efecto de estas citoquinas sobre la proliferación y capacidad de diferenciación de estas células. Ninguna de las dos citoquinas (10-100 ng/ml), produjo efectos sobre la proliferación de las CPM, siendo similar a la observada en un medio de mantención (α -MEM + 0,5% SFB) y muy inferior a la obtenida en condiciones óptimas de cultivo (10% SFB) (Figura 18A). Al suplementar los cultivos en presencia de citoquinas en forma adicional con las cadenas solubles de los respectivos receptores (IL-6+sIL-6R; LIF+sLIFR), o bien, suplementar el medio sólo con estas cadenas (sIL-6R o sLIFR), no se modificó la actividad proliferativa de estas células (Figura 18A).

Para evaluar el efecto de IL-6 y LIF sobre la diferenciación osteogénica de las CPM, cultivos confluentes de CPM fueron expuestos a distintas concentraciones de estas citoquinas (10-100 ng/ml) y se evaluó la expresión de marcadores de diferenciación a distintos tiempos. Las células así tratadas no

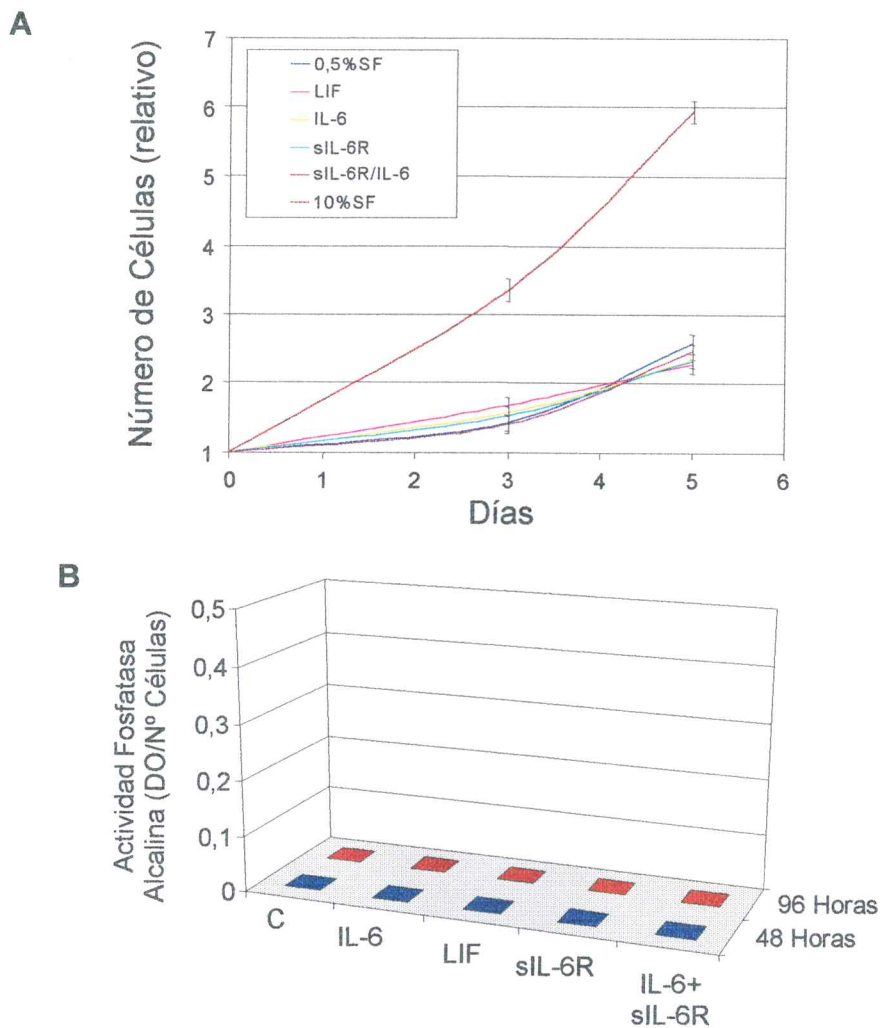


FIGURA 18: Efecto de citoquinas de la familia IL-6 sobre la proliferación y diferenciación osteogénica de CPM.

CPM fueron cultivadas en presencia de IL-6 (20 ng/ml), LIF (20 ng/ml), sIL6R (200 ng/ml) o IL-6/sIL-6R (20 ng/ml / 200 Ng/ml) y se evaluó el efecto sobre la proliferación (A) y diferenciación osteogénica (B). Para los ensayos de proliferación las células fueron mantenidas en medios control 0,5 ó 10 % SFB, para evaluar el efecto de las citoquinas estas fueron suplementadas al medio control 0,5% SFB y el número de células fue determinado a los 3 y 5 días de cultivo. En los ensayos de diferenciación, las células fueron mantenidas en medio control 10% SFB, el cual fue suplementado con las citoquinas, y todas las condiciones comparadas con el control positivo en medio osteogénico. Luego de 48 y 96 horas se realizó la medición de actividad fosfatasa alcalina. Los valores presentados son representativos de 4 experimentos realizados en duplicado. La proliferación es evaluada en forma relativa respecto del número de células al inicio del ensayo.

expresan marcadores de diferenciación osteogénica (actividad fosfatasa alcalina a lo 4 días, mineralización de la matriz luego de 15 días), lo que si ocurrió con los cultivos control expuestos al estímulo osteogénico de dexametasona (Figura 18B). Cuando las células fueron expuestas a las citoquinas en presencia de las cadenas solubles de sus receptores (IL-6+sIL-6R; LIF+sLIFR), o a las cadenas de receptores solas (sIL-6R o sLIFR), tampoco se observó actividad fosfatasa alcalina (Figura 18B).

Estas observaciones sugieren que ni IL-6 ni LIF constituyen per se, factores de estimulación para la proliferación o diferenciación osteogénica de CPM.

B) ¿Pueden las citoquinas IL-6 y LIF modular la proliferación y diferenciación de CPM comprometidas el linaje osteogénico?.

Datos de la literatura señalan que las CPM expuestas a dexametasona inician el proceso de diferenciación que implica un primer paso de compromiso hacia el linaje osteogénico, el que puede ser evaluado experimentalmente midiendo cambios en la actividad de fosfatasa alcalina. El proceso anterior que culminará con la maduración y expresión del fenotipo terminal. Por esto, la pregunta planteada en la sección anterior, fue reformulada para una situación en la cual las CPM fueron expuestas dexametasona.

a) Efecto de citoquinas IL-6 y LIF sobre la actividad fosfatasa alcalina de CPM estimuladas con dexametasona.

Cultivos confluentes de CPM fueron expuestos simultáneamente a dexametasona (medio osteogénico) y a las citoquinas IL-6 y LIF para evaluar un posible efecto regulador de estas citoquinas sobre el proceso de diferenciación osteogénica de las CPM iniciado por dexametasona. En las células así tratadas no se observó ningún efecto sobre la actividad de fosfatasa alcalina inducida por el estímulo osteogénico de dexametasona, ni tampoco en la proliferación que ésta per se, induce en estas células (Figura 19A). Esto sugiere que estas citoquinas no tienen la capacidad para modular el proceso de diferenciación osteogénico de las CPM, iniciado por dexametasona.

En forma complementaria se determinó, por citometría de flujo, que el estímulo osteogénico no produce un cambio cualitativo ni cuantitativo en la expresión de subunidades de receptores para estas citoquinas.

b) Efecto de IL-6 + sIL-6R sobre la actividad fosfatasa alcalina de CPM estimuladas con dexametasona:

Cuando IL-6 es agregada en presencia de su respectiva cadena soluble de receptor (IL-6+sIL-6R) y siempre en presencia del estímulo osteogénico, los resultados son distintos a los obtenidos con IL-6 sola. En presencia de IL-6+sIL-6R (complejo IL-6/sIL-6R), la actividad fosfatasa alcalina es significativamente mayor que la obtenida con dexametasona sola (Figura 19B) Este efecto cuantitativo, puede ser también visualizado en un orden temporal, por cuanto la activación de fosfatasa alcalina es detectable primero en los cultivos expuestos al complejo IL-6/sIL-6R, mientras es mínima en aquellos

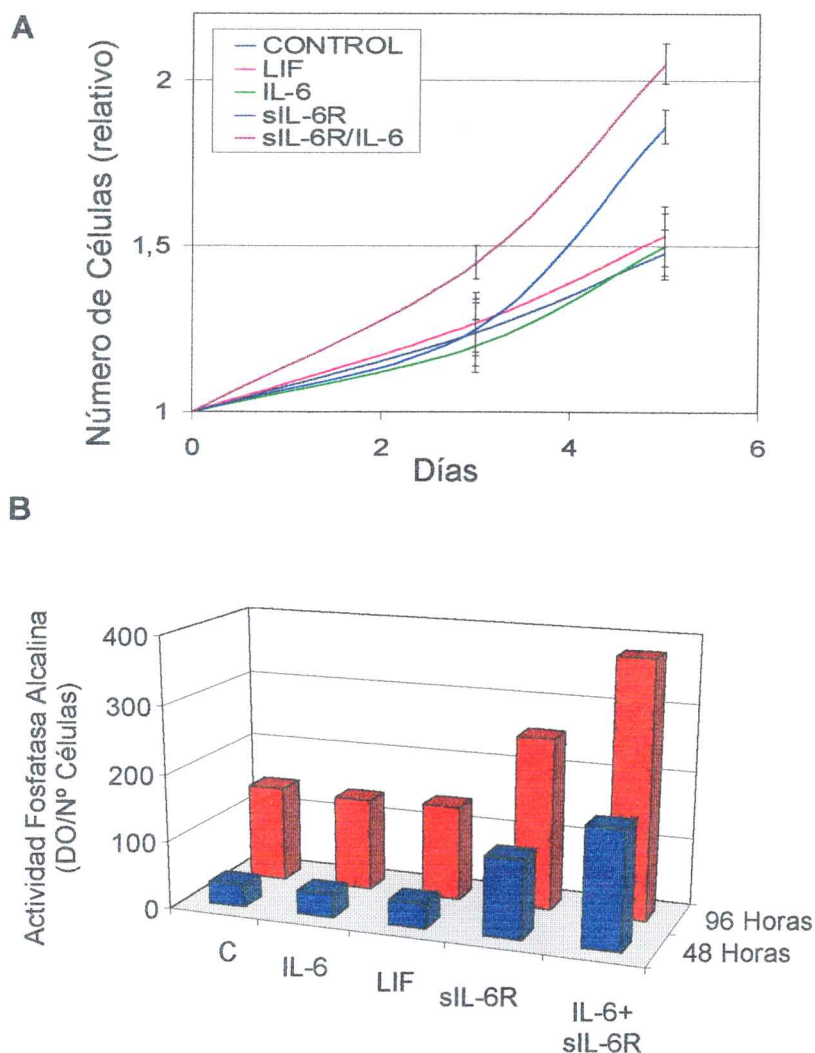


FIGURA 19: Efecto de citoquinas de la familia IL-6 sobre la proliferación y diferenciación osteogénica de CPM expuestas a dexametasona.

CPM expuestas a dexametasona fueron cultivadas en presencia de IL-6 (20 ng/ml), LIF (20 ng/ml), sIL6R (200 ng/ml) o IL-6/sIL-6R (20 ng/ml / 200 ng/ml) y se evaluó el efecto sobre la proliferación (A) y diferenciación osteogénica (B). Para ambos ensayos las células fueron mantenidas en medio control 0,5 ó 10% SFB o medio osteogénico (10% SFB, dexametasona 0,1 μ M + β -glicerofosfato 10 mM + ácido ascórbico 50 μ g/ml). El número de células y la actividad fosfatasa alcalina como marcador de diferenciación osteogénica fueron determinados a las 48 y 96 horas. Los valores son representativos de 4 experimentos realizados en duplicado. La proliferación es evaluada en forma relativa respecto del número de células al inicio del ensayo.

sólo expuestos a dexametasona. El efecto estimulador de IL-6/sIL-6R también se acompaña de un aumento en la actividad proliferativa de las células del cultivo, por sobre el efecto producido por el estímulo osteogénico de dexametasona (Figura 19A).

c) Efecto de sIL-6R sobre la actividad fosfatasa alcalina de CPM estimuladas con dexametasona:

Cuando células en presencia de dexametasona, son expuestas adicionalmente a la cadena sIL-6R sola (50-200 ng/ml), se produce una activación de fosfatasa alcalina y un estímulo en la proliferación (Figuras 19 A y B). Estos efectos son mayores que los obtenidos con dexametasona sola, pero inferiores a los observados con la suplementación de IL-6 + sIL-6R. Este efecto debe ser entendido considerando la capacidad de producción de IL-6 por las CPM (ensayo de protección a ribonucleasa, ELISA), la cual puede formar el complejo IL-6/sIL-6R y actuar así como una señal autocrina sinergista de la proliferación y diferenciación estimulada por dexametasona. La magnitud de este efecto depende exclusivamente de la concentración de IL-6 en el medio, en este caso sólo la producida por la CPM, a diferencia de los ensayos con suplementación de IL-6 + sIL-6R, en los que se obtiene un efecto mayor.

d) Efecto de IL-6 y sIL-6R sobre la expresión de los marcadores moleculares de diferenciación osteogénica cbfa-1 y osteocalcina.

La expresión de mensajeros de *cbfa-1* y osteocalcina, es inducida en las CPM expuestas al estímulo osteogénico de dexametasona sola o en presencia del complejo IL-6/sIL-6R o sIL-6R solo (Figura 20). Sin embargo, debido a la metodología utilizada (RT-PCR) no es posible determinar diferencias cuantitativas entre las distintas condiciones.

e) Efecto de LIF sobre proliferación y diferenciación osteogénica de CPM:

Al contrario de lo observado con IL-6 y su receptor sIL-6R, LIF no tiene ningún efecto tanto sobre la capacidad proliferativa como sobre la activación de fosfatasa alcalina en CPM estimuladas con dexametasona (Figura 19 A y B). Tampoco se observa un efecto en presencia de su receptor sLIFR (no mostrado), que se puede entender considerando que este receptor se une a la citoquina, pero el complejo LIF/LIFR no puede unirse a gp130 de membrana. En este sentido LIFR presenta un comportamiento antagonista de la actividad biológica de LIF.

C) Los efectos del complejo IL-6/sIL-6R sobre la diferenciación osteogénica de CPM estimuladas con dexametasona dependen de la formación del complejo y la activación de la vía gp130.

El requerimiento tanto de la formación del complejo IL-6/sIL-6R como de la posterior activación de gp130 de membrana, sobre los efectos antes descritos, fue evaluado por ensayos de inhibición. Para ello se utilizaron moléculas con capacidad para inhibir: a) la formación del complejo IL-6/sIL-6R

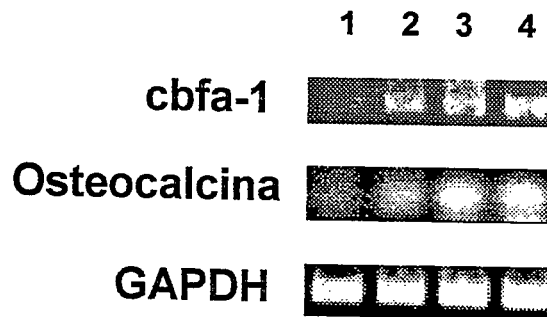


FIGURA 20: Efecto de IL-6 sobre la expresión de mensajeros de RNA para cbfa-1 y osteocalcina.

El efecto de IL-6 y sIL-6R sobre la diferenciación osteogénica de CPM expuestas a dexametasona fue analizado a nivel de la expresión de los marcadores moleculares cbfa-1 y osteocalcina. Las CPM fueron mantenidas en medio control 10%SFB (1) o medio osteogénico (2-4) el cual fue suplementado con sIL-6R (200 ng/ml) (3) o IL-6/sIL-6R (20 ng/ml / 200 ng/ml) (4). Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones durante 96 horas, se extrajo RNA total y se analizó la expresión de los mensajeros por RT-PCR. La identificación de los amplificadores se realizó en base a la migración relativa de marcadores de tamaño molecular.

(anticuerpo monoclonal dirigido contra sIL-6R); b) secuestrar el complejo (cadena soluble sgp130), o c) bloquear la activación de gp130 (anticuerpo monoclonal dirigido contra gp130).

Las tres moléculas utilizadas inhiben el efecto de IL-6/sIL-6R sobre la activación de fosfatasa alcalina en CPM expuestas a dexametasona (Figura 21). Los anticuerpos contra sIL-6R y sgp130 producen una inhibición parcial del estímulo, mientras que con el monoclonal que reconoce gp130 la inhibición es de un 100%.

Estos resultados muestran que el efecto del complejo IL-6/sIL-6R depende de la formación de dicho complejo y la disponibilidad de gp130 de membrana.

D) ¿Hay transducción de señales por la activación de gp130 en las CPM estimuladas con dexametasona?

La transducción de señales en respuesta a la activación de gp130 de membrana por el complejo IL-6/sIL-6R, fue evaluada a través de la fosforilación de stat-3 (activación de la vía JAK-STAT). Las CPM expuestas a dexametasona no presentan fosforilación de stat-3. Sin embargo, cuando CPM que han sido estimuladas con dexametasona son expuestas al complejo IL-6/sIL-6R, se observa la fosforilación de stat-3 (Figura 22). Este efecto fue completamente inhibido por la presencia del anticuerpo monoclonal contra gp130, lo que sugiere que la activación de este receptor es requerida para obtener el efecto del complejo IL-6/sIL-6R sobre la diferenciación de las CPM.

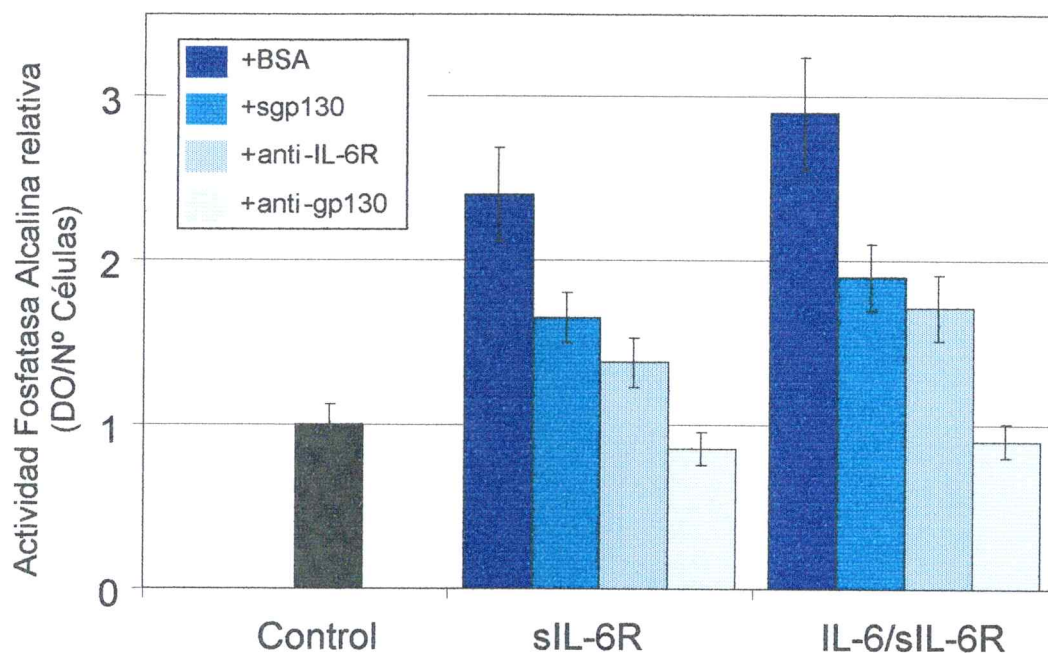


FIGURA 21: Ensayos de inhibición del efecto osteogénico de sIL-6R en CPM expuestas dexametasona.

CPM mantenidas en medio osteogénico fueron expuestas a sIL-6R (200 ng/ml) o IL-6/sIL-6R (20 ng/ml / 200 ng/ml). Para el inhibir el efecto observado sobre la actividad fosfatasa alcalina de las CPM, se utilizaron moléculas con capacidad de: a) inhibir la formación del complejo IL-6/sIL-6R (anticuerpo monoclonal dirigido contra sIL-6R; 10 ug/ml); b) secuestrar el complejo (cadena soluble sgp130; 10 ug/ml), o c) bloquear la activación de gp130 (anticuerpo monoclonal dirigido contra gp130; 10 ug/ml). Estas fueron agregadas en conjunto con sIL-6R o IL-6/sIL-6R y luego de 96 horas se determinó la actividad fosfatasa alcalina. Los resultados muestran actividad fosfatasa alcalina relativa respecto de CPM expuestas sólo al medio osteogénico y son representativos de 3 experimentos realizados en duplicado.

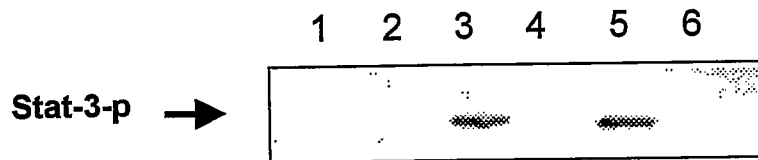


FIGURA 22: Fosforilación de stat-3 en CPM expuestas a dexametasona en respuesta a sIL-6R.

CPM fueron mantenidas en medio control 10% SFB (1) o medio osteogénico (2-6). El análisis por western blot muestra que no se observa fosforilación de stat-3 en CPM mantenidas en medio control 10%SFB (1) o en medio osteogénico (2). Sin embargo, se detecta stat-3 fosforilado (stat-3-p) en células mantenidas en medio osteogénico y expuestas por 10 minutos a sIL-6R (200 ng/ml) o IL-6/sIL-6R (20 ng/ml / 200 ng/ml) (3 y 5 respectivamente). El efecto en estas condiciones fue inhibido completamente por una breve preincubación de 10 minutos en presencia de el anticuerpo monoclonal anti-gp130 (10 ug/ml) (4 y 6).

DISCUSION

Durante los últimos 5 años diversos trabajos han incrementado la información disponible sobre la fisiología de la CPM (Bianco y Gehron Robey, 2000; Bianco y col, 2001; Dominici y col, 2001; Minguell y col, 2001, anexo 3). Los principales esfuerzos han estado orientados a identificar los inductores de los procesos de diferenciación a los linajes mesenquimáticos, establecer la amplitud del potencial de diferenciación de estas células y evaluar el potencial uso terapéutico de ellas. El trabajo práctico e intelectual desarrollado en esta tesis contribuye a algunos de estos aspectos. En particular los resultados obtenidos durante mi tesis constituyen la primera evidencia existente en la literatura sobre la presencia de CPM en la SCU (Erices y col, 2000; anexo 1), y postulan una hipótesis original respecto de la ontogenia del sistema mesenquimático y hematopoyético. Esta observación junto a los resultados obtenidos con el modelo de xenotrasplante, también representan una nueva visión respecto de la capacidad de la CPM para movilizarse entre tejidos mesenquimáticos. Adicionalmente, el desarrollo de este trabajo incorpora el concepto de microambiente mesenquimático como modelo de regulación funcional de la CPM (Erices y col, 2002; anexo 4), se introduce en el análisis de la jerarquía los progenitores mesenquimáticos y de los posibles usos de las CPM en el desarrollo de terapias celulares dirigidas hacia los sistemas hematopoyético y/o mesenquimático (Minguell y col, 2000; anexo 2; Minguell y col, 2001; anexo 3).

1.- CPM-SCU y significado de su presencia a este nivel.

Durante el desarrollo, en particular durante la vida embrionaria, varios procesos biológicos son migratorios, es decir células precursoras de varios tejidos y órganos se movilizan para establecer un determinado proceso en un lugar distinto al de su origen. El mejor ejemplo de migración de precursores celulares y establecimiento de focos de actividad biológica, está dado por el sistema hematopoyético fetal (Tavassoli, 1991). Durante la vida embrionaria este proceso es sustentado en una primera etapa por el saco vitelino, luego por el hígado y finalmente se establece en la MO, órgano hematopoyético durante el resto de la vida. La presencia de progenitores hematopoyéticos a nivel de la sangre fetal da cuenta de la migración del proceso hematopoyético fetal (Broxmeyer y col, 1989; Rubinstein y col, 1995). En el caso del sistema mesenquimático, en las primeras etapas del desarrollo éste se encuentra sustentado por la diferenciación de células del mesodermo y la posterior localización de las CPM en la MO, órgano que sustenta el proceso durante la vida adulta (Caplan, 1994). Sin embargo, la migración de las CPM a través de la SCU desde su localización en tejidos fetales a la MO, no había sido demostrada con anterioridad al desarrollo de este trabajo.

Los resultados obtenidos en mi tesis demuestran que durante etapas definidas de la gestación humana, las CPM circulan a través de la SCU. En cultivo, estas células presentan morfología fibroblastoide y expresan marcadores antigénicos característicos de CPM (antígenos de la familia SH,

ASMA, Mab1470) (Figuras 4 y 7). Los cultivos de CPM-SCU expandidos *ex vivo*, contienen un 85% de células en fase G0/G1 del ciclo celular, y una subpoblación de éstas se encuentra en estado quiescente (G0= 5%). Esto significa que desde el punto de vista del potencial proliferativo, las CPM-SCU se distribuyen en dos subpoblaciones, una de activa proliferación y otra en reposo proliferativo o quiescentes. Esta población de células quiescentes representaría una subpoblación de CPM troncales con mayor potencial de diferenciación (Conget y col, 2001). Esta característica implica que a pesar que los cultivos de CPM-SCU están conformados por una población morfológicamente homogénea, existirían subpoblaciones de CPM con un distinto grado de compromiso a las vías de diferenciación mesenquimática. La existencia de una subpoblación de células comprometidas con los linajes mesenquimáticos explicaría el porqué en los cultivos de CPM-SCU expandidos he podido detectar la expresión de los marcadores moleculares tempranos de compromiso, *cbfa1* y *ppar-γ*, (Figura 8). Sin embargo, sólo cuando las CPM-SCU son estimuladas apropiadamente, se produce la diferenciación terminal hacia los linajes osteogénico y adipogénico, y probablemente a otros no analizados en esta tesis.

Al analizar y comparar las características de las CPM-SCU y CPM-MO, pude observar que ambas poblaciones presentan morfología, inmunofenotipo, potencial de proliferación, distribución en etapas de ciclo celular y potencial de diferenciación similares (Conget y Minguell, 1998; Pittenger y col, 1999). Sobre

la base de estas características se logró establecer que las CPM-SCU y CPM-MO, son poblaciones celulares equivalentes y corresponden a un mismo tipo celular.

En forma similar a lo que ocurre con los progenitores hematopoyéticos, los resultados obtenidos permiten establecer una relación entre la presencia de CPM en SCU y la edad gestacional. Así, en las muestras de SCU de pretérmino (≤ 37 semanas), existe una mayor "probabilidad" de obtener cultivos de CPM. En estas muestras el contenido de progenitores hematopoyéticos también resultó mayor, lo cual concuerda con una establecida relación entre edad gestacional y contenido de estos progenitores en SCU (Shields y Andrews, 1998; Wyrsh y col, 1999). Por otra parte, con las muestras de término (> 37 semanas) hay una mayor probabilidad de obtener cultivos de progenitores osteoclásticos. Su presencia a este nivel estaría relacionada con la alta tasa de remodelación ósea durante esta etapa del desarrollo y la ausencia de CPO en SCU ha sido asociada con patologías del sistema óseo (Roux y col, 1996).

Curiosamente en ningún cultivo se encontraron ambos tipos celulares CPM y CPO en forma conjunta. Esto probablemente puede representar un mecanismo de regulación de la proliferación de CPM por señales generadas por una población con mayor número de precursores osteoclásticos al finalizar la vida fetal.

La presencia de CPM en SCU sugiere que durante la vida fetal, los progenitores mesenquimáticos "viajarían", a través de la sangre fetal, a colonizar la MO en formación para establecerse en el estroma y sustentar el proceso mesenquimático adulto. Este proceso sería similar y simultáneo, espacial y temporalmente, con el proceso de migración de los progenitores hematopoyéticos que viajan a colonizar la futura MO hematopoyética.

Es válido postular, como una alternativa no excluyente a la hipótesis anterior, que algunas CPM presentes en la SCU pueden corresponder a progenitores movilizándose directamente hacia tejidos mesenquimáticos secundarios para realizar allí su diferenciación terminal. Así, tejidos que presentan un intenso remodelamiento durante esta etapa del desarrollo, tales como hueso y cartílago, podrían ser el destino final para algunas de las CPM-SCU en este proceso de migración.

La identificación de CPM-SCU realizada en el desarrollo de mi tesis constituye la primera evidencia reportada en la literatura sobre caracterización de CPM en tejidos fetales (Erices y col, 2000), así ha sido reconocida en documentación sobre células troncales (NIH, 2001; anexo 5) y utilizada como base para estudios que han comprobado (Goodwin y col, 2001) y extendido estas observaciones describiendo la presencia de CPM en SCU e hígado fetal humanos correspondientes al primer trimestre de vida intrauterina (Campagnoli y col, 2001).

El hallazgo de CPM en SCU, producto biológico habitualmente desechado, representa una valiosa alternativa para usar ésta como fuente celular para el desarrollo y aplicación de terapias biológica. Esta alternativa es una realidad para los progenitores hematopoyéticos presentes a este nivel (Broxmeyer y col, 1989; Rubinstein y col, 1995), y ha sido ampliada por nuevas observaciones respecto de la presencia de progenitores no identificados o definidos para tejidos del sistema nervioso en la SCU (Goodwin y col, 2001; Sánchez-Ramos y col, 2001; Ha y col, 2001). Paralelamente se ha demostrado que CPM-MO tienen el potencial para diferenciar a tejido nervioso (Kopen y col, 1999; Woodbury y col, 2000), lo que amplía el uso de estas células a terapias para enfermedades del sistema nervioso.

Utilizando el conjunto de estas evidencias se puede postular el uso de la SCU en terapias celulares para problemas clínicos que afecten el sistema hematopoyético (Koc y col, 2000) y enfermedades de tejidos mesenquimáticos como osteogénesis imperfecta (Horwitz y col, 1999), osteoporosis (Rodríguez y col, 1999) o enfermedades metabólicas (Baxter y col, 2002)), reparación de tejido cardíaco (Fukuda y col, 2001; Toma y col, 2002) o nervioso (Kopen y col, 1999; Woodbury y col, 2000). Este amplio potencial se refuerza con una posible menor "carga" inmunológica asociada a la inmadurez de los progenitores fetales. Adicionalmente la posibilidad de intervenir terapéuticamente a tempranas edades del desarrollo gestacional, posibilitan tanto el diagnóstico como la realización de terapias celulares que aprovechen las propiedades migratorias de las CPM (Zanjani y col, 1997; Almeida-Porada y col, 1999).

2.- CPM-SCU son trasplantables, reconocen y establecen residencia en la MO (homing): significado de la presencia de células humanas en tejidos murinos.

La posibilidad de trasplantar CPM, autólogas o alogénicas, representa una alternativa para el desarrollo de terapias biológicas dirigidas a tejidos mesenquimáticos. Así, el implante de CPM por localización dirigida de éstas en tejidos mesenquimáticos secundarios (hueso, cartílago), ha demostrado la capacidad de las células implantadas para realizar la diferenciación terminal del linaje correspondiente (Young y col, 1998; Johnstone y col, 1999; Richards y col 1999). Sin embargo, la posibilidad de colonizar la MO con CPM (trasplante por vía circulatoria), permitiría reemplazar la totalidad del proceso mesenquimático, ya sea porque éste es funcionalmente deficiente o ha resultado dañado. De esto surge la necesidad e importancia de establecer si las CPM pueden ser infundidas en forma sistémica, para que luego realicen la extravasación hacia la MO, establezcan residencia en ella y finalmente reinicien el proceso mesenquimático (homing).

La infusión de CPM-SCU humanas en ratones inmunodeficientes es un procedimiento que no representa riesgo para el animal, por cuanto no se observaron signos de toxicidad asociados al procedimiento de trasplante, los ratones sobrevivieron en condiciones normales y no se encontraron evidencias de daños, compromiso o malformación de tejidos u órganos al momento de su muerte.

2.A. ¿Qué significa la presencia de células humanas en la MO murina?

La detección de células humanas en la MO de los ratones luego de 6 meses de haber sido trasplantados, representa la capacidad de las CPM-SCU para reconocer este tejido y establecerse en él (homing). Considerando el tiempo post-trasplante transcurrido, es posible suponer que una población de CPM-SCU no comprometidas presentes en la población celular trasplantada, logró establecerse en la MO murina. Durante este periodo expresó tanto su potencial de proliferación (autorenovación) como de diferenciación, manteniendo así una población de células no comprometidas (autorenovación) en la MO murina y generando progenitores comprometidos con los distintos linajes mesenquimáticos.

La presencia de células humanas en la MO murina indica que CPM-SCU pueden repoblar la MO y establecer en ella un proceso mesenquimático con las características celulares del donante. Esto coincide con recientes observaciones realizadas en trasplantes de MO humanos, en los cuales se ha observado que en la MO del receptor se encuentran tanto progenitores hematopoyéticos como mesenquimáticos con características del donante. En estos casos, y en casos de trasplantes de MO en otras especies, se ha observado la presencia de células del donante tanto en el estroma de la MO como en la formación de tejidos mesenquimáticos secundarios (Almeida-Porada y col, 1999; Koc y col, 2000; Conget y col, 2001). En virtud de estas observaciones se ha utilizado la infusión de CPM expandidas *ex vivo* como

apoyo a la reconstitución hematopoyética post-trasplante de células troncales hematopoyéticas (Koc y col, 2000).

Es probable que el modelo de xenotrasplante utilizado no sea el más permisivo para evaluar la migración y localización de las CPM-SCU en la MO. En este modelo no existe un requerimiento particular de CPM, razón por la cual las CPM trasplantadas deben competir por un espacio ya ocupado por la población celular propia del animal. Probablemente una MO con un estroma dañado o deficiente en CPM, podría representar un entorno más favorable para la localización de las CPM trasplantadas. Esta alternativa no fue analizada durante el desarrollo de esta tesis.

2.B. ¿Qué significa la presencia de células humanas en tejidos murinos?

La presencia de células humanas en tejidos mesenquimáticos secundarios puede ser interpretada como la localización de progenitores mesenquimáticos comprometidos con el respectivo linaje, los que se habrían movilizado desde la MO ya sea por el recambio celular normal del tejido o para regeneración o reparación de éste (no existente en este caso). Probablemente el hallazgo de células humanas en tejidos murinos pueda estar enmascarado por un lento recambio celular, situación distinta a la de regeneración de un tejido por daño tisular (no evaluado en esta tesis)

2.C. Las CPM-SCU son equivalentes funcionales de las CPM-MO.

Los resultados obtenidos con los xenotrasplantes de CPM-SCU concuerdan con las observaciones tanto de localización de células humanas como con la cinética de aparición de estas células en los tejidos u órganos del receptor (Conget y col, datos no publicados). Paralelamente, los estudios de caracterización *in vitro* también muestran características equivalentes para ambas poblaciones celulares. El conjunto de estas características implica que las CPM-SCU representan una población celular equivalente a las CPM-MO, y constituyen una valiosa alternativa para extender el uso propuesto para estas células en el desarrollo y aplicación de terapias biológicas.

3.- Jerarquía de progenitores mesenquimáticos.

La distribución secuencial de progenitores mesenquimáticos, desde la CPM no comprometida hasta la célula diferenciada madura, no ha sido establecida. Algunas evidencias surgidas en estudios realizados por nuestro grupo (Conget y col, 2001) y otros (Phinney y col, 1999; Colter y col, 2000; Muraglia y col, 2000), revelan la existencia de poblaciones funcionalmente diferentes dentro de cultivos expandidos de CPM-MO. Estas observaciones constituyen el primer soporte para establecer una putativa jerarquía de progenitores mesenquimáticos (Figura 3; Minguell y col, 2001; anexo 3). Probablemente la distribución de estos progenitores se encuentre

asociada a la localización de éstos en tejidos mesenquimáticos secundarios en los cuales ha de predominar el fenotipo correspondiente a dicho tejido.

En este contexto recientes antecedentes han extendido la localización de CPM a distintos tejidos adultos (De Bari y col, 2001; Asakura y col, 2001; Zuk y col, 2001). Estas observaciones permiten postular el uso de CPM no sólo para terapias dirigidas a la población de CPM que sustenta el proceso mesenquimático en el estroma de la MO, sino que también a aquellas que residen en otros tejidos.

4.- ¿Existe/n microambiente/s mesenquimático/s?

La funcionalidad de las CPM debe estar regulada por señales específicas que puedan dirigir el desarrollo del proceso mesenquimático. Las CPM residentes en el estroma de la MO, están expuestas a rico ambiente en señales tales como citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y de matriz extracelular. Por lo tanto es posible pensar que se conforma un microambiente mesenquimático similar al hematopoyético, probablemente compartiendo algunas de estas señales, cuyos efectos son conocidos para la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos (Orkin, 1995), pero no para las CPM.

En un intento por evaluar la información existente sobre generación y efecto de señales específicas para regular la mesengénesis, se pudo confirmar que las CPM producen citoquinas IL-6 y LIF. Nuestros resultados muestran que

además estas células expresan la cadena gp130 de los receptores para estas citoquinas y no las subunidades específicas de los receptores (IL-6R y LIFR). Estas características restringen la posibilidad de que las CPM puedan sufrir algún tipo de regulación por IL-6 y/o LIF. Para el caso de IL-6, esto estaría condicionado tanto por la ausencia de IL-6R en la membrana de estas células como por la falta de producción de la cadena soluble sIL-6R. Los resultados obtenidos avalan lo anterior, en cuanto a la incapacidad de estas citoquinas de modificar la proliferación y potencial de diferenciación de las CPM no expuestas a estímulos de compromiso y diferenciación. Sin embargo, al realizar los estudios utilizando CPM comprometidas al linaje osteogénico por la inducción con dexametasona, se observó que IL-6 induce la proliferación y diferenciación de estas células sólo en presencia de sIL-6R. Este efecto demostró ser dependiente de la presencia y activación de gp130 en la membrana de la CPM.

Sobre la base de estos resultados se puede postular la existencia de un microambiente compuesto por señales autocrinas (IL-6) y paracrinas (sIL-6R) con capacidad de regular la diferenciación osteogénica de las CPM. Este microambiente actuaría sobre CPM comprometidas con el linaje osteogénico (experimentalmente inducidas con dexametasona, sin conocerse el estímulo fisiológico equivalente) las cuales tendrían la capacidad de responder a IL-6 sólo cuando está presente sIL-6R, mecanismo que dependería de la presencia y activación de gp130 de membrana.

Así, considerando los mecanismos moleculares que regulan la actividad biológica de IL-6, los efectos de esta citoquina sobre la diferenciación

osteogénica de las CPM comprometidas a este linaje, dependerá de los niveles y expresión de IL-6, sIL-6R, gp130 de membrana y sgp130. Los mecanismos de acción de IL-6/sIL-6R sobre las CPM han sido graficados en la Figura 23.

Los efectos observados con IL-6 en este trabajo, están limitados a una población celular particular, cual es CPM que ya han adquirido un grado de compromiso con el linaje osteogénico. Se desconoce cual es la situación *in vivo*, pero algunas evidencias sugieren que en la MO la población existente de CPM está formada sólo por células no comprometidas y en G0 (Castro-Malaspina y col, 1980). Así, estas CPM no tendrían la capacidad de responder al estímulo osteogénico IL-6/sIL-6R, capacidad que se expresaría sólo en la CPM luego de comprometerse al linaje osteogénico. Para que esto ocurra, la CPM deberá migrar desde su sito de residencia hacia los sitios de síntesis ósea fuera del estroma, entorno en el cual podría acceder a sIL-6R y responder al estímulo del complejo IL-6/sIL-6R.

Los resultados obtenidos muestran que las CPM participan en la producción de señales reguladoras que pueden tener un importante rol en mecanismos autocrinos o paracrinos de regulación de la proliferación y/o diferenciación de la misma CPM o los progenitores mesenquimáticos comprometidos en alguna vía de diferenciación. Estas señales también serían útiles para la regulación del proceso hematopoyético. En este contexto la CPM contribuye con tres subpoblaciones celulares: la CPM no comprometida propiamente tal, la CPM diferenciada madura presente en el estroma de la MO (fibroblasto de MO, adipocitos) y CPM comprometidas en alguna vía de

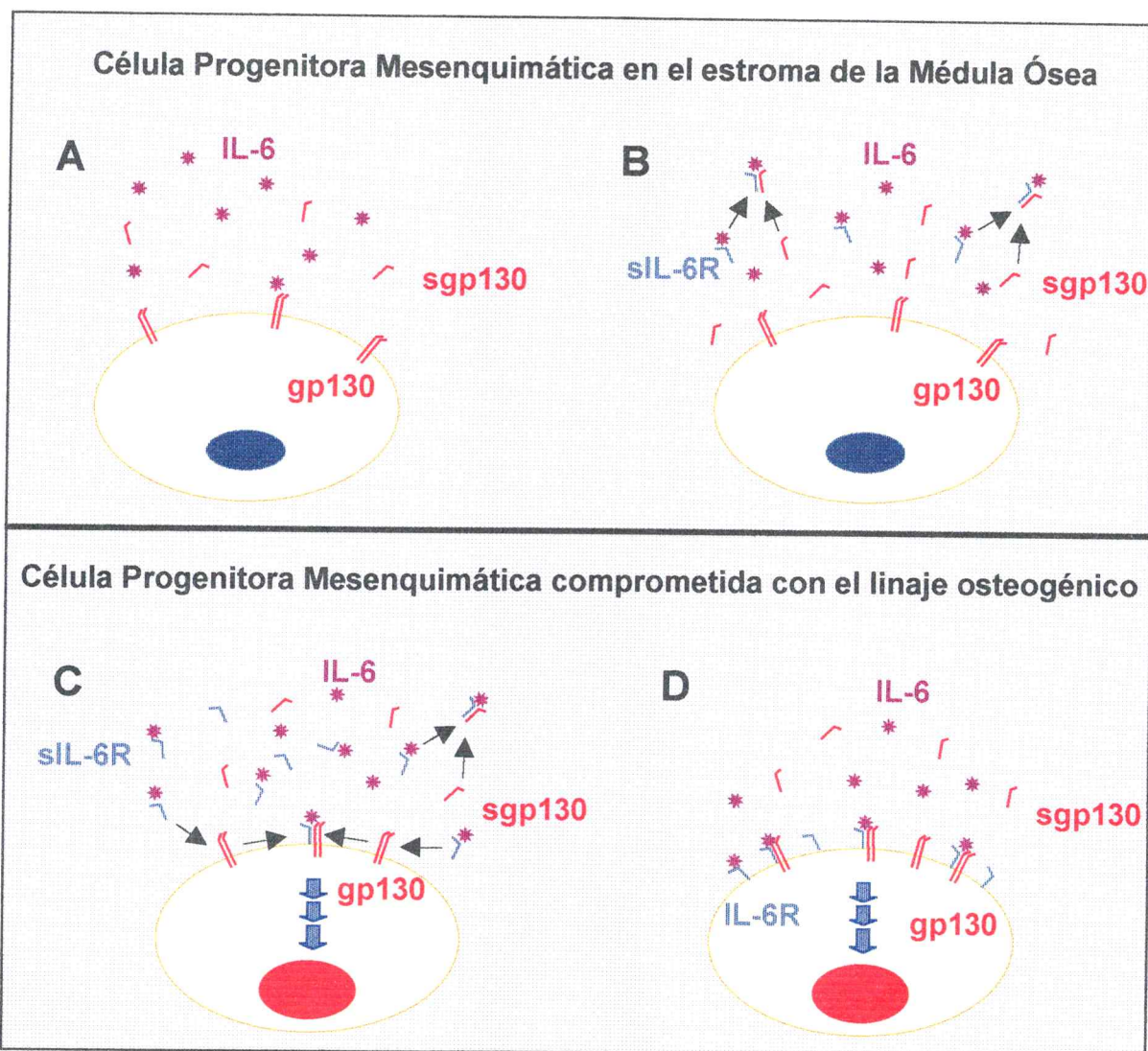


FIGURA 23: Efecto osteogénico de IL-6/sIL-6R en CPM: modelo de actividad biológica.

La actividad biológica de IL-6 sobre CPM estará condicionada por la biodisponibilidad de las subunidades de receptores IL-6R y gp130. En el estroma de la MO, la CPM se encontraría "protegida" del efecto osteogénico de IL-6 por la falta de expresión de IL-6R (A) y por la producción de sgp130 que actúa en forma antagonista a la actividad del complejo IL-6/sIL-6R (B). CPM comprometidas con el linaje osteogénico, movilizadas y localizadas en los sitios de neosíntesis ósea, podrán responder al estímulo osteogénico de IL-6 si encuentran sIL-6R en el microambiente (C) o en el proceso de diferenciación adquieren la capacidad de expresar IL-6R en la membrana (D). Estas condiciones no son excluyentes entre sí, pueden ser mecanismos complementarios e implican que durante el proceso de diferenciación osteogénica, la CPM adquiere la capacidad de responder a IL-6 que no posee en el estado de CPM no comprometida.

diferenciación. Estos tipos celulares podrán formar parte de microambientes específicos y aportar señales definidas a su entorno.

Adicionalmente a la producción de señales en el mismo tejido mesenquimático, también es posible postular la participación de otras provenientes de tejidos mesenquimáticos secundarios que "requieren" estimular la migración y diferenciación de precursores de su respectivo linaje. Tal podría ser el caso de sIL-6R, detectado en la sangre y cuya producción no ha sido detectada en células de la MO (Bellido y col, 1996; Heinrich y col, 1998). sIL-6R podría ser generado en un tejido secundario, ya sea para ser "exportado" a otros tejidos como la MO o para conformar un microambiente mesenquimático local en su tejido de origen.

CONCLUSIONES

Los resultados generados por esta tesis permiten concluir que:

- 1.- La sangre de cordón umbilical humana contiene células progenitoras mesenquimáticas, con capacidad de diferenciar *in vitro* a células de linajes osteogénico y adipogénico.
- 2.- Las células progenitoras mesenquimáticas de sangre de cordón umbilical pueden ser transducidas eficientemente por un vector adenoviral.
- 3.- Las células progenitoras mesenquimáticas de sangre de cordón umbilical pueden ser trasplantadas en un modelo murino, proceso que resulta seguro para el receptor, las células sobreviven en éste y pueden ser detectadas en distintos órganos luego de 6 meses de trasplantadas.
- 4.- Las células progenitoras mesenquimáticas de sangre de cordón umbilical y de médula ósea presentan características morfológicas, inmunofenotípicas y potencial de diferenciación similares. Sobre la base de esto, son poblaciones celulares equivalentes.
- 5.- Las células progenitoras mesenquimáticas producen citoquinas de la familia IL-6 y la subunidad gp130 del receptor de las citoquinas de esta familia.
- 6.- IL-6 no produce efectos sobre la proliferación y/o diferenciación de las células progenitoras mesenquimáticas. Sin embargo, la proliferación y diferenciación de células comprometidas con el linaje osteogénico si es

estimulada por IL-6, proceso regulado por la biodisponibilidad de sIL-6R y sgp130.

Las células progenitoras mesenquimáticas representan un atractivo blanco celular para el desarrollo de terapias biológicas o génicas dirigidas tanto al proceso mesenquimático como hematopoyético.

REFERENCIAS

Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G. 1993. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol* 12: 871-880.

Ailhaud G. Extracellular factors, signalling pathways and differentiation of adipose precursor cells. *Curr Opin Cell Biol* 2:1043-1049, 1990.

Almeida-Porada G, Flake AW, Glimp HA, Zanjani ED. 1999. Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero. *Exp Hematol* 27:1569-1575.

Aubert J, Dessolin S, Belmonte N, Li M, McKenzie FR, Staccini L, Villageois P, Barhanin B, Vernallis A, Smith AG, Ailhaud G, Dani C. 1999. Leukemia inhibitory factor and its receptor promote adipocyte differentiation via the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 274: 24965-24972.

Baxter MA, Wynn RF, Deakin JA, Bellantuono I, Edington KG, Cooper A, Besley GTN, Church HJ, Wraith J, Carr TF, Fairbairn LJ. 2002. Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I. *Blood* 99:1857-1859.

Bellido T, Stahl N, Farruggella TJ, Borba V, Yancopoulos GD, Manolagas SC. 1996. Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J Clin Invest*. 97:431-7.

Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. 1997. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 138: 3666-3676.

Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102: 341-351.

Bernard-Beaubois K, Hecquet C, Houcine O, Hayem G, Adolphe M. 1997. Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes. *Cell Biol Toxicol* 13: 103-113.

- Bianco P, Robey PG. 2001. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414: 118-121.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19: 180-192.
- Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P, Tura S. 1999. Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* 84: 1110-1149.
- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA. 1989. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3828-3832.
- Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. 1997a. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 21: 225-235.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. 1997b. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, 64: 278-294.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98:2396-2402.
- Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641-650.
- Caplan AI. 1994. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 21: 429-435.
- Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. 1997. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 342: 254-269.
- Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kappor N, Meyers P, Chiareri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56: 289-301.
- Chichester CO, Fernández M, Minguell JJ. 1993. Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblast. *Cell Adhes Commun* 1: 93-99.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3213-3218.

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

Conget P, Minguell JJ. 2000. Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp Hematol* 28: 382-390.

Conget PA, Allers C, Minguell JJ. 2001. Identification of a discrete population of human bone marrow-derived mesenchymal cells exhibiting properties of uncommitted progenitors. *J Hematother Stem Cell Res* 2001 10:749-758.

Coutinho LH, Gilleece MH, de Wynter EA, Will A, Testa NG. 1993. Clonal and long-term cultures using human bone marrow. *En N.G. Testa y G Molineux (eds.), Haemopoiesis A Practical Approach*, pp 83-86. IRL Press, New York.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44:1928-1942.

Denning-Kendall P, Donaldson C, Nicol A, Bradley B, Hows J. 1996. Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking. *Exp Hematol* 24:1394-1401.

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

Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. 2001. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents* 15: 28-37.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 743-754.

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

Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. 1997. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 20: 265-271.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-247.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4: 267-274.

Fukuda K. 2001. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 25: 187-193.

Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. 1993. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 82: 66-76.

Gimble JM, Morgan C, Kelly K, Wu X, Dandapani V, Wang CS, Rosen V. 1995. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 58:393-402.

Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. 1991. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop* 269: 274-283.

Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. 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.

Gordon MY, Riley GP, Watt SM, Greaves, MF. 1987. Compartmentalization of a hematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 326: 403-405.

Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. 1988. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 106: 2139-51.

Gronthos S, Simmons PJ. 1995. The growth factor requirements of STRO-1-positive human marrow stromal precursors under-deprived conditions in vitro. *Blood* 85: 929-940.

Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Yeon DS, Lee JJ, Kim HO, Cho YE. 2001. Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro. *Neuroreport* 12: 3523-3527.

Hall AK. 1983. Stem cell is a stem cell is a stem cell. *Cell* 33:11-12.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. 1992. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13: 69-80.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. 1996. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 166: 585-592.

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Scharper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334:297-314.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5: 309-313.

Johnstone B, Yoo JU. 1999. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop* 367: S156-62.

Juan G, Darzynkiewicz. 1998. Cell cycle analysis by flow and laser scanning cytometry. *En Cell Biology: A Laboratory Handbook, Vol 1*, Ed. JE Celis, Academic Press, San Diego, pp 261-274.

Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 6: 125-134.

Kimura A, Katoh O, Kuramoto A. 1988. Effects of platelet derived growth factor, epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on the growth of human marrow fibroblasts. *Br J Haematol* 69: 9-12.

Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 18: 307-316.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:10711-10716.

Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. 1997. Factors required for bone marrow fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 97: 561-570.

Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. 1995. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 16: 557-564.

Li KJ, Dilber MS, Abedi MR, Bjorkstrand B, Smith CI, Garoff H, Gahrton G, Xanthopoulos KG. 1995. Retroviral-mediated gene transfer into human bone marrow stromal cells: studies of efficiency and in vivo survival in SCID mice. *Eur J Haematol* 55: 302-306.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176: 57-66.

Minguell JJ, Conget P, Erices A. 2000. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res* 33:881-887.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 226: 507-520.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88: 287-298.

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.

Nishimura R, Moriyama K, Yasukawa K, Mundy GR, Yoneda T. 1998. Combination of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors induces differentiation and activation of JAK-STAT and MAP kinase pathways in MG-63 human osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 13: 777-785.

Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP, Gowen M. 1998. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic

phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res* 13: 371-382.

Orkin, SH. 1995 Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol* 17: 870-877.

Owen M. 1988. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10: 63-76

Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo M, Demer LL. 1999. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 14: 2067-2078.

Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. 1995. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4857-4861.

Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. 1999. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 75: 424-436.

Piersma AH, Ploemacher RE, Brockbank KG. 1983. Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *Br J Haematol* 54: 285-290.

Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brakel-van Peer KM, Visser PJ. 1985. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol* 13: 237-243.

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.

Potten CS, Loeffler M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 110:1001-1020.

Prockop, DJ. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 276: 71-74.

Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA. 1999. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res* 17: 900-908.

Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I. 1994. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 161: 218-228.

Roux S, Quinn J, Pichaud F, Orcel P, Chastre E, Jullienne A, De Vernejoul MC. 1996. Human cord blood monocytes undergo terminal osteoclast differentiation in vitro in the presence of culture medium conditioned by giant cell tumor of bone. *J Cell Physiol* 168: 489-498.

Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE. 1995. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 92: 10119-10122.

Sale GE, Storb R. Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. 1983. Evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 11: 961-966.

Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR. 2001. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 171: 109-115.

Satomura K, Derubeis AR, Fedarko NS, Ibaraki-O'Connor K, Kuznetsov SA, Rowe DW, Young MF, Gehron Robey P. 1998. Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 177: 426-438.

Shields LE, Andrews RG. 1998. Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. *Am J Obstet Gynecol* 178: 931-937.

Simmons PJ, Torok-Storb B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78: 55-62

Smith TH, Block NE, Rhodes SJ, Konieczny SF, Miller JB. 1993. A unique pattern of expression of the four muscle regulatory factor proteins distinguishes somitic from embryonic, fetal and newborn mouse myogenic cells. *Development* 117:1125-1133.

Stein GS, Lian JB. 1993. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 14:424-442.

Tavassoli M. Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells* 1: 269-281, 1991.

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002 105:93-98.

Urist MR, Terashima Y, Nakagawa M, Stamos C. 1978. Cartilage tissue differentiation from mesenchymal cells derived from mature muscle in tissue culture. *In Vitro* 14: 697-706.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18:1417-1426.

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287: 1442-1446, 2000.

Wyrsh A, dalle Carbonare V, Jansen W, Chklovskaja E, Nissen C, Surbek D, Holzgreve W, Tichelli A, Wodnar-Filipowicz A. 1999. Umbilical cord blood from preterm human fetuses is rich in committed and primitive hematopoietic progenitors with high proliferative and self-renewal capacity. *Exp Hematol* 27:1338-1345.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61: 364-370.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. 1998. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 16: 406-413.

Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ascensao JL, MacKintosh FR, Flake AW. 1997. Transplantation of hematopoietic stem cells in utero. *Stem Cells* 15 Suppl 1:79-92.

Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. 1997. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood* 90: 3471-3481.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-728.

ANEXOS

- ANEXO 1: **Erices A**, Conget P, Minguell JJ. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol* 109: 235-242.
- ANEXO 2: Minguell JJ, Conget P, **Erices A**. 2000. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res* 33:881-887.
- ANEXO 3: Minguell JJ, **Erices A**, Conget P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 226: 507-520.
- ANEXO 4: **Erices A**, Conget P, Rojas C, Minguell JJ. 2002. Signal through gp130 activated by soluble interleukin-6 receptor and interleukin-6, enhances osteoblastic differentiation of dexamethasone-stimulated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Manuscrito en revisión *Experimental Cell Research*.
- ANEXO 5: Fragmento del documento Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, preparado por el National Institute of Health, USA (Julio 2001), en el cual se consigna la descripción de la presencia de CPM-SCU como fruto del trabajo de esta tesis. Disponible en:
www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm
www.nih.gov/news/stemcell/appendixd.pdf (capítulo)

Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood

ALEJANDRO ERICES,¹ PAULETTE CONGET¹ AND JOSÉ J. MINGUELL^{1,2} ¹Unidad de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile, Santiago, and ²Unidad de Trasplante de Médula Osea, Clínica Las Condes, Santiago, Chile

Received 28 September 1999; accepted for publication 11 December 1999

Summary. Haemopoiesis is sustained by two main cellular components, the haematopoietic cells (HSCs) and the mesenchymal progenitor cells (MPCs). MPCs are multipotent and are the precursors for marrow stroma, bone, cartilage, muscle and connective tissues. Although the presence of HSCs in umbilical cord blood (UCB) is well known, that of MPCs has been not fully evaluated. In this study, we examined the ability of UCB harvests to generate in culture cells with characteristics of MPCs. Results showed that UCB-derived mononuclear cells, when set in culture, gave rise to adherent cells, which exhibited either an osteoclast- or a mesenchymal-like phenotype. Cells with the

osteoclast phenotype were multinucleated, expressed TRAP activity and antigens CD45 and CD51/CD61. In turn, cells with the mesenchymal phenotype displayed a fibroblast-like morphology and expressed several MPC-related antigens (SH2, SH3, SH4, ASMA, MAB 1470, CD13, CD29 and CD49e). Our results suggest that preterm, as compared with term, cord blood is richer in mesenchymal progenitors, similar to haematopoietic progenitors.

Keywords: cord blood, mesenchymal progenitors, osteoclasts, cell culture.

Haemopoiesis is sustained by two main cellular components, the haematopoietic cells (HSCs) and the mesenchymal progenitor cells (MPCs) (Tavassoli & Minguell, 1991; Orkin, 1995). MPCs, which are different from the 'typical' haematopoietic stromal cells (Chichester *et al.*, 1993; Majumdar *et al.*, 1998), are multipotent and serve as long-lasting precursors for bone marrow stromal cells, bone, cartilage, muscle and connective tissue (Prockop, 1997; Ferrari *et al.*, 1998; Conget & Minguell, 1999; Pittenger *et al.*, 1999). During development, the migratory nature of the haematopoietic process implies that both cellular components should be able to mobilize through the blood, thus allowing the transit of haemopoiesis from an immature into a more mature haematopoietic site (Tavassoli, 1991).

The circulatory capacity of the haematopoietic stem cell is well documented in adults by transplantation studies and supported by the observation that these cells circulate in umbilical cord blood (Rubinstein *et al.*, 1995; Wyrsch *et al.*, 1999) and, under certain circumstances, in peripheral blood (Siena *et al.*, 1989). In turn, although direct evidence for the presence of MPCs in the blood does not exist, the observation that after transplantation MPCs functionally engraft in the marrow (Horwitz *et al.*, 1999) has been considered as proof of their circulatory and homing

capacity. In addition, mesenchymal progenitors have been shown to circulate in cytokine-mobilized blood of cancer patients (Fernández *et al.*, 1997).

As there is no information on whether mesenchymal progenitor cells circulate in umbilical cord blood (UCB), in this study we evaluated the ability of human UCB harvests to give rise *in vitro* to a population of cells exhibiting the characteristics of mesenchymal progenitors.

MATERIALS AND METHODS

Cord blood harvest and preparation of adherent cells. Cord blood harvests were obtained, with the mother's consent, from preterm and term deliveries at the time of birth from Hospitales Barros Luco-Trudeau and Del Salvador, Santiago. After removal of the placenta, blood was allowed to drain from the severed end of the cord into glass bottles containing 10 ml of M-199 culture medium with 250 U/ml of preservative-free heparin. In all cases, blood samples were processed ≤ 24 h after harvest. From each blood harvest, aliquots were set apart for routine haematological analysis (Cell-Dyn 3500 System, Abbott) and for immunophenotyping of haematopoietic progenitors.

Cord blood cells were separated into a low-density fraction (Hystopaque-1077; Sigma, St. Louis, USA) and mononuclear cells were washed, suspended in culture medium [α -MEM containing 20% fetal bovine serum (FBS) and

Correspondence: Dr Alejandro Erices, Unidad de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile, Casilla 138, Santiago 11, Chile. E-mail: aeric@uec.inta.uchile.cl

Table 1. Characteristics of umbilical cord blood harvests.

Parameter	Median	Range
Gestational age (weeks)	38	32-41
WBC ($\times 10^9/l$)	13	6-22
MNCs (%)	49	31-65
HCT (%)	49	37-68
Platelets ($\times 10^9/l$)	200	67-353
CD34 ⁺ CD38 ⁻ ($\times 10^6/l$)	76	23-146
CD34 ⁺ CD38 ⁺ ($\times 10^6/l$)	14	2-3-71
CD34 ⁻ CD38 ⁻ ($\times 10^6/l$)	60	0-120

WBC, white blood cell count; MNCs, mononuclear cells; HCT, haematocrit.

80 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin sulphate; Gibco BRL, NY, USA seeded (T-25 flasks and 35-mm dishes) at a concentration of 1×10^6 cells/cm². Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, with a change of culture medium every 7 d. Cells in the developed adherent layer were used for the experiments described. All determinations hereafter described were performed on the respective cell cultures originating from at least five blood harvests.

Cytochemical characterization. Cells *in situ* were analysed for the following cytochemical markers: acid phosphatase, alkaline phosphatase, periodic acid-Schiff, sudan black B, naphthol AS-D chloroacetate esterase and α -naphthyl

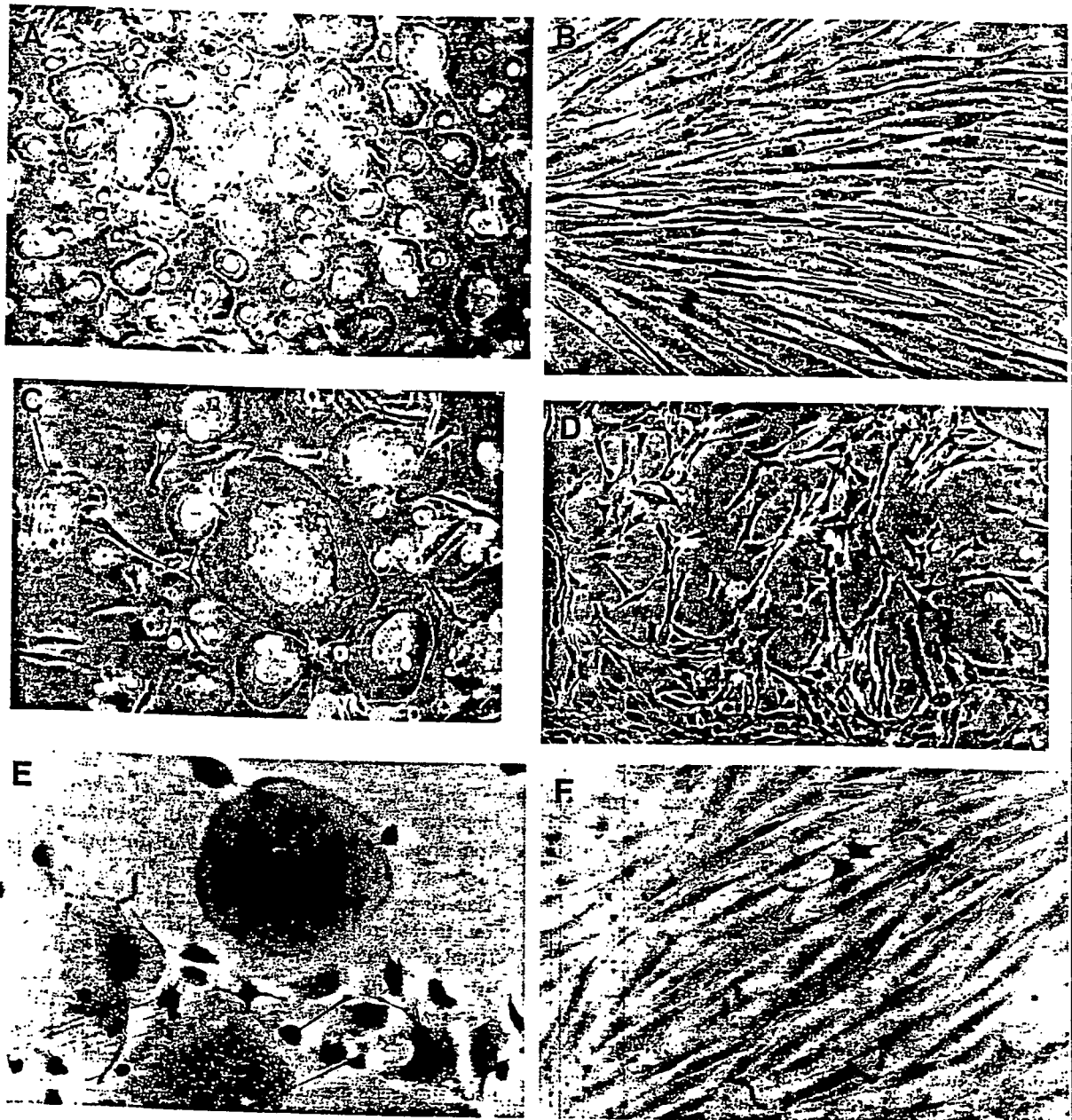


Fig 1. Photomicrographs showing adherent cells from cultures of UCB. Photomicrographs, taken after 30 d in culture, show osteoclast-like (C and E) and mesenchymal-like (B, D and F) cells. (A-D) Unstained cells, as visualized by phase contrast microscopy. (E and F) Cells stained for TRAP and PAS respectively. Magnification: A and D, 100 \times ; B, C, E and F, 200 \times .

Table II. Cytochemical characteristics of osteoclast-like cells (OLCs) or mesenchymal-like cells (MLCs).

Cell type	TRAP	AP	NSE	PAS	SBB	Alk.P	SE
OLCs	+	+	+	-	-	-	-
MLCs	-	-	+	+	-	-	-

Cultures containing each type of cells (day 30) were stained *in situ* for: TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase; AP, acid phosphatase; NSE, non-specific α -naphthyl acetate esterase; PAS, periodic acid-Schiff; SBB, sudan black B; Alk.P, alkaline phosphatase; SE, specific naphthol AS-D chloroacetate esterase.

+ , - indicate that $\geq 90\%$ of cells were either positive or negative for each marker.

acetate esterase. In all cases, analyses as well as the selection of positive and negative controls were performed according to the manufacturer's guidelines (Sigma Diagnostics Kits).

Immunophenotyping of UCB or cultured adherent cells. To detect surface antigens, aliquots of fresh UCB or cultured adherent cells after detachment with 0.25% EDTA were washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% FBS. To detect intracellular antigens, cultured adherent cells were detached with 0.25% trypsin, washed with PBS and permeabilized with 70% ethanol (10 min at 4°C). For direct assays, cells were immunolabelled with the following anti-human antibodies: CD13-PE, CD31-FITC, CD54-PE, CD90-FITC, CD51/CD61-FITC (Pharmingen, Los Angeles, CA, USA), CD14-PE, CD38-FITC, CD34-PE (Dako,

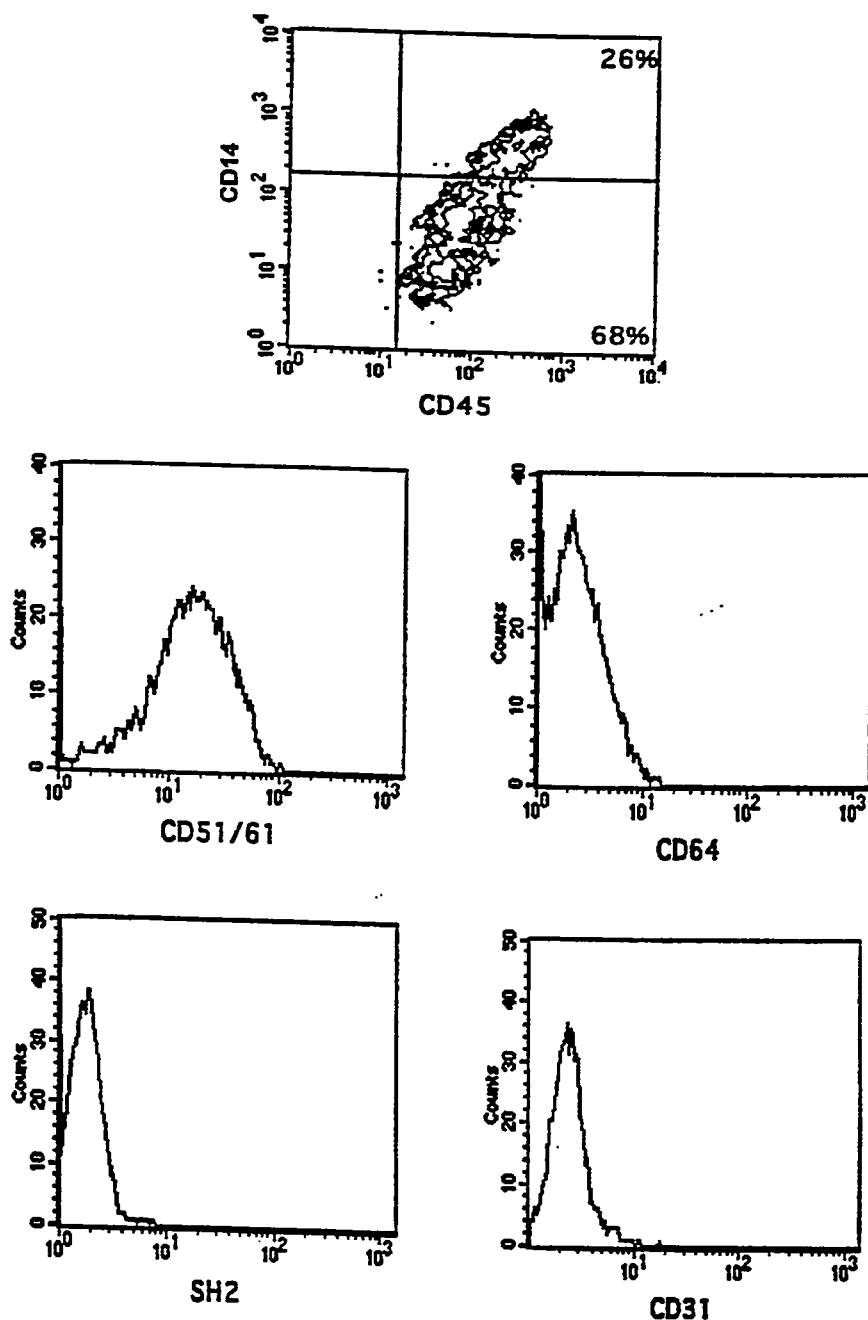


Fig 2. Immunocharacterization of osteoclast-like cells. After 5 weeks in culture, OLCs were detached with EDTA, labelled with monoclonal antibodies and enumerated by flow cytometry. Data show contour plot analysis for CD14/CD45 and histograms for CD51/CD61, CD64, SH2 and CD31 expression. Mean intensity of fluorescence of the respective control antibodies was ≤ 5 (not shown).

Glostrup, Denmark). CD29-FITC. CD45-PerCP. CD49d-PE. CD49e-FITC. CD64-FITC (Becton Dickinson, San José, CA, USA) and/or CD106-FITC (R & D Systems, Abingdon, UK). As controls, mouse IgG₁-PE, IgG₁-FITC, IgG₁-perCP or IgG_{2a}-PE (Becton Dickinson) were used. For indirect assays, cells were immunolabelled with the following anti-human antibodies: SH2, SH3, SH4 (Osiris Therapeutics, Baltimore, MS, USA), von Willebrand factor (Pharmingen), α -smooth muscle actin, ASMA (Sigma) or MAB1470 (Chemicon, Temecula, CA, USA). As secondary antibodies, anti-mouse IgG_{wm}-FITC or -PE (Sigma) were used. Labelled cells were analysed either by epifluorescence microscopy or by flow cytometry. In the latter case, 10 000 events were acquired and analysed in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) using the CELLQUEST software. Note that antibodies against the antigens SH2, SH3, SH4, ASMA and MAB 1470 have been widely utilized to characterize marrow-derived mesenchymal progenitor cells (Conget & Minguell, 1999; Pittenger *et al.* 1999).

Proliferation studies. Adherent cells, after detachment with trypsin, were seeded (20×10^3 cells/ml) in culture medium. At selected time intervals, the total number of viable cells was counted and expressed as fold increase over the starting cell number, which was set to 1.

Cell cycle analysis and quantification of quiescent cells. For cell cycle analysis, cells were permeabilized and labelled with 10 μ g/ml propidium iodide (Sigma), followed by treatment with 100 μ g/ml RNase A (Sigma) (Conget & Minguell, 1999). DNA content was analysed in a FACScan flow cytometer by using the MODFIT software. For assessment of quiescent cells, adherent cells were trypsinized, permeabilized and their RNA and DNA content evaluated by flow cytometry after staining with acridine orange. Under these conditions, quiescent cells (G0) are characterized by minimal RNA content and uniform DNA content (Juan & Darzynkiewicz, 1998; Conget & Minguell, 1999).

Differentiation of mesenchymal-like cells into osteoblasts and adipocytes. For these studies, cells were cultured either in an osteogenic (0.1 μ M dexamethasone, 10 mM β -glycerol phosphate and 50 μ M ascorbate) (Jaiswal *et al.* 1997) or adipogenic (1 μ M dexamethasone, 5 μ g/ml insulin, 0.5 mM isobutylmethylxanthine and 60 μ M indomethacin) (Dennis *et al.* 1999) medium. The onset of osteoblasts was evaluated by the expression of alkaline phosphatase (Pittenger *et al.* 1999) or by calcium accumulation (von Kossa staining) (Jaiswal *et al.* 1997). The presence of adipocytes was assessed by the cellular accumulation of neutral lipid vacuoles that stained with Oil red O (Conget & Minguell, 1999).

RESULTS

Characteristics of cord blood harvests used for the in vitro growth of adherent cells.

Thirty-one cord blood harvests were entered and analysed in this study. As seen in Table I, the median values for the haematological parameters analysed were in close agreement with those reported for UCB collections for banking purposes (Beguin *et al.* 1995; Denning-Kendall *et al.* 1996).

UCB from donors with a wide range of gestational ages (41 weeks) were included to establish whether gestational age correlates with the potential of UCB to develop adherent cells *in vitro*.

Morphological characteristics of primary cultures of UCB-derived adherent cells.

UCB-derived mononuclear cells were set in culture and onset of an adherent layer was monitored continuously; day 15 of culture, 29 out of 31 cord blood harvests produced an adherent layer, which remained as such after regular changes of the medium.

From 76% of the cord blood specimens analysed, evolved adherent layer was formed by a heterogeneous population of cells. Based on the morphology of the most abundant phenotype present (Fig 1A and C), cells in this group of cultures were termed osteoclast-like cells (OLCs). In 24% of the UCB samples evaluated, the adherent layer contained a homogeneous population of cells showing a fibroblastoid morphology (Fig 1B and D). Cells in

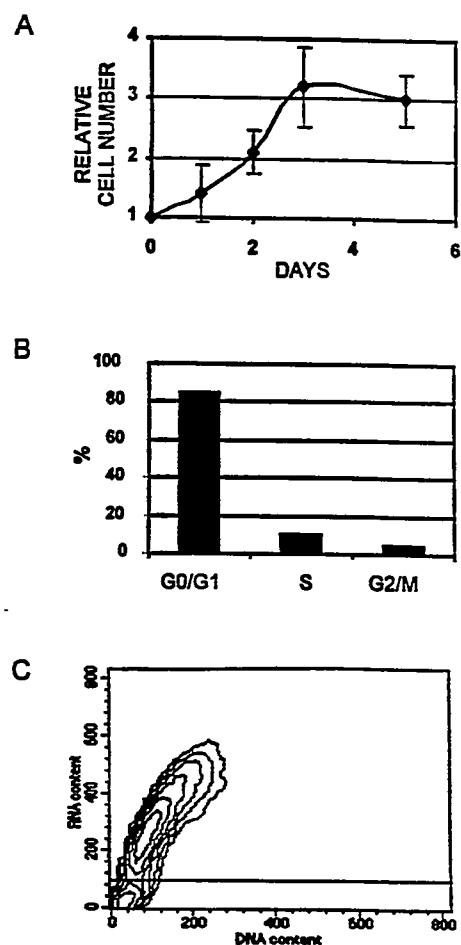


Fig 3. Proliferation and cell cycle analysis of mesenchymal cells. Proliferation studies (A), cell cycle analysis (B) and assessment of quiescent (G0) cells (C) were carried out as indicated in the text. For analysis of quiescent cells, quadrant determinations (shown) were performed as previously described (Conget & Minguell, 1999).

group of cultures were termed mesenchymal-like cells (MLCs).

Characteristics of osteoclast-like cells

The morphology of OLCs was heterogeneous. Microscopic examination revealed cells with an elongated or oval/round shape with smooth borders, showing in certain cases cytoplasmic extensions. Usually, the cells were in contact with each other, however the most remarkable feature was the presence of multinucleated cells with nuclei congregated around a central area. After 3 weeks in culture, the multinucleated cells tended to predominate over the elongated and small rounded cells (Fig 1C) and reached a

semiconfluent condition after 4 weeks. By subcultivation, these cells gave rise again to multinucleated cells, however their proliferation capacity was limited.

As seen in Table II, more than 90% of OLCs were strongly positive for tartrate-resistant acid phosphatase (Fig 1E), acid phosphatase and α -naphthyl acetate esterase activity, but negative for periodic acid-Schiff, sudan black B, alkaline phosphatase and naphthol AS-D chloroacetate esterase activities. As detected by flow cytometry (Fig 2), although all OLCs expressed the common leucocyte antigen CD45, only a subpopulation expressed the monocyte-macrophage antigen CD14. Together, OLCs expressed the osteoclast-related antigen CD51/CD61 (vitronectin receptor), but did

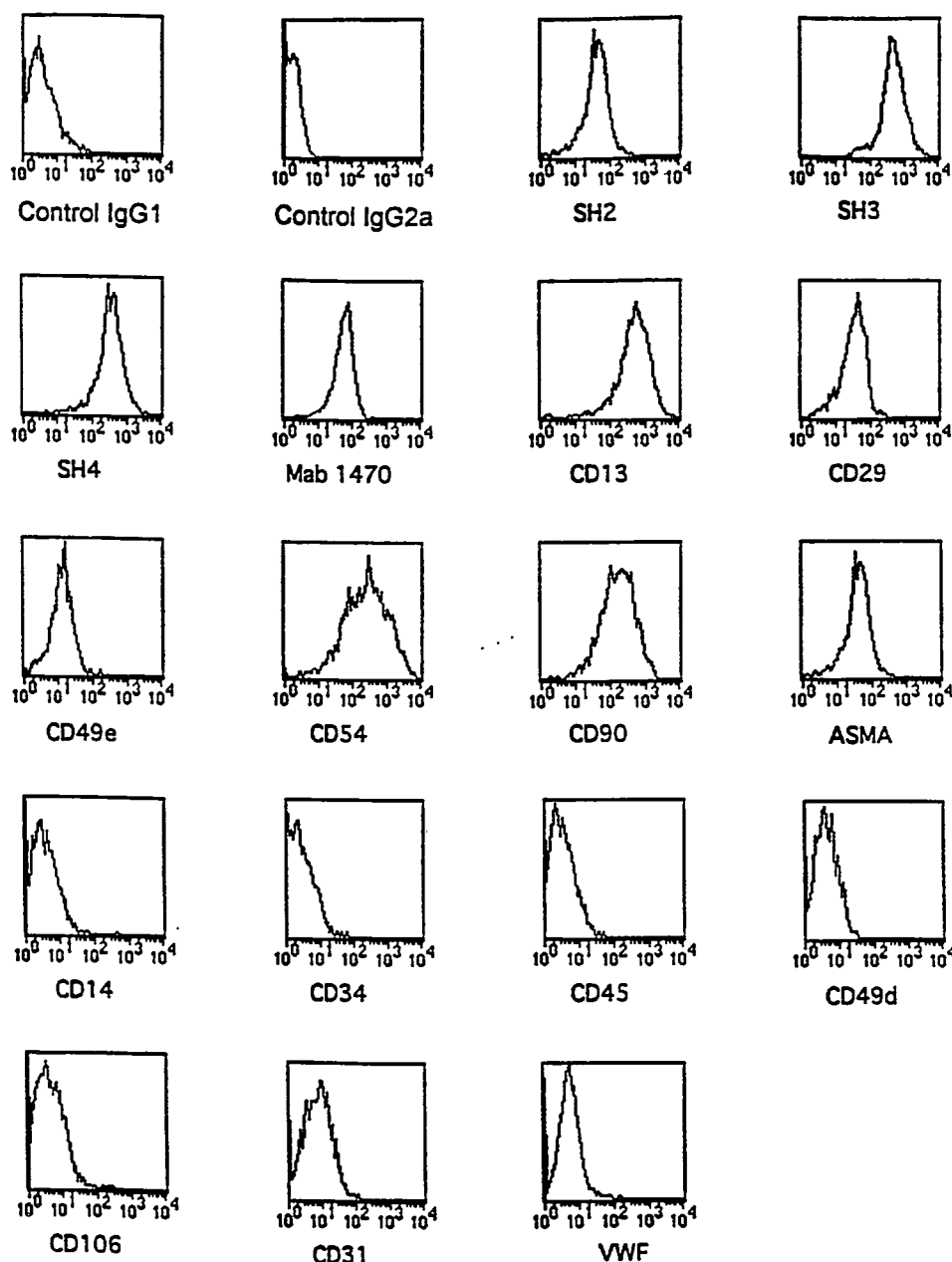


Fig 4. Immunocharacterization of mesenchymal-like cells. MLCs were detached with EDTA, labelled with monoclonal antibodies and enumerated by flow cytometry. Relative number of cells (counts) is presented vs. fluorescence intensity.

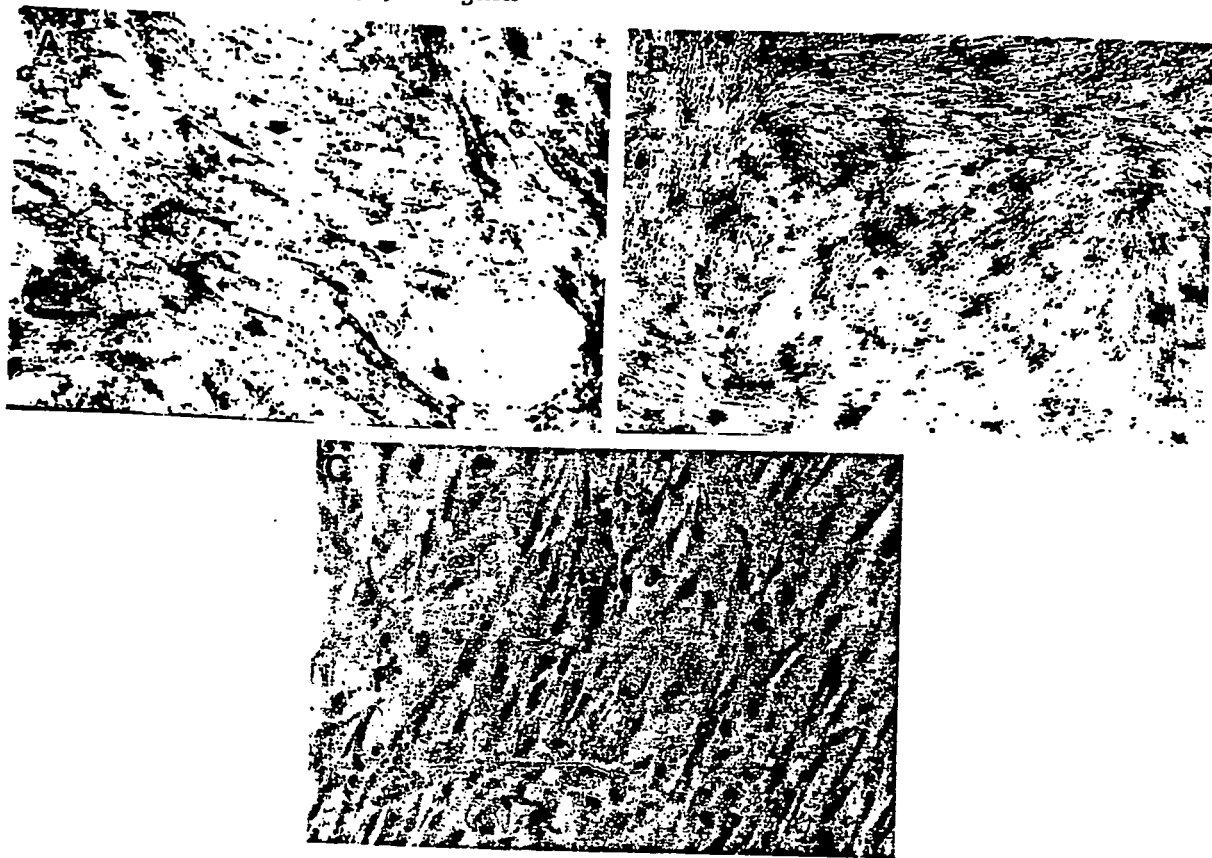


Fig 5. Differentiation potential of mesenchymal-like cells. As described in the *MATERIALS and METHODS* section, cultures of MLCs were exposed to osteogenic or adipogenic medium. Appearance of osteoblasts was detected (day 7) by either alkaline phosphatase expression (thick arrow) or by matrix mineralization (A and B, thin arrows). Adipocytes were detected (day 15) by accumulation of lipid drops, that stain with Oil red O (C, thick arrow). Magnification: A and C, 200 \times ; B, 40 \times . Note that before the addition of the switch medium, cells appeared as shown in Fig 1D.

not express the macrophage-polykaryon (CD64)-, the mesenchymal (SH2)- or the endothelial (CD31)-related antigens (Fig 2).

Characteristics of mesenchymal-like cells

Primary cultures of MLC mainly consisted of colonies of bipolar fibroblastoid cells (Fig 1D) which, after subcultivation, proliferated with a population-doubling time of 48 h and reached a confluent growth-arrested condition (Fig 3A). In primary cultures, the MLC frequency varied from one harvest to another, however in each UCB sample the average number of MLC colonies (day 15) for 25×10^6 UCB-derived mononuclear cells was 7 ± 3 .

Cell cycle analysis (at log phase of growth) indicated that $\geq 85\%$ of the cells were in the G0/G1 phases (Fig 3B). Analysis to detect quiescent cells revealed that 5% of all MLCs displayed a pattern of RNA and DNA staining which is distinctive for G0 cells (Fig 3C).

Cytochemical analysis (Table II) revealed that MLCs were strongly positive for α -naphthyl acetate esterase and periodic acid-Schiff (Fig 1F), but were negative for all the other cytochemical markers assessed. The immunophenotype of these cells (Fig 4), as studied by flow cytometry, disclosed the homogeneous expression of the mesenchymal-related antigens SH2, SH3 and SH4. Together, MLCs were

positive for an antigen (detected by MAB 1470) which, although expressed by endothelial cells was also expressed by mesenchymal cells (Conget & Minguell, 1999). MLCs expressed antigens CD13, CD29, CD49e, CD54 and CD59 and α -smooth muscle actin (ASMA), but did not express antigens CD14, CD34, CD45, CD49d and CD106. In addition, MLCs did not express the endothelial-related antigens CD31 and von Willebrand factor.

Further characterization studies performed on MLCs revealed a potential to differentiate into osteoblasts and adipocytes. Thus, after switching MLCs from the regular culture medium into an osteogenic medium, cells with an osteoblast-like phenotype evolved, as judged by the expression of alkaline phosphatase (Fig 5A) and by the deposition of mineralized matrix (Fig 5B). Moreover, when MLCs were exposed to an adipogenic medium, cells differentiated into adipocytes which displayed a perinuclear accumulation of lipid vacuoles, as detected by phase-contrast microscopy or by staining with Oil red O (Fig 5C). The above features were not observed in MLC cultures grown in regular culture medium.

DISCUSSION

Our results show that UCB-derived mononuclear cells, when cultured in a medium containing only FBS, were able

generate adherent cells. However, we found that the nature of the adherent cells was not the same in all cases, but exhibited either an osteoclast- or a mesenchymal-like phenotype, each one characterized by the following features. First, approximately 75% of the cord blood collections gave rise to cultures of adherent cells (OLCs), which displayed the morphology and characteristics of multinucleated osteoclasts. OLCs expressed several markers of osteoclasts, such as a strong tartrate-resistant acid phosphatase activity and expression of antigens CD45 and CD51/CD61 (Udagawa *et al.* 1990; Suda *et al.* 1992). Together, these cells did not express antigens related to the macrophage-polykaryon (Quinn *et al.* 1995), mesenchymal (Conget & Minguell, 1999) or endothelial (Schwachula *et al.* 1994) lineages. In primary cultures of OLCs, we found within CD45⁺ cells a subset that also expressed the monocyte-macrophage antigen CD14. However, the percentage of these cells decreased with cultivation time (53% and 26% at weeks 3 and 5 respectively; data not shown). The decrease in the number of CD45⁺CD14⁺ cells was coincident with the microscopic observation of a time-dependent enrichment in multinucleated cells (Fig 1C). Thus, the above characteristics strongly suggested that cells in the osteoblast-like cultures correspond to osteoclasts and/or their progenitors.

Second, almost 25% of cord blood harvests gave rise to an adherent layer, initially formed by individual cells or colonies of a few cells, which rapidly gave rise to a well-established layer of fibroblastoid (MLC) cells. The rapid growth of these cells seemed to be sustained by a population of (self-renewing?) quiescent (G0) cells. MLCs expressed several mesenchymal progenitor-related antigens, such as SH2, SH3, SH4, ASMA, MAB 1470, CD13, CD29, CD49e and CD54 (Bendall *et al.* 1993; Conget & Minguell, 1999; Pittenger *et al.* 1999). In contrast, they did not express myeloid or endothelial antigens. In addition, MLCs upon proper stimulation could be differentiated into other mesenchymal lineages, such as osteoblasts and adipocytes. Thus, in the presence of dexamethasone, β -glycerol phosphate and ascorbate, MLCs expressed bone cell markers such as alkaline phosphatase and formed mineralizing colonies (Jaiswal *et al.* 1997; Conget & Minguell, 1999). Moreover, MLCs exposed to a defined adipogenic medium for 15 d gave rise to foci of cells containing large lipid droplets that stained positively with Oil red O. Thus, the immunophenotype and functional properties displayed by cord blood-derived MLCs resembled very closely the characteristics assigned to bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells (Galmiche *et al.* 1993; Conget & Minguell, 1999; Pittenger *et al.* 1999).

Our results showing that mature osteoclasts or their progenitors circulate in umbilical cord blood are not without precedent (Roux *et al.* 1996). However, to our knowledge, this is the first report documenting that in umbilical cord blood the presence of cells can generate MLCs upon culture. The presence of mesenchymal progenitor cells in cord blood is justified because it can be hypothesized that both haematopoietic and mesenchymal progenitors are travelling, via cord blood, from early fetal haematopoietic

Table III. Correlation between gestational age and CD34 content of cord blood harvests with the development of cells showing either the MLC- or the OLC- phenotype.

Cord blood characteristics	Type of culture* (number of cultures obtained for each type)	
	MLC	OLC
Gestational age (weeks)		
32-36	5	3
37-41	2	19
CD34 content (%)		
< 0.5	1	15
≥ 0.5	6	7

* Total number of UCB analysed, 29; MLC-positive cultures, 7; OLC-positive cultures, 22.

sites to the newly formed bone marrow (Tavassoli, 1991; Péault, 1996).

Despite the relatively low number of UCB harvests that developed into MLCs in this study, our results suggest that preterm, as compared with term, cord blood is richer in mesenchymal progenitors, as occurs with haematopoietic progenitors (Shields & Andrews, 1998; Wyrsh *et al.* 1999). The above seems to be supported by the observed correlation between the characteristics of cord blood (gestational age and CD34 content) and the frequency of emergence of MLC-like cultures (Table III).

Based on their large *ex vivo* expansion capacity as well as on their differentiation potential, cord blood-derived mesenchymal progenitor cells can be visualized as attractive targets for cellular or gene transfer therapeutic options.

ACKNOWLEDGMENTS

A.E. thanks Diego F. Erices Contreras, his first son, for donating the most beloved UCB harvest. We thank Drs A. Pereira, J. Lira and J. Palma (Hospitales Barros-Luco Trudeau and Del Salvador, Santiago, Chile) for help with cord blood collections. We also thank Mrs. V. Simon (Clínica Las Condes, Santiago) for flow cytometry support. This work was supported by grants FONDECYT-Chile (2980017 and 8970028) and ICGEB-Italy (97/009). A.E. and P.C. are doctoral fellows from CONICYT (Chile) and Fundación Andes (Chile) respectively.

REFERENCES

- Beguín, Y., Cornu, G., Brichard, B., Joris, I., Lefèvre, P., Massy, M., Paulus, J.-M., Raymakers, N., Schaaps, J.-P., Sondag, D., Van Canwerge, J.-R., Vermynen, C. & Strijckmans, P. (1995) The Belgian Cord Blood Banking Project: hematological results and practical issues (Abstract). *Blood*, 86, 116a.
- Bendall, L.J., Kortlepel, K. & Gottlieb, D.J. (1993) Human acute myeloid leukemia cells bind to bone marrow stroma via a combination of β -1 and β -2 integrin mechanisms. *Blood*, 82, 3125-3132.
- Chichester, C.O., Fernández, M. & Minguell, J.J. (1993) Extracellular

- matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhesion and Communication*, 1, 93-99.
- Conget, P. & Minguell, J.J. (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*, 181, 67-73.
- Denning-Kendall, P., Donaldson, C., Nicol, A., Bradley, B. & Hows, J. (1996) Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking. *Experimental Hematology*, 24, 1394-1401.
- Dennis, J.E., Merriam, A., Awadallah, A., Yoo, J.U., Johnstone, B. & Caplan, A.I. (1999) A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14, 700-709.
- Fernández, M., Simon, V., Herrera, G., Cao, C., Del Favero, H. & Minguell, J.J. (1997) Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplantation*, 20, 265-271.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. & Mavilio, F. (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279, 1528-1530.
- Galmiche, M.C., Kotliansky, V.E., Brière, J., Hervé, P. & Charbord, P. (1993) Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, 82, 66-76.
- Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Fitzpatrick, L.A., Koo, W.W.K., Gordon, P.L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J.C., Pyeritz, R.E. & Brenner, M.K. (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine*, 5, 309-313.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I. & Bruder, S.P. (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cell Biochemistry*, 64, 295-312.
- Juan, G. & Darzynkiewicz, Z. (1998) Cell cycle analysis by flow and laser scanning cytometry. In: *Cell Biology: a Laboratory Handbook*, Vol. 1 (ed. by J.E. Celis), pp. 261-274. Academic Press, San Diego.
- Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M. & Gerson, S.L. (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MPCs) and stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 176, 57-66.
- Orkin, S. (1995) Hematopoiesis: how does it happen? *Current Opinion in Cell Biology*, 7, 870-877.
- Péault, B. (1996) Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited. *Journal of Hematology*, 5, 369-378.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, C.B., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. & Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147.
- Prockop, D.J. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-74.
- Quinn, J.M.W., Puddle, B., West, L., McGee, J. & Athanasou (1995) Myeloid antigens on osteoclasts and macrophage karyons. *Leucocyte Typing, V. White Cell Differentiation* gens. Proceedings of the Fifth International Workshop Conference held in Boston, USA, Vol. 1 (ed. by S.F. Schloss), pp. 1012-1013. Oxford University Press, New York.
- Roux, S., Quinn, J., Pichaud, F., Orcel, P., Chastre, E., Jullienne De Vernejoul, M.C. (1996) Human cord blood mononuclear cells undergo terminal osteoclast differentiation in vitro in the presence of culture medium conditioned by giant cell tumor of bone. *Journal of Cellular Physiology*, 168, 489-498.
- Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield, R.E., Adamson, M., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Taylor, P.E. & Stevens, R. (1995) Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 10119-10122.
- Schwachula, A., Riemann, D., Kehlen, A. & Lagner, J. (1998) Characterization of the immunophenotype and functional properties of fibroblasts and umbilical vein endothelial cells. *Immunology*, 190, 67-92.
- Shields, L.E. & Andrews, R.G. (1998) Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in cord blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 179, 931-937.
- Siena, S., Bregni, M., Brando, B., Ravagnani, F., Bonadonna, G., Gianni, A.M. (1989) Circulation of CD34+ hematopoietic cells in the peripheral blood high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 73, 1905-1914.
- Suda, T., Takahashi, N. & Martin, J. (1992) Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Reviews*, 13, 66-80.
- Tavassoli, M. (1991) Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells*, 1, 269-281.
- Tavassoli, M. & Minguell, J.J. (1991) Homing of hematopoietic progenitor cells to the marrow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 196, 367-373.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasagawa, I., Tetsu, N., Koga, T., Martin, T.J. & Suda, T. (1990) Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 7260-7264.
- Wyrsch, A., dalle Carbonare, V., Jansen, W., Chklovskaya, E., Niggli, V., Surbek, D., Holzgreve, A., Tichelli, A. & Wodnar-Fillipowitsch, I. (1999) Umbilical cord blood from preterm human fetuses contains committed and primitive hematopoietic progenitors with proliferative and self-renewal capacity. *Experimental Hematology*, 27, 1338-1345.

Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells

J.J. Minguell^{1,2},
P. Conget¹
and A. Erices¹

¹Laboratorio de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile, and
²Laboratorio de Transplante de Médula Ósea, Clínica Las Condes, Santiago, Chile

Abstract

Within the complex cellular arrangement found in the bone marrow stroma there exists a subset of nonhematopoietic cells referred to as mesenchymal progenitor cells (MPC). These cells can be expanded *ex vivo* and induced, either *in vitro* or *in vivo*, to terminally differentiate into at least seven types of cells: osteocytes, chondrocytes, adipocytes, tenocytes, myotubes, astrocytes and hematopoietic-supporting stroma. This broad multipotentiality, the feasibility to obtain MPC from bone marrow, cord and peripheral blood and their transplantability support the impact that the use of MPC will have in clinical settings. However, a number of fundamental questions about the cellular and molecular biology of MPC still need to be resolved before these cells can be used for safe and effective cell and gene therapies intended to replace, repair or enhance the physiological function of the mesenchymal and/or hematopoietic systems.

Key words

- Mesenchymal progenitor cells
- Transplantation
- Differentiation

Correspondence

J.J. Minguell
Laboratorio de Biología Celular
INTA, Universidad de Chile
Casilla 138-11
Santiago
Chile
Fax: +56-2-221-4030
E-mail: jminguell@uec.inta.uchile.cl

Research supported in part by Fondecyt (Chile) to J.J. Minguell (No. 8970028), to P. Conget (No. 2970016) and to A. Erices (No. 2980017), and International Center for Genetic Engineering and Biotechnology to J.J. Minguell (No. CRP/CHI97-01 (a1)). P. Conget and A. Erices are recipients of doctoral fellowships from Fundación Andes and Conicyt, respectively.

Origin of the concept of bone marrow-derived mesenchymal progenitors

The work initiated by Friedenstein and collaborators (1) provided definitive evidence that bone marrow contains, in addition to the hematopoietic progenitors, a population of spindle-shaped clonogenic fibroblast precursor cells or fibroblast colony-forming units (CFU-F). These cells, which were defined *in vivo* as quiescent resting cells, after proper *in vitro* stimulation can enter the cell cycle and develop colonies that resemble small deposits of bone or cartilage (2). Since CFU-F exhibit a high ability for self-renewal and multipotentiality, it was speculated that these "marrow stromal stem cells" were the pre-

cursors of a number of different mesenchymal cell lineages (3,4). Thus, the concept that the marrow stromal moiety was part of a wider stromal mesenchymal system in adult organisms was developed.

Data related to the number and hierarchy of cell lineages belonging to the stromal mesenchymal system, in addition to a substantial progress in the understanding of the differentiation process and the characterization of the evolving phenotypes, open perspectives for the use of these "marrow stromal stem cells" in cellular or genetic therapies for mesenchymal disorders (5,6). In this review we will highlight in a rather selective manner the current knowledge on this stromal mesenchymal system.

The term CFU-F or marrow stromal fi-

Received April 3, 2000
Accepted May 3, 2000

broblasts (7) has been gradually abandoned and replaced by diverse, still indistinct denominations, like marrow stromal cells (5), mesenchymal stem cells (4), or mesenchymal progenitor cells (MPC) (8). Nevertheless, in all cases reference is made to a particular adherent cell type evolving from bone marrow-derived low density mononuclear cells, cultured in a classical medium supplemented only with selected batches of fetal bovine serum. Cells thus developed, which hereafter will be referred to as MPC, display a fibroblast-like morphology, can be expanded *ex vivo* and present a potential to terminally differentiate into at least seven types of cells: osteocytes, chondrocytes, adipocytes, tenocytes, myotubes, astrocytes and hematopoietic-supporting stroma (7,9-16). We should emphasize that the denomination "marrow stromal cells" has also been used for monolayers of long-term marrow stroma or Dexter-type cultures (17). However, culture conditions, evolving phenotypes, differentiation potential and secretion products of the above cells are not analogous to those of MPC, but are in fact quite dissimilar (18,19).

Characteristics of MPC

Human MPC cultures contain a homogenous population of fibroblast-like cells which have a population doubling time of 33 h and exhibit a large (20) but variable *ex vivo* expansive potential. It has been reported that while some MPC preparations can be expanded over 15 cell doublings, others cease replicating after about 4 cell doublings (21-23). In addition, as samples are highly expanded, MPC apparently lose their multipotentiality and approach senescence and/or express apoptotic features (20,22).

Cell cycle studies on human MPC cultures have revealed the presence of a fraction (20%) of cells with a quantitative pattern of RNA and DNA typical of quiescent

(G0) cells (20). These cells can be isolated by a negative selection procedure using fluorouracil, which originates a population of more than 90% G0 cells, expressing a gene for ornithine decarboxylase antisense as a marker for cellular unproliferative state. The resting condition, together with a selective immunophenotype and the absence of the expression of commitment markers in the selected cells, suggest that within cultures of MPC a fraction of mesenchymal stem-like cells subsists (Conget P, unpublished results). This finding gives experimental support to the hypothesis that a "true" mesenchymal stem cell in the bone marrow is capable of self-renewal and differentiation into various mesenchymal lineages.

The antigenic phenotype of MPC is unique, borrowing features of mesenchymal, endothelial, epithelial and muscle cells (9,14,20,24). Since MPC do not express classical hematopoietic lineage markers (CD34, CD45) (9,20), it has been postulated that bone marrow hosts at least two different stem/progenitor cells which give rise to mature hematopoietic and mesenchymal cells (5,25).

The extended cytokine expression profile of MPC, which includes several hematopoietic and nonhematopoietic growth factors, interleukins and chemokines (18) suggests that MPC contribute to the marrow microenvironment with inductive/regulatory signals for the development of hematopoietic cells as well as for stromal cells, including the MPC itself. The latter is sustained by recent data showing that MPC express numerous growth factor and cytokine receptors (9, and Ericas A, unpublished results), suggesting that the function of these cells is under the control of autocrine or juxtacrine loops. Additional evidence for the dynamic function performed by MPC in the marrow microenvironment is given by data revealing their capacity to produce and organize an array of extracellular matrix molecules. Moreover, MPC express several count-

ceptors associated with matrix- and cell-to-cell adhesive interactions (9,20).

Differentiation potential of MPC

One of the first descriptions of the *in vivo* differentiation potential of MPC was the report showing that after a successful and uneventful HLA-matched marrow allograft, a dog suddenly died of respiratory failure due to extensive ossification of the lungs with multiple sites of hematopoietic engraftment (27). This study, described by the authors as "an unexpected phenomenon", was followed by several studies showing that in animal models, cultured MPC once transplanted can develop into terminally differentiated mesenchymal tissues, like bone (7,10,28-30), cartilage (10,29,31), tendon (13,32), muscle (33), neural (16) or hematopoietic microenvironments (7). The given examples just reaffirm the broad multipotentiality of MPC, probably the adult stem/progenitor cell exhibiting the highest degree of plasticity (6,34).

Most of the studies on the *in vitro* differentiation potential of MPC, mainly into osteoblasts, chondrocytes, myotubes and hematopoietic-supporting stroma, came from the work by Caplan and colleagues (4,11,15,35). These studies have provided information regarding culture conditions, proper stimuli and methods for identification of the respective ultimate differentiated phenotype.

The molecular and cellular events associated with differentiation pathways are not well understood, but it seems that the commitment to the osteo-chondrogenic or adipogenic lineages requires the expression of Cbfa-1 or PPAR γ 2, respectively (36,37). Subsequent maturation along these pathways includes the expression of alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin and collagen I in the osteocytic lineage; collagen II and IX in the chondrocytic lineage, and α P2, adipsin, leptin and lipoprotein lipase in the

adipocytic one (9,38). Thus, analyses at the gene expression level (RT-PCR) have shown that MPC differentiate *in vitro*, according to the stimuli applied, into the desired lineage but not into cells expressing multiple lineages (9).

Although diagrams for a hierarchy of MPC progenitors evolving from a putative mesenchymal stem cell have been published (6,39), data explaining how lineage choices and transcriptional specificities are achieved and how these account for the extraordinary multipotency of mesenchymal progenitor cells are lacking. It will be challenging for investigators in the field to fill in the gaps on these issues.

Sources of MPC

Recent data have shown that, in addition to adult bone marrow, umbilical cord blood is also a source of MPC (40). These cells exhibit an immunophenotype, a population of quiescent cells and a differentiation potential similar to that of marrow-derived MPC. The observation that the content of MPC is higher in preterm than in term cord blood, a trend also observed for hematopoietic progenitors (41), suggests that hematopoietic and mesenchymal progenitors travel early during development, probably from fetal hematopoietic sites to the newly formed bone marrow via cord blood (42).

Whether MPC circulate in peripheral blood is an open issue. In the murine model, CFU-F circulate in blood and represent a stromal cell population which can migrate into hematopoietic organs (43). In humans, cells with the characteristics of mesenchymal progenitors were detected in growth factor-mobilized peripheral blood stem cells harvested from breast cancer patients, but not in the blood from normal donors (44). However, under similar but not identical experimental conditions, the presence of circulating MPC has not been confirmed by other groups (45,46).

Transplantation of MPC

The envisioned routes of MPC delivery are either direct loading (injection or implants) into the damaged organ or systemic infusion. In the former case, it has been proposed that MPC will augment local repair or regeneration of bone (28-30), cartilage (47) or tendon (32). With respect to systemic infusion, MPC should home into the damaged tissue and restart their developmental program. Thus, MPC will improve target tissue function (48,33) or increase marrow microenvironment support to facilitate engraftment by hematopoietic stem cells (6,49).

Despite the profuse information on the origin (host or donor) of stromal cells after allogeneic transplantation, the issue is still open because of contradictory data. Thus, it has been reported that after successful allogeneic bone marrow transplantation (considered as a source of hematopoietic and mesenchymal progenitors), MPC isolated at different time intervals after transplantation exhibit cellular and molecular features that correspond either to the host (50-52) or to the donor (48,53,54). The nature of this conflict may arise from several determinants, among them the methods used to type MPC, the procedure followed to harvest the marrow (21,55), the low frequency of MPC in marrow harvests (2-5 MPC per 1×10^6 mononuclear cells) (50), and/or the condition (steady state vs post chemo- or radiotherapy) of the marrow from which MPC were prepared (22,52) and to which MPC were transplanted.

An additional explanation for the discrepancy about the marrow transplantation capacity of MPC may arise from the observation that the number of mesenchymal stem-like cells among different cultures is low and variable (20, and Conget P, unpublished results). Based on data for the hematopoietic and muscle system (56,57), one can speculate that quiescent and cycling MPC present in the graft will contribute in a different way

to stromal repopulation after transplantation. Mesenchymal stem-like cells, after homing to the marrow space will self-renew and thereby sustain long-term mesengensis. In turn, cycling MPC which will probably return home to other mesenchymal tissues during their committed condition, will only contribute to short-term mesengensis. What, in the case, there are still many open questions concerning the transplantability of MPC either as isolated cells, after *ex vivo* expansion or as whole cells with hematopoietic progenitors (55).

Clinical trials using MPC

Given the promising features of adult stem cells for the development of new therapies (6,34), researchers in the field of MPC have pursued a broad range of lines of investigation to stimulate their therapeutic utilization.

The first clinical trials reported have revealed that systemic infusion of *ex vivo* expanded autologous MPC is feasible and effective in the short-term (49,58). However, there is yet no conclusive evidence to support the contention that transplanted MPC may have a positive impact on the management of lymphohematopoietic or cancer patients (58). On the other hand, it has been demonstrated that allogeneic bone marrow transplantation in children with osteogenesis imperfecta results in impressive histological changes in trabecular bone which indicate new bone formation (59). In addition, increased bone growth rate and reduced frequencies of fractures were also observed. These changes detected 3 months after marrow transplantation, were associated with the engraftment of functional MPC from the transplanted marrow (25). Surprisingly, recent reports have documented that following bone marrow transplantation, short-term changes in bone mineral metabolism caused a transient impairment of bone formation and an increase in bone resorption (60).

Conclusions and future directions

The last five years have been the scene of a substantial improvement in our understanding of the biology and the potential clinical utilization of adult MPC. Although many aspects related to the properties of these cells are well established, information dealing with the existence of a hierarchy of mesenchymal precursors (including the mesenchymal stem cell itself) and their properties still remains obscure. However, this lack of information has not been an obstacle in terms of the therapeutic utilization of these cells.

MPC represent an attractive therapeutic option, both in the context of cellular and gene therapy strategies for a wide range of clinical applications. Future clinical trials should be focused on at least two main issues: as an integral part of the marrow microenvironment, MPC transplantation alone or in conjunction with hematopoietic progenitors would facilitate the engraftment of the hematopoietic stem cell after myeloablative therapy. Also, they might replace chemotherapy- or disease associated-damaged stroma or modulate graft versus host disease; transplantation of MPC, as precursors of several mesenchymal lineages, is envi-

sioned as the proper therapy to attenuate or correct disorders of mesenchymal tissues, like osteogenesis imperfecta, osteoporosis, osteoarthritis, meniscectomy, muscular dystrophy, etc.

To improve the latter, several studies have shown the feasibility of adeno- or retroviral-mediated gene transfer of reporter or therapeutic genes into MPC (8,61,62). For the near future, we anticipate a rapid closure of many gaps in our knowledge of the biology of MPC, which may facilitate the development of phase II and III clinical trials for new therapeutic alternatives using MPC. Thus, as recently proposed, MPC are "no longer second class marrow citizens" as compared with hematopoietic progenitors, the paradigm of bone marrow cells (25).

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Radovan Borojevic (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) for helpful discussions. We also thank Drs. Cecilia Rojas and Tomás Walter (Universidad de Chile, Santiago, Chile) for a critical review of the manuscript.

References

1. Friedenstein AJ, Gorskaja JF & Kulagina NN (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*, 4: 267-274.
2. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE & Moore MA (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 56: 289-301.
3. Owen M (1988). Marrow stromal stem cells. *Journal of Cell Science (Suppl)*, 10: 63-76.
4. Caplan AI (1994). The mesengenic process. *Clinics in Plastic Surgery*, 21: 429-435.
5. Prockop DJ (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71-74.
6. Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P & Tura S (1999). Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica*, 84: 1110-1149.
7. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ & Robey PG (1997). Factors required for bone marrow fibroblast colony formation *in vitro*. *British Journal of Haematology*, 97: 561-570.
8. Conget P & Minguell JJ (2000). Adenoviral-mediated gene transfer into *ex vivo* expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Experimental Hematology*, 28: 382-390.
9. 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.
10. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O & Prockop DJ (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92: 4857-4861.
11. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B & Caplan AI (1999). A quadripotential mesenchymal progenitor

- cell isolated from the marrow of an adult mouse. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14: 700-709.
12. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS & Owen ME (1992). Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of Cell Science*, 102: 341-351.
 13. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B & Caplan AI (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Engineering*, 5: 267-277.
 14. Galmiche MC, Koteliensky VE, Briere J, Herve P & Charbord P (1993). Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, 82: 66-76.
 15. Wakitani S, Saito T & Caplan AI (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle and Nerve*, 18: 1417-1426.
 16. Kopen GC, Prockop DJ & Phinney DG (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96: 10711-10716.
 17. Gartner S & Kaplan HS (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 77: 4756-4759.
 18. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M & Gerson SL (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MPCs) and stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 176: 57-66.
 19. Chichester CO, Fernandez M & Minguell JJ (1993). Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhesion and Communication*, 1: 93-99.
 20. Conget PA & Minguell JJ (1999). Phenotypic and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*, 181: 67-73.
 21. Phinney DG, Kopen G, Richter W, Webster S, Tremain N & Prockop DJ (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75: 424-436.
 22. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R & Prockop DJ (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology*, 107: 275-281.
 23. Bruder SP, Jaiswal N & Haynesworth SE (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64: 278-294.
 24. Haynesworth SE, Baber MA & Caplan AI (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13: 69-80.
 25. Gerson SL (1999). Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens. *Nature Medicine*, 5: 262-263.
 26. Haynesworth SE, Baber MA & Caplan AI (1996). Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *Journal of Cellular Physiology*, 166: 585-592.
 27. Sale GE & Storb R (1983). Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allo-transplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 11: 961-966.
 28. Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA & Goldstein SA (1999). Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *Journal of Orthopaedic Research*, 17: 900-908.
 29. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA & Bruder SP (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplantation*, 6: 125-134.
 30. Goshima J, Goldberg VM & Caplan AI (1991). The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 269: 274-283.
 31. Kataoka H & Urist MR (1993). Transplant of bone marrow and muscle-derived connective tissue cultures in diffusion chambers for bioassay of bone marrow morphogenetic protein. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 286: 262-270.
 32. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL & Fink DJ (1998). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 16: 406-414.
 33. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Condo M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu M, Mavilio F (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279: 1528-1530.
 34. Weissman IL (2000). Translating stem cell progenitor cell biology to the clinic: challenges and opportunities. *Science*, 287: 1446.
 35. Jaiswal N, Haynesworth SE, Bruder SP (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64: 295-302.
 36. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89: 743-754.
 37. Tontonoz P, Hu E & Spiegelman BM (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79: 1156.
 38. Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC & Riggs BL (1999). Differentiation of human marrow stromal precursor cells into bone morphogenetic protein-2 induced *OSF2/CBFA1*, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14: 1522-1535.
 39. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE (1997). Monoclonal antibodies reactive with human osteoblast cell surface antigens. *Bone*, 21: 225-230.
 40. Erices A, Conget P & Minguell JJ (1999). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* (in press).
 41. Shields LE & Andrews RG (1998). Clonal age changes in circulating hematopoietic stem/progenitor cells in human cord blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 178: 931-936.
 42. Tavassoli M (1991). Embryonic and adult hematopoiesis: an overview. *Blood Cells*, 269-281.
 43. Piersma AH, Ploemacher RE & Broeze KG (1983). Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *British Journal of Haematology*, 54: 285-290.
 44. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Conget P, Del Favero H & Minguell JJ (1997). Isolation of stromal cells in peripheral blood of cancer patients. *Bone Marrow Transplantation*, 20: 265-271.
 45. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL & Caplan AI (1997). Human bone marrow

- derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *Journal of Hematotherapy*, 6: 447-455.
46. Ojeda-Urbe M, Brunot A, Lenat A & Legros M (1993). Failure to detect spindle-shaped fibroblastoid cell progenitors in PBPC collections. *Acta Haematologica*, 90: 139-143.
 47. Johnstone B & Yoo JU (1999). Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 367 (Suppl): S156-S162.
 48. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K & Prockop DJ (1998). Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95: 1142-1147.
 49. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI & Lazarus HM (2000). Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 18: 307-316.
 50. Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, Kolodny EH, Yoseph YB, Gerson SL, Lazarus HM, Caplan AI, Watkins PA & Krivit W (1999). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Experimental Hematology*, 27: 1675-1681.
 51. Simmonds PJ, Przepiorka ED, Thomas ED & Torok-Storb B (1987). Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature*, 328: 429-432.
 52. Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R & Quarto R (1999). Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Experimental Hematology*, 27: 1460-1466.
 53. Almeida-Porada G, Flake AW, Glimp HA & Zanjani ED (1999). Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells *in utero*. *Experimental Hematology*, 27: 1569-1575.
 54. Keating A, Singer JW, Killen PD, Striker GE, Salo AC, Sanders J, Thomas ED, Thorning D & Fialkow PJ (1982). Donor origin of the *in vitro* hematopoietic microenvironment after marrow transplantation in man. *Nature*, 298: 280-283.
 55. Blazsek I, Delmas Marsalet B, Legras S, Marion S, Machover D & Misset JL (1999). Large scale recovery and characterization of stromal cell-associated primitive haemopoietic progenitor cells from filter-retained human bone marrow. *Bone Marrow Transplantation*, 23: 647-657.
 56. Gothot A, van der Loo JC, Clapp DW & Srour EF (1998). Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood*, 92: 2641-2649.
 57. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN & Partridge TA (1999). Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *Journal of Cell Biology*, 144: 1113-1122.
 58. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS & Caplan AI (1995). *Ex vivo* expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplantation*, 16: 557-564.
 59. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyritz RE & Brenner MK (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine*, 5: 309-313.
 60. Kang MI, Lee WY, Oh KW, Han JH, Song KH, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK & Kim CC (2000). The short-term changes of bone mineral metabolism following bone marrow transplantation. *Bone*, 26: 275-279.
 61. Marx JC, Allay JA, Persons DA, Nooner SA, Hargrove PW, Kelly PF, Vanin EF & Horwitz EM (1999). High-efficiency transduction and long-term gene expression with a murine stem cell retroviral vector encoding the green fluorescent protein in human marrow stromal cells. *Human Gene Therapy*, 10: 1163-1173.
 62. Lou J, Xu F, Merkel K & Manske P (1999). Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation *in vitro* and bone formation *in vivo*. *Journal of Orthopaedic Research*, 17: 43-50.

PEW

Latin American FELLOWS

PROGRAM in the
BIOMEDICAL
S·C·I·E·N·C·E·S

The Pew Latin American Fellows Program in the Biomedical Sciences is providing support for young scientists from Latin America for post-doctoral training in the United States.

Ten Fellows will be selected in 2000. An award of \$50,000 will be provided as a salary stipend for the fellow during the period of training (2 years) and will be administered by the sponsoring U.S. institution. The sponsoring institution is expected to supplement the stipend with at least \$5,000 a year and provide medical benefits for the fellow. Following the two year fellowship, the Program will issue an additional \$35,000 award to the sponsoring institution to purchase equipment and supplies for the fellow to establish a laboratory in his or her home country.

Applicants must have held a Ph.D. and/or M.D. degrees, or equivalent, for no more than five years as of July 1, 1999. Strong preference will be given to those applicants with no previous postdoctoral training outside of their home country. Applicants are not required to have a commitment of a position and laboratory space after the fellowship. However,

applicants must submit a written statement of intent to return to Latin America. Fellows must have a confirmed position and laboratory space in their home country by the end of the fellowship period in order

to obtain the \$35,000 portion of the award.

Fellows will be selected on the basis of their promise as outstanding investigators, as well as the scientific merit of their research proposal, their record of training and how their interests coincide with the laboratory of their sponsor in the United States. If potential applicants need assistance in the identification of an appropriate sponsoring laboratory in the United States, they may contact the Program Office before August 1, 2000. The Program will accept applications from Mexico, Central and South America. Applications may be obtained from the Regional Committee contact listed here for your country or from our website at <http://futurehealth.ucsf.edu/pewlatin.html>

The application deadline is October 1, 2000. Winners will be notified in April 2001 and the fellowship should begin no later than August 2001.

A Program of the Pew Charitable Trusts

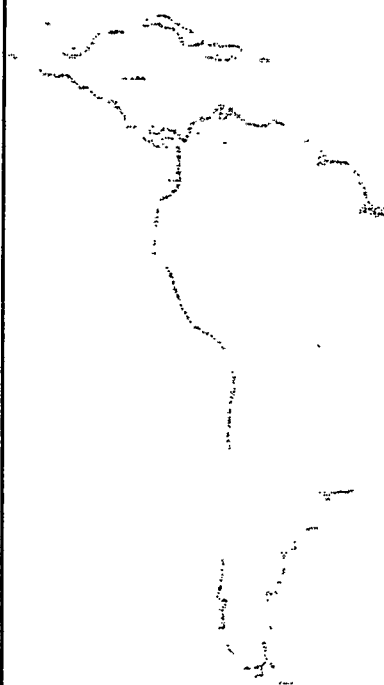
Deadline for applications: October 1, 2000

Argentina

Israel Algranati
Instituto de Investigaciones Bioquímicas
Fundación Campomar
Av. Patricias Argentinas, 435
1405 Buenos Aires
Tel: 863-4018/Fax: 865-2246
e-mail: algra@iris.iib.uba.ar

Brasil

Carlos Eduardo Rocha-Miranda
Vice President, Academia Brasileira de Ciências
Rua Anfilólio de Carvalho, 29, 3º andar
20030-060 Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Tel.: 220-4794/Fax: 240-4695
E-mail: cerm@abc.org.br



Mexico

Hugo Aréchiga
Facultad de Medicina UNAM
Ciudad Universitaria 04510
Mexico, D.F.
Tel: 622-0725/Fax: 550-8859
e-mail: arechiga@servidor.unam.mx

Chile

Manuel A. Kukuljan, Ph.D.
Universidad de Chile
Departamento de Fisiología y Biofísica
Casilla 70005 Santiago 7, Chile
Tel: 2-678-6310/Fax: 2-777-6916
e-mail: kukuljan@bitmed.med.uchile.cl

All other countries

Silvia Montano de Jiménez
The Pew Latin American Fellows Program
3333 California Street, Suite 410
San Francisco, CA 94118
Tel: 415-476-5116/Fax: 415-476-4113
e-mail: montano@itsa.ucsf.edu

MINIREVIEW

Mesenchymal Stem Cells

JOSÉ J. MINGUELL,^{*1} ALEJANDRO ERICES,^{*†} AND PAULETTE CONGET^{*}

^{*}Unidad de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile, Santiago, Chile; [†]Laboratorio de Trasplante de Médula Osea, Clínica Las Condes, Santiago, Chile

Within the bone marrow stroma there exists a subset of nonhematopoietic cells referred to as mesenchymal stem or mesenchymal progenitor cells. These cells can be *ex vivo* expanded and induced, either *in vitro* or *in vivo*, to terminally differentiate into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, tenocytes, myotubes, neural cells, and hematopoietic-supporting stroma. The multipotential of these cells, their easy isolation and culture, as well as their high *ex vivo* expansive potential make these cells an attractive therapeutic tool. In this work we will review the information dealing with the biology of mesenchymal progenitors as it has been revealed mainly by *ex vivo* studies performed with bone marrow-derived cells. The discussed topics include, among others, characteristics of mesenchymal progenitors, evidence for the existence of a vast repertoire of uncommitted and committed progenitors both in the bone marrow and in mesenchymal tissues, a diagram for their proliferative hierarchy, and comments on mobilization, microenvironment, and clinical use of mesenchymal progenitors. Despite the enormous data available at molecular and cellular levels, it is evident that a number of fundamental questions still need to be resolved before mesenchymal progenitors can be used for safe and effective clinical applications in the context of both cell and gene therapies.

[Exp Biol Med Vol. 226(6):507-520, 2001]

Key words: mesenchymal stem cells; marrow stromal cells; uncommitted mesenchymal progenitors; human mesenchymal stem cells; characteristics mesenchymal progenitors

Adult Stem Cells

An orderly chain of highly regulated processes involving cell proliferation, migration, differentiation, and maturation leads to the production and sustenance of most cell lineages in adult organisms. The earliest cell type on this chain has been called a stem cell. Together with their extensive capacity for self-renewal, stem cells display a broad

potential (often a multipotential) for giving rise to diverse differentiated progenies. In addition to the hematopoietic and intestinal stem cells, considered for many years as paradigms of stem cells, adult organisms contain several other classes of stem cells (Table I).

For a long time, adult stem cells have been considered to be developmentally committed in such a way that they appear restricted to produce specific cell lineages, namely those from the tissue in which the stem cell resides. This rather deterministic concept (i.e., bone marrow forms blood cells, epithelium forms epithelial cells, etc.) has been recently challenged by several bizarre and unexpected findings. Reports have shown that a particular stem cell, besides originating the predicted collection of cells characteristic of the tissue in which they reside in, may also give rise to a set of unacquainted progenitors. Thus, the hematopoietic stem cell, in addition to the production of blood cells, can also originate hepatic oval cells ("blood into liver") (1). In turn, neural stem cells, along with their ability to originate the three main type of cells found in the adult brain (2, 3), also produce early and lineage-committed hematopoietic progenitors ("brain into blood") (4). Mesenchymal stem cells, which originate a variety of mesenchymal phenotypes, can also give rise to nonmesenchymal cells like neural cells ("marrow into brain") (5, 6). Moreover, to suit the elevated demand of precursors that occurs during tissue growth and repair, adult organisms should have the ability to recruit uncommitted progenitors from other tissue sources. This proved to be the case during muscle repair, where mesenchymal stem cells in the bone marrow travel to skeletal muscle (7).

Thus, it seems that in addition to their ability to divide without limits and to give rise to distinctive cells, adult stem cells are remarkably malleable and exhibit a high degree of plasticity. The above is extensive to the rare type of somatic pluripotent stem cell, which has been postulated to be a common precursor of all adult stem cells (8).

The above examples also underline another feature of

¹ To whom requests for reprints should be addressed at Unidad de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile, Casilla 138, Santiago 11, Chile. E-mail: jminguel@uec.inta.uchile.cl

Table I. Human Stem Cells

Stem cell	Location (source)	Cells produced	Reference
Hematopoietic	Bone marrow	Blood, endothelial, hepatic (oval), and muscle cells	1, 75, 112,
Neural	Brain	Neurons, astrocytes, oligodendrocytes, and blood cells	3, 4, 146, 1
Epithelial	Gut, epidermis	All cells in epithelium crypts; all cells in epidermal layers	74, 148-150
Mesenchymal	Bone marrow	Bone, cartilage, tendon, adipose, muscle, marrow stroma, and neural cells	5, 23, 28, 2
Embryonic	Blastocyst inner cell; mass primordial germ cells	All cells	21, 22

stem cells, which is their ability to leave their "tissue" niche and circulate in the blood stream, as occurs with the hematopoietic and mesenchymal stem cells (9-13). However, to express its differentiation program, a circulating stem cell must home into an appropriate microenvironment (14, 15).

The growing body of information regarding what a stem cell can or cannot do (16-18) has directly influenced the abundant attempts to explore their clinical impact (8, 19, 20). It has yet to be established whether their use in cell or gene therapies can match the power envisioned with the utilization of embryonic stem cells (21, 22).

Bone marrow contains not only the hematopoietic stem cell, but also the stem cell for tissues that can roughly be defined as mesenchymatic. The multipotential of mesenchymal stem cells, their easy isolation and culture, as well as their high *ex vivo* expansive potential make these cells an attractive therapeutic tool capable of playing a role in a wide range of clinical applications in the context of both cell and gene therapy strategies. In this work we will review the information dealing with the biology of mesenchymal progenitors after studies performed with cells obtained from bone marrow-derived cultures. It will be evident after reading the review that there are many gaps in our information about several aspects of the biology of mesenchymal progenitors. However, given the enormous promise of these cells to the development of new therapies, there is no doubt that in the near future most fundamental questions will be resolved.

Denominations Utilized to Refer to Mesenchymal Progenitor Cells

In vivo and *in vitro* studies have identified the bone marrow stroma as the source of a multipotent stem cell that gives rise to progenitors for several mesenchymal tissues, including bone, cartilage, tendon, adipose, muscle (23), and hematopoietic-supporting stroma (24, 25). Since their original description, these bone marrow multipotent progenitors were referred to by different names. The original term "colony forming unit-fibroblast (CFU-F)" or "marrow stromal fibroblasts (MSF)" (26-28) has been gradually abandoned and replaced by diverse, still indistinct denominations like "marrow stromal cells (MSC)" (29), "mesenchymal stem cells (MSC)" (23), or mesenchymal progenitor

cells (30). Although most denominations reflect a semantic rather than a functional issue, in this review we will use the generic term mesenchymal progenitor cells (MPC), which applies not only to the stem cell *per se*, but to a vast repertoire of committed progenitors exhibiting at least more than one differentiation potential and described to be present both in the bone marrow as well as in several mesenchymal tissues (25, 31-33).

It is necessary to emphasize that the denomination "marrow stromal cells" has also been utilized to describe hematopoietic-sustaining monolayers of long-term marrow stroma or Dexter-type cultures (34). However, culture conditions, evolving phenotypes, differentiation potential, and secretion products of the above cells are not analogous; in fact, are quite dissimilar to that of MPC (24, 35).

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells

In the following sections we will discuss data related to the general characteristics of bone marrow-derived MPC cultures, as well as evidence for the existence of uncommitted and committed mesenchymal progenitors and their proliferative hierarchy.

Characteristics of MPC. Bone marrow stroma is the most recurrent tissue source utilized in growing mesenchymal progenitors. In the case of human MPC, the starting material frequently consists of aliquots of bone marrow obtained from normal donors undergoing marrow aspiration for purposes of allogeneic marrow transplantation. After plating low-density mononuclear cells in a basal medium supplemented with selected batches of fetal bovine serum (29, 30), the evolving population of plastic-adherent cells is considered the primary *ex vivo* source of MPC.

By light or phase contrast microscopy, MPC cultures display a rather homogenous population of fibroblast-like cells (26, 36). Cell cycle studies revealed that while a small fraction of MPC are actively engaged in proliferation (approximately 10% at S + G2 + M), the vast majority of cells are standing at the Go/G1 phase of the cell cycle (33). Although check points and length of each phase of the cell cycle have not been determined, the high percentage of Go/G1 cells suggests a high competence of MPC to differentiate (37). Moreover, the Go/G1 population of MPC

cludes a minor and variable subset of resting quiescent cells, as evidenced by RNA and DNA content (30) or by FACS analysis of size and granularity (33).

After subcultivation, MPC exhibit a large but highly variable expansive potential. While some preparations of MPC can be expanded through over 15 cell doublings, others cease replicating after about four cell doublings (38–40). The nature of this conflict may arise from several determinants, among them the procedure used to harvest the marrow (38–41), the low frequency of MPC in marrow harvests (2–5 MPC per 1×10^6 mononuclear cells) (42), and the age or condition of the donor from which MPC were prepared (39, 43). Despite the high *ex vivo* expansive potential, MPC do not loose (after moderate subcultivation) their normal karyotype and telomerase activity (44). However, extensive subcultivation impairs cell function by the onset of evident signs of senescence (39) and/or apoptosis (30).

The development of a series of monoclonal antibodies raised towards surface MPC antigens (45, 46), along with other antibodies developed to characterize bone marrow stromal cells (47–49), has been crucial for the immunophenotyping of these cells. Results have shown that the antigenic phenotype of MPC is not unique, but borrows features of mesenchymal, endothelial, epithelial, and muscle cells (Table II). MPC do not express the typical hematopoietic antigens, CD45, CD34, and CD14 (30, 44).

An extended cytokine expression profile has been described for MPC. As seen in Table II, MPC produce several hematopoietic and nonhematopoietic growth factors, interleukins, and chemokines. While many of these cytokines are constitutively produced, others are only expressed after stimulation (50). In addition, MPC express several cytokines and growth factors receptors (Table II). All together, these data put in evidence that mesenchymal progenitors in the bone marrow contribute to the formation and function of a stromal microenvironment, which produces inductive/regulatory signals not only for MPC but also for the development of hematopoietic progenitors and other nonmesenchymal stromal cells present in the bone marrow (24, 51–53). This proposed dynamic participation of MPC in the marrow microenvironment is strengthened by data showing they produce a vast array of matrix molecules, including fibronectin, laminin, collagen, and proteoglycans (29, 35, 44), and that they express several counter-receptors associated with matrix- and cell-to-cell adhesive interactions (Table II). Of particular relevance is the strong expression of CD44 (30, 44), a receptor for various ligands like hyaluronan and osteopontin, which plays a central role in the organization of the extracellular matrix in the marrow or in the bone, respectively (54, 55).

Several *in vitro* studies have been conducted to assess the differentiation potential of MPC, as well as to set up culture conditions, differentiation stimuli, and methods for the identification of each ultimate differentiated phenotype. A summary of this information is provided in Table III. The above information, supported by *in vivo* studies, demon-

Table II. Main Characteristics of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitors: Expression of Specific Antigens, Cytokine Receptors, and Adhesion Molecules, and Production of Cytokines and Matrix Molecules

Marker type	Designation	References
Specific antigens	SH2, SH3, SH4 STRO-1	30, 45, 47, 48
	α -smooth muscle actin MAB1740	
Cytokines and growth factors	Interleukins: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14, and 15 LIF, SCF, Flt-3 ligand GM-CSF, G-CSF, M-CSF	24, 50
	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TNFIR, TNFIIIR, TGF β IR, TGF β IIIR, bFGFR, PDGFR, EGFR	
Cytokine and growth factor receptors	Integrins: α v β 3, α v β 5 Integrin chains: α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α v, β 1, β 3, β 4 ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-selectin, endoglin, CD44	30, 44, 49, 151
	Adhesion molecules	
Extracellular matrix	Collagen type I, III, IV, V, and VI Fibronectin, laminin Hyaluronan, proteoglycans	29, 30, 35

strates that bone marrow-derived MPC develop into terminally differentiated phenotypes, like those forming bone (28, 56–59), cartilage (57, 58, 60), tendon (61, 62), muscle (7), neural (5), and adipose tissues (25, 44), or hematopoietic-supporting stroma (28).

Uncommitted Mesenchymal Progenitors in MPC Cultures. When cultures of bone marrow-derived MPC are examined on the basis of cellular proliferative status, they appear to be nonhomogenous. The work performed by Colter *et al.* (33) has shown that in stationary cultures of bone marrow, MPC subsist a minor population of small and agranular cells (RS-1 cells) with a low capacity to generate colonies and nonreactive to the cell cycle-specific antigen Ki-67. Quiescent RS-1 cells express an antigenic profile that is different from that displayed by the most abundant, fast-growing, and committed precursors (mMSC's) found in expanded cultures of MPC. By studying a precursor-product relationship between RS-1 and mMSC cells, the authors came to the conclusion that the high expansive capacity of mMSCs depends on the presence of RS-1 cells. In turn, RS-1 cells may cycle under stimulation of factors secreted by the most mature mesenchymal progenitor cells. Thus, it seems that RS-1 cells may represent

Table III. Differentiation Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitors *in vitro*: Stimuli, Molecular, and Cellular Markers

Differentiation to:	Stimuli	Terminal phenotype identification markers	
		Molecular	Cellular
Adipocytes	Dexamethasone + isobutylmethylxanthine (86) Dexamethasone + isobutylmethylxanthine + indomethacin + insulin (44, 143) Dexamethasone + insulin (32)	PPAR γ 2 C/EBP β aP2 Adipsin Leptin Lipoprotein lipase (44, 153, 154)	Cytoplasmic lipid droplet accumulation (158)
Chondrocytes	TGF β 3 + ascorbic acid (44) TGF β 1 + ascorbic acid (32)	Cbfa-1 Collagen types II and IX Aggrecan (155, 156)	Matrix enriched in proteoglycans and collagen types II and IX (32, 44)
Osteoblasts	Dexamethasone + β -glycerophosphate + ascorbic acid (38)	Cbfa-1 Bone/liver/kidney alkaline phosphatase Bone sialoprotein Osteopontin Osteocalcin Collagen type I (44, 153, 156, 157)	Mineralized matrix formation (36)
Tenocytes	BMP-12 (141)	Collagen type II Proteoglycans (61)	Improved biomechanical properties of implanted tendon (61)
Hematopoietic supporting stroma	Hydrocortisone + horse serum (24) Hemopoietic stem cell (159)	n.d.	Maintain and support hematopoietic differentiation of CD34 ⁺ cells (24) Support osteoclastogenesis (159) Support megakaryocytopoiesis and thrombocytopoiesis (53)
Skeletal muscle cells	5-Azacytidine (160, 161)	MyoD Myf 5 and 6 MEF-2 Myogenin MRF4 Myosin (161, 162)	Multinucleated contractile cells (78)
Smooth muscle cells	PDGF-BB (161)	ASMA Metavinculin Calponin h-Caldesmon Later smooth muscle actin (47, 161)	n.d.
Cardiac muscle cells	bFGF (161)	GATA 4 and 6 Cardiac troponin I and C Sarcomeric-actin Slow twitch myosin ANP (161)	n.d.
Astrocytes	DMSO + dexamethasone	Glial fibrillary acidic protein Intermediate filament (5, 6) Galactocerebroside (6) Neurofilament Tubulin BIII Synaptophysin (5, 6)	Integration into neonatal brain (5)
Oligodendrocytes	PDGF + EGF + linoleic acid (6)		
Neurons			

an *ex vivo* subset of recycling uncommitted mesenchymal stem cells.

Additional evidence for the presence of uncommitted

mesenchymal stem cells in bone marrow-derived cultures MPC has been provided by the work of Conget *et al.* (unpublished, A. Conget and J.J. Minguell). By following

different experimental approach, a subset of quiescent cells was isolated by taking advantage of the resistance of growth-arrested cells to the antimetabolite, 5-fluorouracil (5-FU) (63). Cells thus isolated have a low RNA content and a high level of expression of the gene for ODC anti-enzyme, both considered as markers for an unproliferative cellular status (64, 65). Quiescent cells and 5-FU nontreated MPC display a similar antigenic profile except in the distinctive expression by the former cells of CD117, an adult stem cell marker (66, 67). Cells in the quiescent condition seem to represent a population of uncommitted mesenchymal progenitors, since they do not express the osteogenic and adipogenic commitment markers (44) Cbfa-1 and PPAR- γ 2, respectively. In turn, after prolonged exposure to fetal bovine serum, the slow-proliferating quiescent cells give rise to committed precursors that grow fast and terminally differentiate.

The existence of progenitors with properties of uncommitted mesenchymal stem cells has also been revealed by the use of clonal cultures of bone marrow-derived MPC (32). Data show that among several clones isolated, one exhibited stem cell properties like a relatively low frequency (1%), a FGF-2 growth dependence (68), and an uncommitted condition evidenced by its inability to differentiate into osteoblasts, chondrocytes, or adipocytes.

All together, the above findings demonstrate that despite *ex vivo* manipulation and subcultivation, cultures of bone marrow-derived MPC contain a rare subset of uncommitted progenitors displaying features of stem cells. Whether these cells represent the *ex vivo* counterpart for the *in vivo* mesenchymal stem cell (26) is not known.

Committed Progenitors in MPC Cultures. In addition to uncommitted mesenchymal progenitors, several classes of committed progenitors are also present in cultures of bone marrow-derived MPC. Nonimmortalized cell clones have been used by Muraglia *et al.* (32) to investigate the nature and properties of committed progenitors present in cultures of bone marrow-derived MPC. When the differentiation potential of the isolated clones was assessed, it was found that while 30% of all clones exhibit a tri-lineage (osteo/chondro/adipo) differentiation potential, the rest exhibit either a bi-lineage (osteo/chondro) or a pure osteogenic potential. Clones with a differentiation potential limited to the osteo/adipo or to the chondro/adipogenic phenotype, as well as pure chondrogenic and adipogenic clones, were not detected. These observations have been extended by other studies using conditionally immortalized clones (25, 69–71). In addition, a clone with properties of a quadripotential mesenchymal progenitor (clone BMC9) has been isolated, which under appropriate conditions differentiates into cells exhibiting phenotypic and functional properties of osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, and hematopoietic-supporting stroma (25).

The above discussed data have strengthened the concept that cultures of bone marrow-derived MPC are not homogeneous, but consist of an assortment of uncommitted and

committed progenitors exhibiting divergent stemness. The latter concept discloses that as progenitors progress towards the terminal phenotype, self-renewal is gradually lost and commitment increases (72, 73).

Proliferative Hierarchy for Mesenchymal Progenitors. *In vivo*, bone marrow has been considered as the site of residency of the uncommitted mesenchymal stem cell, which upon expression of its self-renewal and multi-differentiation potential, commands the continual replenishing of a given supply of mesenchymal cells during the entire lifespan of an organism, both at steady-state and altered conditions (23).

The examples given in the previous sections clearly underline that linearity between the mesenchymal stem cell and its end-stage mature phenotypes does not exist. The concept of proliferative hierarchy has been developed to explain structured cell populations in a tissue involving stem, committed, and mature cells (72, 74, 75). This concept, which is applicable to the vast repertoire of bone marrow-derived mesenchymal progenitors, is based on the assumption that proliferation, differentiation, and maturation are in principle independent; in other words, stem cells divide without maturation, while cells close to functional competence may mature, but do not divide. However, the population of committed cells divide and mature, showing intermediate properties between stem cells and functional mature cells. Therefore, the already discussed notion of stemness of mesenchymal progenitors is not a property of a particular cell type, but a spectrum of capabilities of cell types within a population.

Attempts to draw a scheme for a proliferative hierarchy in mesenchymal progenitors began in 1994 when Caplan, in a very comprehensive paper (23), discussed the experimental and logic basis for the "mesengenic process hypothesis." This has been followed by several models, most of them devoted to proposing a hierarchy for osteoprogenitors, involved in bone cell development (46, 76, 77). Based on the discussed data related with the existence of an uncommitted and various committed progenitors, we propose a diagram for their proliferative hierarchy (Fig. 1). We would like to call attention to the fact that the concept of a mesenchymal stem cell is merely tentative. Since reliable stem cell markers are not yet available, the uncommitted mesenchymal stem cell has been mainly defined in terms of their functional skills, as commented before. Therefore, rephrasing Hall (16), we still do not know whether a "mesenchymal stem cell is a mesenchymal stem cell is a mesenchymal stem cell."

Tissue-Derived Mesenchymal Progenitor Cells

In the next section we will discuss the current evidence for the presence of uncommitted and committed mesenchymal progenitors in cultures started from various mesenchymal tissues.

Muscle-Derived MPC. Work performed with adult human skeletal muscle has demonstrated the existence of

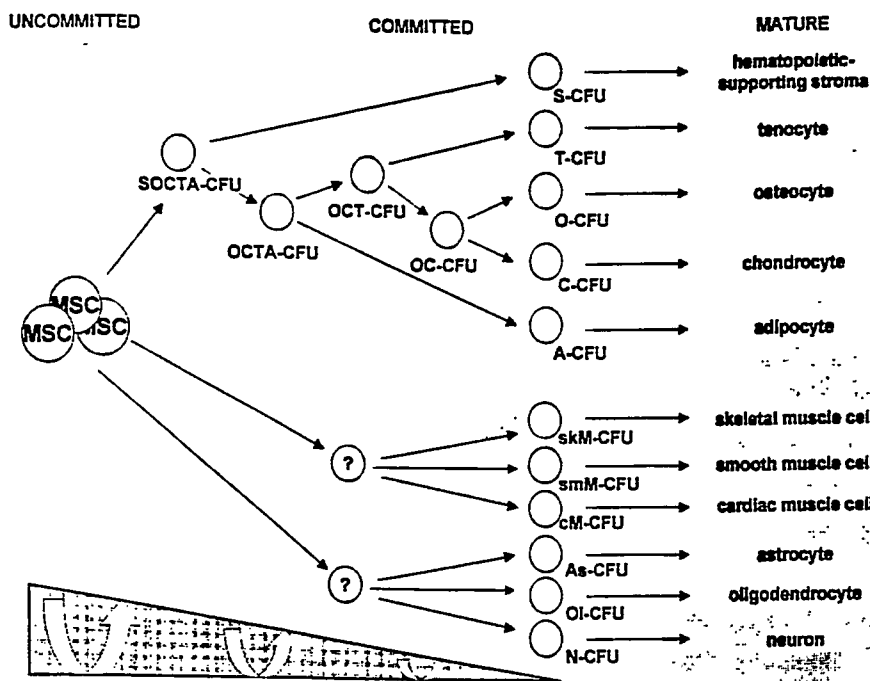


Figure 1. Schematic diagram for the pre-erative hierarchy of mesenchymal progenitors. The diagram has been constructed with data from studies performed with expanded human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. It shows two main compartments containing either uncommitted multipotent mesenchymal stem cells (MSC) or committed mesenchymal progenitors with decreasing stemness, as indicated in the bottom triangle. The committed progenitors are named as colony forming units (CFU) according to their differentiation potential into S, hematopoietic-supporting stroma; O, osteoblasts; chondrocytes; T, tenocytes; A, adipocytes; skM, skeletal; smM, smooth; cM, cardiac muscle cells; As, astrocytes; OI, oligodendrocytes; and N, neurons. The third compartment represents, for sake of simplicity, only the mature mesenchymal phenotypes.

cells with properties of early myogenic progenitors (78). In this study it was observed that after tissue enzymatic dissociation and cell cultivation, the resulting primary culture was formed by a mixture of stellate-shaped cells and multinucleated myotubes. After isolation and cultivation of the former cells in medium containing horse serum, cells grow without any sign of differentiation; however, after switching to a medium containing dexamethasone (79), cells started to show signs of differentiation. As judged by morphological and histochemical analysis, the differentiated population included cells with the phenotype of skeletal and smooth muscle, bone, cartilage, and fat. Although the culture conditions used in this work (horse serum and attachment to gelatin) are not those routinely in use for growth and expansion of MPC (30, 39, 44), these results demonstrate the presence in skeletal muscle of committed mesenchymal progenitors. In addition, uncommitted progenitors seem also to be present in muscle. In an attempt to follow the dynamic of myoblast transplantation in the murine system, it was shown that a minority of muscle-resident cells are responsible for new muscle formation (80). The minor cellular subset, which contains slowly dividing cells in culture but rapidly after grafting, probably represents uncommitted mesenchymal stem cells that persist in the environment of the recipient muscle. These results are in agreement with previous reports documenting the existence of such cells (81–83) that seem to be different from muscle satellite cells, classically considered as the muscle stem cell (84). The uncommitted stage of the skeletal muscle-resident mesenchymal progenitor, as well as that of the myogenic cell line C2, are further disclosed by their persistence as undifferentiated mononuclear cells, even after exposure to differentiation stimuli (81).

Not only cells from skeletal muscles, but from other muscles such as the heart, seem to exhibit properties of

mesenchymal progenitors. It has been reported that culture of neonatal rat heart gives rise to a population of adherent stellate cells, which upon incubation with dexamethasone generate several mesenchymal phenotypes with characteristics of adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, smooth muscle cells, skeletal myotubes, and cardiomyocytes (85).

It has not been confirmed whether muscle- and bone marrow-resident mesenchymal stem cells represent the same kind of progenitor. However, the work by Ferrari *et al.* (7) has provided strong evidence that the population of muscle progenitors present in skeletal muscle are derived from uncommitted bone marrow mesenchymal progenitors and are different to muscle satellite cells.

Bone-Derived MPC. Several experimental approaches have been followed to gain insight into the characteristics and differentiation potential of bone-resident mesenchymal progenitors. In one of these studies, four cellular subsets were sorted from primary cultures of normal human bone, according to the differential pattern of expression of the stromal precursor cell marker STRO-1 and the osteoblastic marker alkaline phosphatase (ALP) (76). The STRO-1⁺/ALP⁻ subset exhibited a preosteoblastic phenotype, as evidenced by reduced ability to form a mineralized bone matrix and by the lack of expression of bone sialoprotein, osteopontin, and parathyroid hormone receptor. The other subsets correspond to intermediate and fully differentiated osteoblasts. As expected, after sorting and reculturing, only cells in the STRO-1⁺/ALP⁻ subpopulation were able to give rise to all of the four subsets of STRO-1⁺/ALP⁻ cells present in the primary culture. Thus, these results have demonstrated that cultures of human bone are not homogenous, but on the contrary, they include committed osteoprogenitors as well as end-stage differentiated osteoblasts.

Studies with nonimmortalized clonal cell lines derived from human trabecular bone have shown that bipotent- (osteoadipo) committed progenitors are also present in bone cultures (86). The differentiation pathway taken by these cells is highly modulated by a variety of factors, including long chain fatty acids, drugs, IL-1 β , TNF- α , and/or TGF- β (86).

Additional evidence in unveiling the nature of other repositories of progenitors in cultures from bone have been obtained by studies using isolated cell populations. The fetal rat calvaria clone RCJ 3.1 differentiate in a time-dependent sequence into four mesenchymal phenotypes. This progression, which was elicited by ascorbic acid, β -glycerophosphate, and dexamethasone, gave rise to multinucleated muscle cells (Days 9 and 10), adipocytes (Day 12), chondrocytes (after Day 16), and mineralized bone nodules (after Day 21) (79, 87). Together, it has been shown that a population of cells from fetal rat periosteum isolated on the basis of granularity (S cells) exhibit various properties of an uncommitted mesenchymal progenitors. Thus, S cells are slow cycling, do not express differentiation-associated markers, and when grown in culture, generate cartilage, adipose, smooth muscle, and bone phenotypes (31, 88).

Thus, studies utilizing distinct experimental approaches have established that cultures of bone-derived MPC contain uncommitted mesenchymal progenitors as well as committed osteoprogenitors. All together, this evidence puts forward the contention that uncommitted mesenchymal stem cells are not only located in the marrow, but are also ubiquitously positioned in bones where, under appropriate stimuli (microenvironment?), may self-renew, commit, and generate cells exhibiting the phenotypic and functional characteristics of the resident tissue (89).

Cartilage-Derived MPC. *In vivo*, articular cartilage has a limited capacity for repair (90). It has been suggested that despite the presence of cells capable of developing into a correct chondrocytic phenotype, their number or the amount of regulatory factors is limited in the repair tissue (91-95). However, it is not clear whether the "repair cell" corresponds to a chondrocyte-committed progenitor located in the cartilage or to an osteo/chondrocyte-committed progenitor recruited from a noncartilagenous tissue (79, 96-98).

Tendon-Derived MPC. Few studies have addressed the issue of the presence of tendon-resident mesenchymal progenitors. By developing a method for the serial culture of tenocytes from juvenile rabbit Achilles tendon, it was shown that cells in primary and first passage cultures retained the expression of tenocyte differentiation markers like collagen type I and decorin. However, after successive passaging, despite the fact that cells are healthy and with no evidence of senescence, tenocytes started to display a modulated phenotype (99). Regardless of the abundant information on factors that modulate the growth of tendon cells *in vitro* (100-104), there is no data on the tissue origin or the commitment condition of tendon-resident precursors.

Adipose Tissue-Derived MPC. Adipose tissue stromal cells contain adipocyte progenitors at various stages of maturity, including the stromal-vascular (SV) cells, considered as the less differentiated tissue-resident adipocyte progenitor. *In vivo* SV cells are induced to proliferate and differentiate into mature adipocytes during cold acclimation (105) and after caloric excess (106). Both SV cells and bone marrow-derived MPC can be induced to differentiate into adipocytes by glucocorticoids, IGF-I, and insulin (106). Therefore, SV cells are a class of fat-resident-committed mesenchymal progenitors, exhibiting at the least a bipotent differentiation potential, since they can differentiate into adipocytes or chondrocytes (107). Additional evidence for the extensive differentiation potential exhibited by fat-resident progenitors came from studies using cloned cells isolated from fat bone marrow, which demonstrated their capability to differentiate into adipocytes or osteoblasts (108).

Vascular-Derived MPC. Most, if not all, vessels develop from an endothelial tube that subsequently acquires a coating formed by vascular smooth muscle cells/pericytes (vSMC), which in turn develop from a undifferentiated perivascular mesenchymal progenitor (109). Perivascular mesenchymal progenitors exhibit many features of bone marrow-derived MPC, like expression of α -smooth muscle actin (ASMA), PDGF-mediated growth stimulation via a PDGF receptor, and a differentiation potential following a typical smooth muscle pathway (23, 47, 109). Thus, vSMC represent a vascular-resident mesenchymal progenitor with the potential to differentiate, at least, into the smooth muscle lineage.

Mesenchymal Progenitor Development: Mobilization and Microenvironment(s)

The concept that a bone marrow-resident-uncommitted mesenchymal stem cell gives rise to all mesenchymal lineages in distant tissues (23, 26, 29, 36) is supported by evidence coming from analysis undertaken both *in vivo* and *in vitro*. However, data quoted in the previous sections show that committed mesenchymal precursors with different stemness or even uncommitted mesenchymal stem cells are located in marrow-distant mesenchymal tissues, as seems to be the case in muscle and bone. These facts renew the question as to whether a tissue-resident progenitor has always existed in that particular tissue or has been recruited as such or as a less committed precursor from the bone marrow or another mesenchymal tissue. Although the limits for the above circumstances are difficult to set, current information suggests that progenitor recruitment occurs during the growing period of an organism (110, 111), as well as in adult life during tissue repair (7, 89, 98). Accordingly, two main issues are raised. The first one is related to the route(s) taken by the precursor cell in case they originate from another tissue or another area in the same tissue, and the second one relates to the homing and fate within a particular

tissue of mesenchymal progenitors. These two aspects will be discussed in the following sections.

Mobilization of Mesenchymal Progenitors.

Bone marrow stroma, the site of residence of the uncommitted multipotent mesenchymal stem cell, feeds progenitors into distant mesenchymal tissues (23). Therefore, one may assume that for destination into other tissues, the mesenchymal stem cell must leave the marrow stroma as such or after undergoing either self-renewal and commitment. The latter may take place by a successive traffic throughout distinct stromal niches that regulate stem cell development (15, 18, 112). As a corollary, cell-to-cell or cell-to-matrix interactions between mesenchymal progenitors and stromal components should loosen up, thus facilitating the egress of the progenitor into the blood stream. Therefore, peripheral blood should represent a transit compartment for mesenchymal progenitors in the search of their final destination: a proper microenvironment in a distant tissue where they can home, expand, and further differentiate.

Whether adult mesenchymal progenitors circulate in peripheral blood is an open issue. In the murine model, CFU-Fs circulate in the blood and represent a stromal cell population that can migrate into various tissues (113). In humans, mesenchymal progenitors have been detected in peripheral blood from breast cancer patients after growth factor mobilization of hematopoietic stem cells (11). Moreover, by using a positive selection procedure, a population of adherent cells that originate colonies of mesenchymal progenitors has been isolated from peripheral blood (13). However, circulating mesenchymal progenitors in human blood have not been detected in other studies (114, 115). Besides the dissimilar experimental conditions that may have affected the interpretation of the above results, it seems important to determine whether mesenchymal progenitors can be found in the blood of healthy or unhealthy individuals, as well as after marrow stimulation (7, 116). The latter case occurs with the hematopoietic stem cell, which is released from the bone marrow into the blood stream only after stimulation by drugs or growth factors (117).

Recent data show that in addition to adult bone marrow and other mesenchymal tissues, umbilical cord blood is also a source of mesenchymal progenitors (12). These "in motion" mesenchymal cells display many common features with adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitors, like adhesion to plastic, morphology, expression of cell membrane and cytoplasmic antigens, and a potential to differentiate into osteo/chondrogenic and adipogenic phenotypes. Moreover, the identification in cultures of mesenchymal cells from cord blood of a subset (5%–10%) of quiescent cells suggests that an uncommitted mesenchymal progenitor circulates during gestation. The inverse correlation between content of mesenchymal progenitors in cord blood and gestational age, a trend also observed for hematopoietic progenitors (10), suggests that mesenchymal cells travel from fetal sites into other tissues early during development (12).

The preceding as well as other evidence (7, 27, 57) give strength to the existence of a sort of "long-distance" traffic of mesenchymal progenitors via the blood stream. However, "short distance" or "local" traffic of mesenchymal progenitors has been described to occur within a tissue during cartilage repair (97, 98), muscle regeneration (80), migration throughout forebrain and cerebellum (5), and gingiva and periodontal cell differentiation into osteoblasts (118).

Microenvironment(s) for Mesenchymal Progenitors. Maintenance of stem cell compartment ultimately depends on cell autonomous regulators modulated by external signals. Such intrinsic regulators include, among others, factors controlling asymmetric cell division, expression of genes related with the uncommitted and committed stages, and clocks that set the number of rounds of cell division. In turn, extrinsic signals that control stem cell fate collectively make up the stem cell microenvironment niche (119). This niche involves a complex interplay of short- and long-range signals between uncommitted and committed progenitors and between them and neighboring cells.

The nature and properties of an adult microenvironment for the hematopoietic, neural, and epithelial stem cells have been accomplished by several studies (15, 112, 120–122). However, there is no comprehensive data on the characteristics and properties of a microenvironment for mesenchymal progenitors, both in the bone marrow and in mesenchymal tissues. Rather, there is increasing information on a variety of selected modulators that seem to control mesenchymal progenitor development (Table IV). One may assume that any of these molecules, along with diverse cell types (mesenchymal and nonmesenchymal) and their products (growth factors and matrix molecules), can establish vicinity and temporal relationships that make up the framework for mesenchymal microenvironment(s). The vast repertoire of mesenchymal progenitors identified both in bone marrow and in mesenchymal tissues underscore the need to gain more information not only in the description of a bone marrow microenvironment, but in "local" or mesenchymal tissue microenvironments. The molecular and cellular analysis of such microenvironments will help to understand the fate of each mesenchymal progenitor within a particular tissue, as it has been suggested by several *in vivo* studies (5, 68, 81, 123–126). Together, it may be meaningful to distinguish between a physiologically ongoing versus an injury-derived microenvironment. This distinction should be important in terms of specification of cell phenotype (121) in normal and injury-derived microenvironments. It is without doubt that improvement in the knowledge of mesenchymal microenvironments should have a profound impact in the clinical utilization of mesenchymal progenitors.

Clinical Trials using Mesenchymal Progenitors

Given the promising features of adult stem cells for development of new cell therapies (8, 77), researchers in

Table IV. Modulators of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitors Differentiation

Modulator	Promotes differentiation to:	Precludes differentiation to:	References
1,25-Dihydroxyvit D3	Osteoblasts	Adipocytes	69, 163
Prostaglandin E2	Osteoblasts		164
GH	Osteoblasts		165
LIF	Adipocytes		166
IL-6	Osteoblasts		167
Leptin	Osteoblasts	Adipocytes	168
	Osteoblasts		
TGFβ1	Chondrocytes	Myotubes	32, 169
TGFβ3	Chondrocytes		44
	Osteoblasts		
BMP2	Adipocytes	Myotubes	141, 153, 169, 170
BMP4	Osteoblasts		171
	Tenocytes		
BMP12	Chondrocytes		141
Minimally oxidized low-density lipoprotein	Adipocytes	Osteoblasts	172

field of mesenchymal progenitors have pursued a broad range of investigations to give impulse to their therapeutic utilization. However, a main issue to be resolved is whether mesenchymal progenitors are transplantable, and in addition, what type of progenitor (uncommitted versus committed) is transplantable. These questions will help to decide whether direct loading (injection or implant) or systemic infusion is the best route for mesenchymal progenitor delivery. The former case probably is best suited with a clinical strategy oriented to augment local repair or regeneration of bone (56, 58, 59), cartilage (127), or tendon (61). On the other side, blood delivery of mesenchymal progenitors may be useful in recovering not only a local, but also a systemic dysfunction of a tissue by re-starting their own developmental program. Particularly, in the case of bone marrow one may speculate that the infusion of mesenchymal progenitors followed by a selective homing into marrow stromal sites (51, 128) can result in the increase or improvement of the function of hematopoietic-supporting stroma, which in turn may facilitate engraftment and differentiation of hematopoietic stem cells (77, 129, 130).

The issue of transplantability has been addressed in several studies; however, results are rather contradictory in establishing the origin (host or donor) of mesenchymal progenitors after allogeneic transplantation of marrow harvests (42, 43, 131–134). Contradiction probably arises from the use of different experimental conditions, among them procedures to harvest the marrow (40, 41), methods to type and measure progenitor content in marrow harvests (42), and patient's marrow status to which cells are transplanted (39, 43). In addition, it appears essential to take into account whether the material to be transplanted has to be *ex vivo* expanded to increase the number of progenitors. This may be an important issue, since progenitor stemness and function diverge as cells are subcultivated (30, 39). In the hematopoietic and muscle systems it has been demonstrated that stemness of the grafted cells determines either the long-

or short-term repopulation of the damaged tissue (80, 135). It has yet to be established whether the same occurs after transplantation of *ex vivo* expanded mesenchymal progenitors. Are all mesenchymal progenitors (uncommitted and/or committed) competent to sustain both a long- and short-term mesengensis?

The first clinical trials reported have revealed that the systemic infusion of *ex vivo* expanded autologous mesenchymal progenitors is feasible and safe in the short-term (129, 136). On the other hand, it has been demonstrated that allogeneic bone marrow transplantation (considered as a common source of hematopoietic and mesenchymal progenitors) in children with osteogenesis imperfecta results in impressive histological changes in trabecular bone, which are indicative of new dense bone formation. In addition, increased growth rate and reduced frequencies of bone fracture were also observed (19). These changes, detected 3 months after marrow transplantation, were associated with the engraftment of functional mesenchymal progenitors from the transplanted marrow (137).

Conclusions and Future Directions

The last 5 years have been the scene of a substantial improvement in our understanding of the biology and the potential clinical utilization of adult mesenchymal progenitors. Despite the abundant data on their isolation, culturing, expansion, and differentiation potential, there is still few comprehensive data on mesenchymal progenitor stemness, both *in vivo* and after *ex vivo* cultivation. While several molecular markers are available for committed progenitors and the end-stage phenotypes, at present there are no reliable cell markers to identify the mesenchymal stem cell, *per se*. The few attempts performed to isolate and characterize the mesenchymal stem cell are based on methods that make use of their functional capabilities, which in turn can only be assessed by testing them, which itself may alter the stem cells. There is no doubt that a better characterization of the

uncommitted mesenchymal stem cell in the marrow as well as in distant tissues is an immediate aim in the biology of mesengogenesis. Moreover, the terminology used to describe the repertoire of uncommitted and committed progenitors is still not well defined and has been used unrestrained, which leads to confusion.

However, this lack of information has not been an obstacle in pursuing the therapeutic utilization of these cells, which represents an attractive option for a wide range of clinical applications in the context of both cell and gene therapy strategies. As an integral component of the marrow stroma, mesenchymal progenitor transplantation alone or in conjunction with hematopoietic progenitors would facilitate the engraftment of the hematopoietic stem cell after myeloablative therapy. Also, it has to be determined whether mesenchymal progenitors have the potential to replace chemotherapy- or disease-associated damaged stroma (43), or perhaps their utilization may be beneficial in the management of other diseases (138, 139).

Simultaneously, as precursors of several mesenchymal lineages, mesenchymal progenitors are envisioned as a proper therapy to attenuate or correct disorders of several mesenchymal tissues, among them osteogenesis imperfecta, osteoporosis, osteoarthritis, meniscectomy, and muscular dystrophy. In this respect, recent studies showing the feasibility of adeno- or retroviral-mediated gene transfer of reporter or therapeutic genes into mesenchymal progenitors will greatly contribute to the clinical utilization of these cells (140-143). For the near future we anticipate a rapid closure of many gaps in our knowledge of the biology of mesenchymal progenitor cells, which may facilitate the development of phase II and III clinical trials for new therapeutic alternatives (144). Thus, as it has been recently insinuated, mesenchymal progenitors are "no longer second class marrow citizens" as compared with hematopoietic progenitors, the paradigm of bone marrow cells (137).

The authors greatly appreciate Dr. Mario Roseblatt, Universidad de Chile and Bios-Chile, for advice and critical review of this manuscript. This work was supported by FONDECYT (Chile) (grant nos. 89700-28, 1000-668, and 298-0017) and by the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (Italy) (grant no. CRP/CHI97-01). A.E. is a doctoral fellow from CONICYT (Chile).

1. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170, 1999.
2. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88:287-298, 1997.
3. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:6-71, 1997.
4. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283:534-537, 1999.
5. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10711-10716, 1999.
6. Reyes M, Verfaillie CM. Turning marrow into brain: Generation of

- glial and neuronal cells from adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 94:10(S1):377a, 1999.
7. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530, 1998.
8. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to clinic: Barriers and opportunities. *Science* 287:1442-1446, 2000.
9. Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: Enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 74:1905-1914, 1989.
10. Shields LE, Andrews RG. Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. *J Obstet Gynecol* 178:931-937, 1998.
11. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguzzi JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 20:265-271, 1997.
12. Erics A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109:235-242, 2000.
13. Reading L, Still K, Bishop N, Scutt A. Peripheral blood as an alternative source of mesenchymal stem cells. *Bone* 26(Suppl):9S, 2000.
14. Tavassoli M, Minguell JJ. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 196:367-373, 1991.
15. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science* 287:1427-1430, 2000.
16. Hall AK. Stem cell is a stem cell is a stem cell. *Cell* 33:11-12, 1981.
17. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110:1001-1020, 1990.
18. Muller-Sieburg CE, Deryugina E. The stromal cells' guide to the stem cell universe. *Stem Cell* 13:477-486, 1995.
19. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyritz RE, Brenner M. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 5:309-313, 1999.
20. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 7:451-457, 2000.
21. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147, 1998.
22. Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donnelly van PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13726-13731, 1998.
23. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 21:429-437, 1994.
24. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson S. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176:57-66, 1998.
25. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 14:700-709, 1999.
26. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kappor N, Meyers P, Charney D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56:289-301, 1980.
27. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brake van Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol* 13:237-243, 1985.
28. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow fibroblast colony formation *in vitro*. *Br J Haematol* 97:56-570, 1997.
29. Prockop, DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 276:71-74, 1997.
30. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181:67-73, 1999.
31. Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood* 90:3471-3481, 1997.

32. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113:1161-1166, 2000.
33. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3213-3218, 2000.
34. Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4756-4759, 1980.
35. Chichester CO, Fernández M, Minguell JJ. Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblast. *Cell Adhes Commun* 1:93-99, 1993.
36. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4:267-274, 1976.
37. Tamir A, Petrocelli T, Stetler K, Chu W, Howard J, St Croix B, Slingerland J, Ben-David Y. Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: A role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest. *Cell Growth Differ* 11:269-277, 2000.
38. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278-294, 1997.
39. DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107:275-281, 1999.
40. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 75:424-436, 1999.
41. Blazsek I, Delmas Marsalet B, Legras S, Marion S, Machover D, Misset JL. Large-scale recovery and characterization of stromal cell-associated primitive haemopoietic progenitor cells from filter-retained human bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 23:647-657, 1999.
42. Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, Kolodny EH, Yoseph YB, Gerson SL, Lazarus HM, Caplan AI, Watkins PA, Krivit W. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 27:1675-1681, 1999.
43. Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R, Quarto R. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 27:1460-1466, 1999.
44. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147, 1999.
45. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13:69-80, 1992.
46. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 21:225-235, 1997.
47. Galmiche MC, Koteliensky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 82:66-76, 1993.
48. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, Stro-1. *Blood* 78:55-62, 1991.
49. Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human marrow stromal precursors under-deprived conditions *in vitro*. *Blood* 85:929-940, 1995.
50. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*: Effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 166:585-592, 1996.
51. Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 51:914-926, 1995.
52. Reese JS, Koc ON, Gerson SL. Human mesenchymal stem cells provide stromal support for efficient CD34+ transduction. *J Hematother Stem Cell Res* 8:515-523, 1999.
53. Cheng L, Qasbi P, Vanguri P, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol* 184:58-69, 2000.
54. Minguell JJ. Is hyaluronic acid the "organizer" of the extracellular matrix in marrow stroma? *Exp Hematol* 21:7-8, 1993.
55. Yamazaki M, Nakajima F, Ogasawara A, Moriya H, Majeska RJ, Einhorn TA. Spatial and temporal distribution of CD44 and osteopontin in fracture callus. *J Bone Joint Surg Br* 81:508-515, 1999.
56. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop* 269:274-283, 1991.
57. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4857-4861, 1995.
58. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant* 6:125-134, 1997.
59. Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res* 17:900-908, 1999.
60. Kataoka H, Urist MR. Transplant of bone marrow- and muscle-derived connective tissue cultures in diffusion chambers for bioassay of bone marrow morphogenetic protein. *Clin Orthop* 286:262-270, 1993.
61. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Ortho Res* 16:406-413, 1998.
62. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5:267-277, 1999.
63. Berardi AC, Wang A, Levine JD, Lopez P, Scadden DT. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 267:104-108, 1995.
64. Juan G, Darzynkiewicz Z. Cell cycle analysis by flow and laser scanning cytometry. *Cell Biol* 1:261-274, 1998.
65. Iwata S, Sato Y, Asada M, Takagi M, Tsujimoto A, Inaba T, Yamada T, Sakamoto S, Yata J, Shimogori T, Igarashi K, Mizutani S. Antitumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase (ODC) required for cell growth and transformation. *Oncogene* 18:165-172, 1999.
66. Wolf NS, Kone A, Priestley GV, Bartelmez SH. *In vivo* and *in vitro* characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Exp Hematol* 21:614-622, 1993.
67. Meyts ER, Jorgensen N, Muller J, Shakkeback NE. Prolonged expression of the c-kit receptor in germ cells of intersex fetal testes. *J Pathol* 178:166-169, 1996.
68. Kagawachi N, Toriyama Kazuhiro T, Nicodemou-Lena E, Inou K, Torii S, Kitagawa Y. *De novo* adipogenesis in mice at site of injection of basement membrane and basic fibroblasts growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1062-1066, 1998.
69. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102:341-351, 1992.
70. Hicok KC, Thomas T, Gori F, Rickard DJ, Spelsberg TC, Riggs BL. Development and characterization of conditionally immortalized osteoblast precursor cell lines from human bone marrow stroma. *J Bone Miner Res* 13:205-217, 1998.
71. Dennis JE, Caplan AI. Analysis of the developmental potential of conditionally immortal marrow-derived mesenchymal progenitor cells isolated from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Connect Tissue Res* 35:93-99, 1996.
72. Potten CS. Cell cycles in cell hierarchies. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 49:257-278, 1986.
73. Rao SG, Dravid G. Expansion of haematopoietic stem cells *in vitro*: A challenge to stem cell biologists. *Indian J Exp Biol* 37:1051-1052, 1999.

164. Weinreb M, Grooskopf A, Shir N. The anabolic effect of PGE2 in rat bone marrow cultures is mediated via the EP4 receptor subtype. *Am J Physiol* **276**:E376-E383, 1999.
165. Kroger H, Soppi E, Loveridge N. Growth hormone, osteoblasts, and marrow adipocytes: a case report. *Calcif Tissue Int* **61**:33-35, 1997.
166. Aubert J, Dessolin S, Belmonte N, Li M, McKenzie FR, Staccini L, Vill P, Barhanin B, Vernallis A, Smith AG, Ailhaud G, Dani C. Leukemia inhibitor factor and its receptor promote adipocyte differentiation via the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* **274**:24965-24972, 1999.
167. Taguchi Y, Yamamoto M, Yamate T, Lin SC, Mocharla H, DeTogni P, Nakayama N, Boyce BF, Abe E, Manolagas SC. Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. *Proc Assoc Am Physicians* **110**:559-574, 1998.
168. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* **140**:1630-1638, 1999.
169. Lee MH, Javed A, Kim HJ, Shin HI, Gutierrez S, Choi JY, Rosen V, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Ryoo HM. Trans upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* **73**:114-1999.
170. Gimble JM, Morgan C, Kelly K, Wu X, Dandapani V, Wang Rosen V. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* **58**:393-1995.
171. Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, G G. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -3 murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell* **12**:871-880, 1993.
172. Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo Demer LL. Atherogenic diet and minimally oxidized low-density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* **14**:2067-2078, 1999.

Signal through gp130 activated by soluble interleukin-6 receptor and interleukin-6, enhances osteoblastic differentiation of dexamethasone-stimulated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Alejandro Erices^{1,2}, Paulette Conget¹, Cecilia Rojas¹ and José J. Minguell^{1,2}

¹Programa Terapias Génicas y Celulares, INTA, Universidad de Chile, Santiago, Chile, y ²Laboratorio de Criopreservación, Clínica Las Condes, Santiago, Chile.

Running title: IL-6/sIL-6R in mesenchymal osteodifferentiation

Address correspondence to:

Dr. Alejandro Erices
Programa de Terapias Génicas y Celulares
INTA, Universidad de Chile
Macul 5540, Santiago
CHILE
Phone: (56)2-6781510
Fax: (56)2-2214030
E-mail: aerices@uec.inta.uchile.cl

ABSTRACT

Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) exhibit a potential to differentiate into several mature lineages, including the osteogenic. Osteodifferentiation of murine bone-derived mesenchymal progenitors is modulated by IL-6, however it is not known whether IL-6 affects osteodifferentiation of marrow MSC. Our data show that MSC do not express membrane-bound or soluble IL-6 receptor (sIL-6R), thus any effect of IL-6 is precluded. This lack of effect of IL-6 was not reversed by sIL-6R alone or the sIL-6R/IL-6 complex, as it occurs in other IL-6R negative cells. However, after MSC osteocommittment (by dexamethasone), sIL-6R or sIL-6R/IL-6 complex were able to enhance the activity of alkaline phosphatase, an earlier marker of osteodifferentiation. Our results show that sIL-6R effect was dependent on gp130 availability and involves stat-3 phosphorylation. Thus, it seems that the deficiency of IL-6R represents, for marrow-resident MSC or its committed progenitors, a sort of protective mechanism to escape the osteogenic effect of IL-6. It is speculated that during the transit of MSC or its committed progenitors from marrow into the bone-forming tissues, IL-6R expression or sIL-6R availability may be gained and thus reactivity to IL-6, as it occurs with bone derived osteoprogenitors.

Key words: interleukin-6, interleukin-6 receptor, gp130, mesenchymal cells, osteogenic differentiation.

INTRODUCTION

Within the complex cellular arrangement found in the bone marrow stroma, there exists a subset of nonhematopoietic cells referred to as mesenchymal progenitor cells (MPC). These cells can be *ex vivo* expanded and induced, either *in vitro* or *in vivo*, to terminally differentiate into osteocytes as well as to: chondrocytes, adipocytes, tenocytes, myotubes, astrocytes and hemopoietic-supporting stroma. [1-6].

Osteoblast differentiation of MSC occurs along with an increase in the expression of OSF2/Cbfa1 (a gene involved in commitment to the osteogenic phenotype), together with mRNA expression and/or protein secretion of alkaline phosphatase, type I procollagen and osteocalcin (OC) (except for OC protein) and formation of mineralized nodules [7,8]. Modulators involved in differentiation include natural or synthetic glucocorticoids, as well as other compounds [9-13].

In addition, IL-6 and LIF stimulate *ex vivo* murine osteoblastogenesis as revealed by studies using embryonic fibroblasts, osteoblastic cells lines and calvaria cells [14,15]. In turn, *in vivo* studies have shown increased bone formation after engraftment of cells producing high levels of LIF [16] or after injection of IL-6 [17]. Despite the abundant information on the osteogenic effect of IL-6 and LIF in the murine system, there is no information on whether these cytokines may affect osteodifferentiation of human bone marrow derived-MSC. The above information should be relevant, since marrow stroma (the site of residency of MSC) is a cellular microenvironment rich in IL-6 and LIF producing cells [18-20]

IL-6 and LIF are members of a family of structurally related cytokines (IL-6-type cytokines). In IL-6-responding cells, signal transduction requires binding of the cytokine to its membrane-bound receptor (IL-6R) and subsequent homodimerization of the signal transducer gp130. A key feature in the regulation of IL-6 responses has been the identification of a soluble IL-6 receptor (sIL-6R), which forms a complex with IL-6 (sIL-6R/IL-6 complex) capable of triggering dimerization and activation of gp130 (transsignaling). Soluble forms of gp130 and LIFR also exist, however they possess antagonistic biological activities [21,22]. Through transsignaling, cells that do not express the membrane-associated IL-6R can elicit a variety of cellular responses to IL-6 including proliferation, differentiation and activation of inflammatory processes [23,24].

Here we present evidence showing that exogenous IL-6 does not elicit osteodifferentiation of *ex vivo* expanded cultures of human bone marrow derived- MSC. This lack of activity of IL-6, which is coincident with the lack of expression of IL-6R in these cells, is not reversed by sIL-6R. However, after MSC are committed to differentiate by dexamethasone, sIL-6R or the sIL-6R/IL-6 complex, but not IL-6 alone, enhances osteodifferentiation. Data presented suggest that the effect of sIL-6R depends on the availability and activation of membrane-associated gp130.

METHODS

Isolation and culture of mesenchymal stem cells

Leftover material was obtained from heparinized bone marrow cells from normal individuals undergoing bone marrow harvest for allogeneic transplantation. Mononuclear cells (Ficoll-Hypaque separation) were suspended in α -MEM containing 20% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan Utah, USA), seeded (1×10^6 cells/cm²) and incubated (37° C, 5% CO₂). One week later, the monolayer of adherent cells was trypsinized (0.25% trypsin), washed, resuspended in α -MEM containing 10% FBS (culture medium) and subcultured (7,000 cells/cm²). After the third subculture, the population of adherent cells which exhibit characteristics of MSC [25], were used for all the studies.

Cell proliferation

Cell proliferation was assessed 2 and 4 days after plating MSC (2,500 cells/cm²) in culture medium. For this, adherent cells were stained with 0.2% crystal violet in 10% ethanol (5 minutes at RT), followed by 4 washes with PBS. The dye was eluted with a 50/50 mixture of 0.1 M NaH₂PO₄ pH 4.5 and 50% ethanol and its absorbance at 570 nm was determined on a microplate reader. The number of adherent cells per plate was calculated from a standard curve.

Differentiation of MSC into osteoblasts

For these studies, MSC were incubated in culture medium containing 0.1 μ M dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate and 50 μ g/ml ascorbic acid (Dex medium). Osteodifferentiation - was assessed by the increase in alkaline phosphatase activity [2,10,26], calcium deposition [2] and expression of the osteogenic markers, cbfa-1 and osteocalcin (see below). When the osteogenic effect of cytokines or sIL-6R was assessed, culture or Dex media were supplemented with IL-6 (20 ng/ml), LIF (20 ng/ml) or sIL-6R (200 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), as indicated [14,27].

To investigate whether membrane-bound gp130 was involved in osteodifferentiation, neutralization studies were conducted in the presence of sgp130, anti-human gp130 or anti-human IL-6R monoclonal antibodies (R&D Systems).

Gene expression of commitment markers

Total cellular RNA was extracted by using the SV Total RNA Isolation System kit (Promega, Madison, WI, USA) and used for RT-PCR analysis (Access RT-PCR System kit, Promega). Briefly, 500 ng total RNA were amplified in a 25 μ l PCR mixture that contained 1 mM $MgSO_4$, 0.2 mM each dNTPs, 1 μ M 5'- and 3'-oligo primers, 0.1 U/ μ l AMV reverse transcriptase and 0.1 U/ μ l *Tfi* DNA polymerase. Reverse transcription was performed for 45 minutes at 48°C and cDNA was further denaturated for 2 minutes at 94°C. All PCR reactions were conducted for 30 cycles: at 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds and ended

with an extension at 72°C for 7 minutes. For commitment markers, *cbfa-1* (sense 5'CCGCACGACAACCGCACCAT-3'; antisense 5'-CGCTCCGGCCCACAAATCTC-3') and osteocalcin (sense 5'-GCAGCGAGGTAGTGAAGAGACCCAG-3'; antisense 5'-GAAGCGCCGATAGGCCT-CCTGAAAG-3') (28,29), amplified products were of 390 and 267 bp, respectively. For the housekeeping gene GAPDH (sense 5'-accacagtccatgccatcac-3'; antisense 5'-tccaccaccctgttgctgta-3'), a 540 bp fragment was amplified. The PCR products were visualized after electrophoresis on 2% agarose gels containing 0.5 mg/ml ethidium bromide.

Assessment of cytokine and cytokine receptor expression

The expression of cytokines and cytokine receptors genes was evaluated at the messenger RNA level by using the Multi-probe RNase Protection Assay System (template sets hCK-4 and hCR-2, RiboQuant, Pharmingen, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

The presence of membrane-associated IL-6R, LIFR and gp130 was analyzed after detaching cells with 0,07% EDTA and labeling with anti-human IL-6R, anti-human gp130 or anti-human LIF-R antibodies. (R&D Systems). Concentration of each antibody was previously established by titration. After labeling, cells were incubated with secondary antibody (PE-conjugated anti-mouse IgG1 whole molecule or PE-conjugated anti-goat whole molecule, Sigma, St. Louis, MO, USA) and analyzed by flow cytometry. In each case, at least 10,000 events were acquired and analyzed using the Lysis II software.

Production and release of sgp-130 and sIL-6R was assessed by an ELISA procedure (Quantikine, R&D Systems). Under these conditions, minimum detectable dose for sgp-130 and sIL-6R were 0.2 and 0.03 ng/ml, respectively.

JAK-STAT signal transduction activation.

For these studies, cell lysates were obtained as indicated [14] and stat-3 phosphorylation was assessed by Western blot analysis, using a monoclonal antibody anti-phosphorylated stat-3 (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and developed by a chemiluminescence assay (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, England)

RESULTS

1. Differentiation of MSC induced by dexamethasone..

The cellular and molecular events associated with the osteodifferentiation of MSC were investigated in cells incubated in culture medium supplemented with dexamethasone (Dex medium). The steroid produces a change in MSC morphology, which shifts from a fibroblastic (control) into a polygonal (Dex medium) shape (Fig1A, a and b). Together, in the presence of Dex, there is a time-dependent increase in alkaline phosphatase activity (Fig1A,b and Fig4B) and in matrix calcium accumulation (Fig1A,c) Concomitantly, the specific osteogenic markers, cbfa-1 and osteocalcin which are expressed at low intensity by untreated cells, become fully expressed in cells incubated in Dex medium (Fig. 1A,d). Osteodifferentiation elicited by dexamethasone induces a mild proliferative outbreak (45 %), which does not occurs in untreated MSC (insets to Fig 1A, a and b).

2.- Expression of IL-6-type cytokines and their receptors by MSC..

Expression of IL-6 and LIF as well as their receptors was evaluated at the mRNA level by using a RNase Protection Assay. As seen in Fig 2, MSC incubated both in culture or Dex medium express IL-6 and LIF, along with other growth factors. In turn, under both conditions gene expression was detected for the common chain receptor gp130, but not for IL-6R and LIFR (IL-6R α and LIFR α in Fig 2). In agreement with these observations, flow cytometric analysis unveiled expression of gp130, but not of IL-6R and LIFR (Fig 3). In addition, as detected by an ELISA procedure, cells incubated either in culture or Dex medium release a

soluble form of gp130 (20-100 ng / 1×10^6 cells). Nevertheless, production of sIL-6R was not detected.

3. *Involvement of exogenous sIL-6R, via gp130, in the osteodifferentiation of MSC.*

The observation that IL-6R and LIFR were not expressed by *ex vivo* expanded cultures of marrow-derived MSC, excluded the possibility that IL-6 or LIF may affect their osteogenic differentiation. To validate the above statement, MSC were incubated with IL-6 or LIF and alkaline phosphatase activity was measured as an early and rapid index of osteodifferentiation [30,31]. As seen in Fig 4A, both cytokines do not produce any change in alkaline phosphatase activity. Since sIL-6R acts as an agonist in the action of IL-6 [21,22], we investigated whether the addition of sIL-6R alone or in combination with IL-6 (sIL-6R/IL-6 complex) may affect osteodifferentiation of MSC. As seen in Fig 4A, sIL-6R or the sIL-6R/IL-6 complex were also ineffective in promoting MSC differentiation, as judged by an increase in alkaline phosphatase activity.

However, a different outcome was observed when MSC were committed to osteodifferentiation by dexamethasone. Under these conditions, alkaline phosphatase activity which is null in untreated MSC (Fig 1A,a and Fig 4A), became expressed in MSC incubated in Dex medium (Fig 1A,b and Fig 4B). In turn, when Dex-treated MSC were incubated with sIL-6R, a strong increase in alkaline phosphatase activity was observed. This effect of sIL-6R proved to be time-dependent and further increased by the exposure to the sIL-6R/IL-6 complex (Fig

4 B). In Dex-treated MSC, the addition of IL-6 or LIF alone did not result in any increase in alkaline phosphatase activity (Fig 4, B).

Neutralizing molecules were used to investigate whether membrane-bound gp130 was involved in the effect of sIL-6R. For these studies, MSC in Dex medium supplemented with sIL-6R or the sIL-6R/IL-6 complex, were further incubated in the presence of BSA, sgp130 or monoclonal antibodies against IL-6R or gp130. As compared to BSA, under all neutralizing conditions a significant reduction in alkaline phosphatase activity was observed (Fig. 5).

The finding that an antibody against gp130 decreases alkaline phosphatase activity to the level exhibited by MSC incubated in Dex medium (Fig 5), strongly suggest that availability of membrane-associated gp130 is involved in the effect of sIL-6R, as it occurs in the IL-6-mediated differentiation of osteoblastic cell lines [10,24].

To investigate whether the osteogenic effect of sIL-6R involves gp130 activation, stat-3 phosphorylation was evaluated. As seen in figure 6, stat-3 phosphorylation was not detected in MSC incubated in culture or Dex medium (lanes 1 and 2). However in MSC incubated in Dex medium in the presence of either sIL-6R or the sIL-6R/IL-6 complex, stat-3 phosphorylation was detected (lanes 3 and 5), but completely abolished by neutralizing gp130 monoclonal antibody (lanes 4 and 6).

DISCUSSION

Several reports have documented that IL-6-type cytokines stimulate osteoblastogenesis in murine and human osteoblastic cell lines [14,27]. However, the effect of IL-6 on the osteodifferentiation of ex vivo expanded human marrow-derived MSC has not been fully established. The data presented herein show that IL-6 and LIF do not affect MSC osteodifferentiation, an observation which is consistent with the finding that MSC, as compared to bone-derived progenitors [32], lack the expression of IL-6 receptor (Fig 2 and 3). In addition, MSC exposure to sIL-6R or the sIL-6R/IL-6 complex does not produce any effect on MSC differentiation (Fig 4A) or proliferation (not shown). The inability of MSC to respond to IL-6 (due to the absence of IL-6R), as well as the null effect of sIL-6R in differentiation, seems to be a characteristic feature of MSC. Other cell types lacking expression of IL-6R, differentiate after administration of sIL-6R or the sIL-6R/IL-6 complex [24,27,30].

However, when MSC were committed to osteodifferentiation by dexamethasone, we observed that sIL-6R alone or in combination with IL-6 enhanced osteodifferentiation, as judged by a consistent and strong increase in alkaline phosphatase activity. These results disclose a sort of cross-talk between glucocorticoids (dexamethasone) and IL-6, via sIL-6R, during osteodifferentiation of marrow-derived mesenchymal progenitors. Such relationship is not without precedent, since it has been reported that IL-6 produces a significant increase in glucocorticoid receptors, which in turn, are down-modulated by dexamethasone [33]. In addition, dexamethasone increases the expression of membrane-associated IL-6R with a concomitant release of the soluble form of IL-6R [34].

Since the above relationships require the expression of IL-6R in the target cell, we exclude them as having any functional significance in MSC since these cell do not express IL-6R. However, we do not exclude the possibility that in the presence of dexamethasone and the sIL-6R/IL-6 complex, a significant increase in glucocorticoid receptors may occur, which in turn may exacerbate the osteogenic effect of dexamethasone.

- At present we do not know which cell, in the proposed diagrammatic representation of osteogenic lineages [10], is the target for the sIL-6R effect. However, at the molecular level our results show that the effect of the sIL-6R/IL-6 complex requires gp130 activation. The above mechanism has been demonstrated in bone derived-osteoblastic cells, where gp130 activation by the sIL-6R/IL-6 complex initiates the JAK-STAT signal transduction cascade [14,27].

IL-6, among other cytokines are produced by MSC (Fig 2), as well as by other bone marrow stromal cells [18-20]. Therefore, one may speculate that in vivo, marrow MSC are regularly exposed to an IL-6-rich environment, however the lack of IL-6R in these cells may represent their preventive mechanism(s) to escape from the osteogenic effect of IL-6 [14,27]. If the above contention proves to be correct, MSC or its derived osteoprogenitors) [3], may gain expression of IL-6R during their transit from the marrow into bone-forming tissues. Whether a change in microenvironment (marrow vs bone) [3,32,35], concur in this gain-of-function, is not known and open to future investigations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Walter Sierralta (INTA, Universidad de Chile) for valuable suggestions and critically reading of the manuscript. We also thank Mrs. Valeska Simon (Clínica Las Condes, Santiago, Chile) for flow cytometry support. This work was supported by grants from FONDECYT-Chile (#2980017, 8970028 and 1010566) and from the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology-Italy (# CRP/CHI97-01, a1). AE is recipient of a "Dr. Abraham Stekel" Fellowship (INTA, Universidad de Chile).

REFERENCES

- 1.- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74.
- 2.- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- 3.- Minguell, J.J., Erices, A. and Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* 226: 507-520.
- 4.- Conget, P.A., Allers, C. and Minguell, J.J. (2001). Identification of a discrete population of human bone marrow-derived mesenchymal cells, exhibiting properties of uncommitted progenitors. *J. Hemathoter. Stem Cell Res.* 10: 749-758.
- 5.- Pereira, R.F., Halford, K.W., O'Hara, M.D., Leeper, D.B., Sokolov, B.P., Pollard, M.D., Bagasra, O. and Prockop, D.J. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4857-4861.
- 6.- Kuznetsov, S.A., Friedenstein, A.J. and Robey, P.G. (1997). Factors required for bone marrow fibroblast colony formation *in vitro*. *Br. J. Haematol.* 97: 561-570.

- 7.- Rickard, D.J., Kassem, M., Hefferan, T.E., Sarkar, G., Spelsberg, T.C. and Riggs, B.L. (1996). Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J. Bone Miner. Res.* 11: 312-324.
- 8.- Gori, F., Thomas, T., Hicok, K.C., Spelsberg, T.C. and Riggs, B.L. (1999). Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1522-1535.
- 9.- Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N. and Aubin, J.E. (1988). Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J. Cell Biol.* 106: 2139-2151.
- 10.- Bruder, S.P., Jaiswal, N. and Haynesworth, S.E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell Biochem.* 64: 278-294.
- 11.- Cheng, Su-Li, Yang J.W., Rifas, L., Zhang, Shu-Fang. and Avioli, L. (1994). Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134: 277-286.
- 12.- Beresford, J.N., Bennett J.H., Devlin C., Leboy P.S. and Owen M.E. (1992). Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic

- and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102: 341-351.
- 13.- Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., Jensen, M.D., Burguera, B. and Riggs, B.L. (1999). Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 140: 1630-1638.
 - 14.- Bellido, T., Borba, V.Z.C., Roberson, P. and Manolagas, S.C. (1997). Activation of the janus kinase/stat (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 138: 3666-3676.
 - 15.- Manolagas, E.S. (1998). The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840: 194-204.
 - 16.- Metcalf, D. and Gearing, D.P. (1989). Fatal syndromes in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5948-5952.
 - 17.- Onyia, J.E., Sato, M., Hulman, I., Cole, H., Tu, Y., Miles, R., Zeng, G. and Hock, J.M. (1997). *In vivo* effects of IL-6 on rat bone: increased BMD and osteoprogenitor CFU-F formation efficiency. *J Bone Miner Res* 12: S326.
 - 18.- Ogasawara, H., Tsuji, T., Hirano, D., Aoki, Y., Nakamura, M. and Kodama, H. (1996). Induction of IL-6 production by bone marrow stromal cells on the adhesion of IL-6-dependent hematopoietic cells. *J. Cell Physiol.* 169: 209-216.

- 19.- Almeida, G.D., Porada, C.D., St. Jeor, S. and Ascensao, J.L. (1994). Human cytomegalovirus alters interleukin-6 production by endothelial cells. *Blood* 83: 370-376.
- 20.- Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M. and Gerson, S.L. (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell Physiol.* 176: 57-66.
- 21.- Peters, M., Müller, A.M. and Rose-John, S. (1998). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 92: 3495-3504.
- 22.- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. and Taga, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243-1254.
- 23.- Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., Taga, T., Kishimoto, T. and Suda, T. (1993). Soluble IL-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11924-11931.
- 24.- Jones, S.A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N. and Fuller, G.M. (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J.* 15: 43-58.
- 25.- Conget, P.A. and Minguell, J.J. (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol.* 181: 67-73.

- 26.- Erices, A., Conget, P. and Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 109: 235-242.
- 27.- Nishimura, A., Moriyama, K., Yasukawa, K., Mundy, G. and Yoneda, T. (1998). Combination of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors induces differentiation and activation of JAK-STAT and MAP kinase pathways in MG-63 human osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* 13: 777-785.
- 28.- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.G., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. and Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa-1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764.
- 29.- Stanton, R.P., Hobson, G.M., Montgomery, B.E., Moses, P.A., Smith-Kirwin, S.M. and Funanage, V.L. (1999). Glucocorticoids decrease interleukin-6 levels and induce mineralization of cultured osteogenic cells from children with fibrous dysplasia. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1104-1113.
- 30.- Taguchi, Y., Yamamoto, M., Llámate, T., Lin, S-C. Mocharla, H., DeTogni, P., Nakayama, N., Boyce, B., Abe, E. and Manolagas, S.C. (1998). Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110:559-574.
- 31.- Bonewald, L., Kester, M.B., Schwartz, Z., Swain, L.D., Khare, A., Johnson, T.L., Leach, R.J., Boyan, B.D. (1992). Effects of combining transforming

- growth factor b and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on differentiation of a human osteosarcoma (MG-63). *J. Biol. Chem.* 267: 8943-8949.
- 32.- Bellido, T., Stahl, N., Farruggella, T.J., Borba, V., Yancopoulos, G.D. and Manolagas, S. (1996). Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J. Clin. Invest.* 97: 431-437.
- 33.- Masera, R.G., Dovio, A., Sartori, M.L., Racca, S. and Angeli, A. (2000). Interleukin-6 upregulates glucocorticoid receptor numbers in human osteoblast-like cells. *Z. Rheumatol.* 59 Suppl 2: II/103-107.
- 34.- Paysant, J., Blanque, R., Vasse, M., Soria, J. and Gardner, C.R. (2000). Factors influencing the effect of the soluble IL-6 receptor on IL-6 responses in HepG2 hepatocytes. *Cytokine* 12: 774-779, doi:10.1006/cyto.1999.0649.
- 35.- Watt, F.M. and Hogan, B.L.M. (2000). Out of eden: stem cells and their niches. *Science* 287: 1427-1430.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1.

A) Features associated with the osteodifferentiation of MSC.

For these studies, MSC were grown for 4 days either in culture medium (control) or in Dex-medium (Dex). Under phase contrast microscopy, control cells display a fibroblastoid (a) morphology, which changes into a polygonal one, after incubation in Dex-medium (b)(100X). Alkaline phosphatase activity which is absent in MSC incubated in control medium (a), is expressed after incubation in Dex medium (b, arrows). In turn, after prolonged exposure to Dex medium (15 days), cells exhibit several foci of calcium accumulation, as evidenced by von Kossa staining (c, dark area, 40X)

Insets show the relative cell number (mean \pm sd) of MSC cultures incubated over a period of 4 days under control (a) or Dex (b) conditions. Cell number at day 0 was (15,000/cm²).

B) Expression of osteogenic differentiation markers

Cells incubated as indicated in Fig. A, were assessed by RT-PCR for cbfa-1 and osteocalcin mRNA expression. To monitor equal amounts of RNA, the housekeeping gene GAPDH was used.

Figure 2.

mRNA expression for IL-6, LIF and their receptors.

Autoradiograms of RNase Protection assays show cytokine (left) and cytokine receptor (right) expression patterns in MSC incubated for 7 days in Dex medium.

Notice that in the protected pattern for cytokine receptors, the expected positions for IL-6 Ra and LIFRa have been indicated by a parenthesis.

Autoradiograms of RNase Protection assays for MSC in culture medium, gave similar profiles and are not shown.

Figure 3.

Detection of IL-6R , LIFR and gp130 in MSC by flow cytometry.

MSC incubated for 7 days in culture or Dex medium, were analyzed by flow cytometry for expression of IL-6R , LIFR and gp130.

Solid lines indicate the mean fluorescence intensity for each antigen. Dashed lines represent fluorescence intensity for the respective isotype antibody. Data shown are for cells incubated in Dex medium.

Figure 4.

Effect of sIL-6R or the sIL-6R/IL-6 complex in the osteogenic differentiation of MSC.

MSC in culture (A, control) or Dex (B, Dex) medium, were incubated for 2 or 4 days in the presence of LIF, IL-6, sIL-6R or the sIL-6R/IL-6 complex (see Material and Methods). Osteodifferentiation was assessed by the increase in alkaline phosphatase activity (OD/cell number). Representative data (mean) of a series of 3 experiments in triplicate. SD (not shown) was always less than 4 %.

Figure 5.

Effect of neutralizing molecules in the osteogenic effect of sIL-6R.

MSC in Dex medium in the presence of sIL-6R or sIL-6R/IL-6 were further supplemented with BSA (0,5%), sgp130 (10 µg/ml), anti IL-6R (10 µg/ml) or anti gp130 (10 µg/ml). After 4 days of incubation, alkaline phosphatase activity was measured.

Alkaline phosphatase activity (mean ± SD of 3 experiments in duplicate) was calculated as a relative number, with respect to the activity of MSC incubated in Dex medium alone, value which was set to 1 (horizontal bold line).

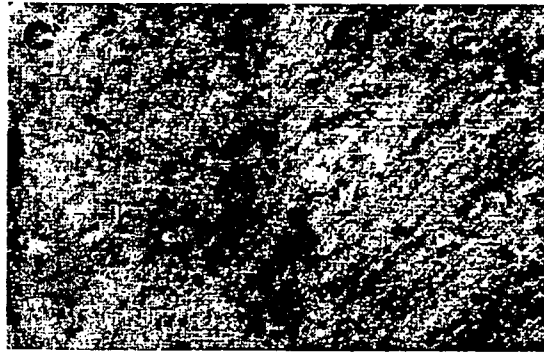
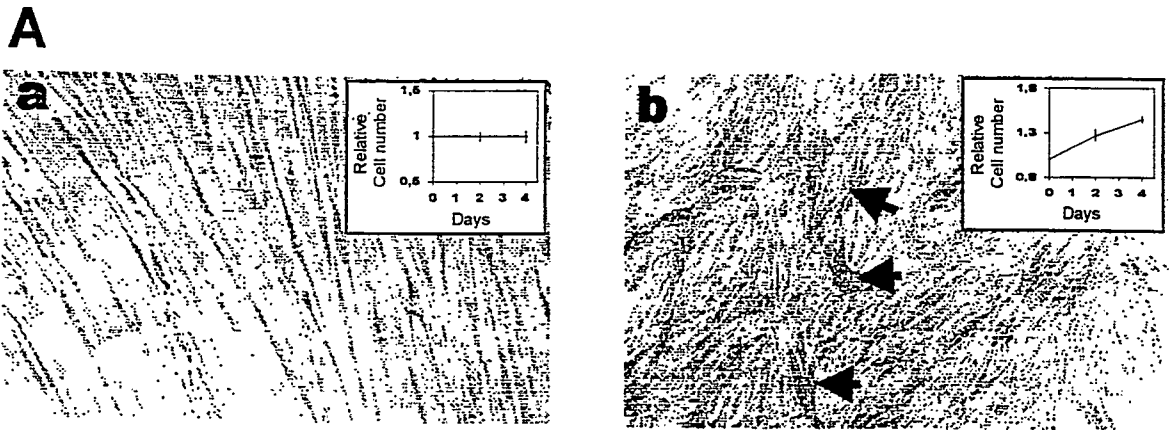
Figure 6

Involvement of stat-3 phosphorylation in the effect of sIL-6R or sIL-6R/IL-6.

For these studies, MSC were incubated either under culture medium (lane 1) or Dex medium (lanes 2-6).

Western blot analysis revealed that stat-3 phosphorylation does not occur in cells incubated in culture or Dex medium (lanes 1 and 2). However, stat-3 phosphorylation was detected in cells incubated under Dex medium, but exposed to either sIL-6R or the sIL-6R/IL-6 complex (lanes 3 and 5). Phosphorylation under the above conditions was precluded by a short-term preincubation (10 min) in the presence of anti-gp130 monoclonal antibody (lanes 4 and 6).

Figure 1.



B

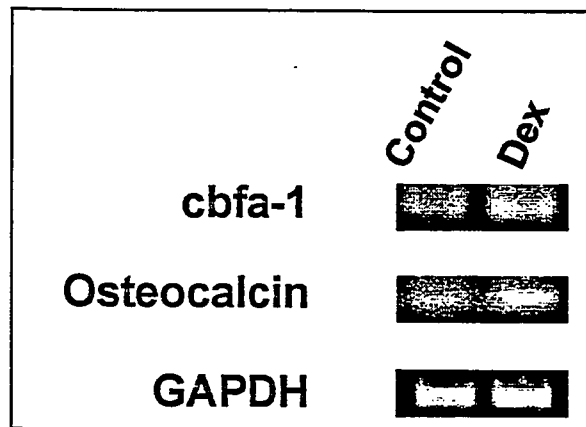


Figure 2.

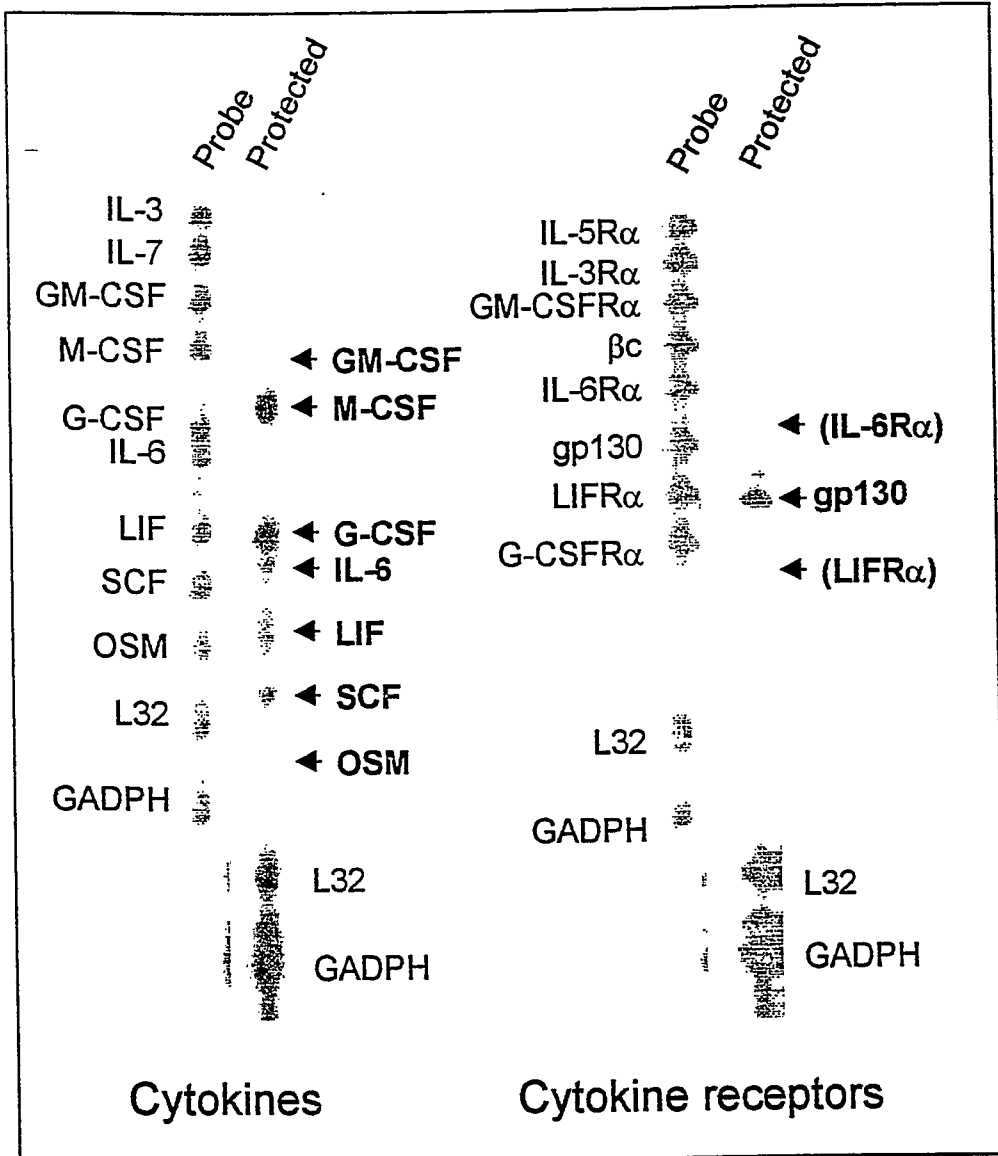


Figure 4.

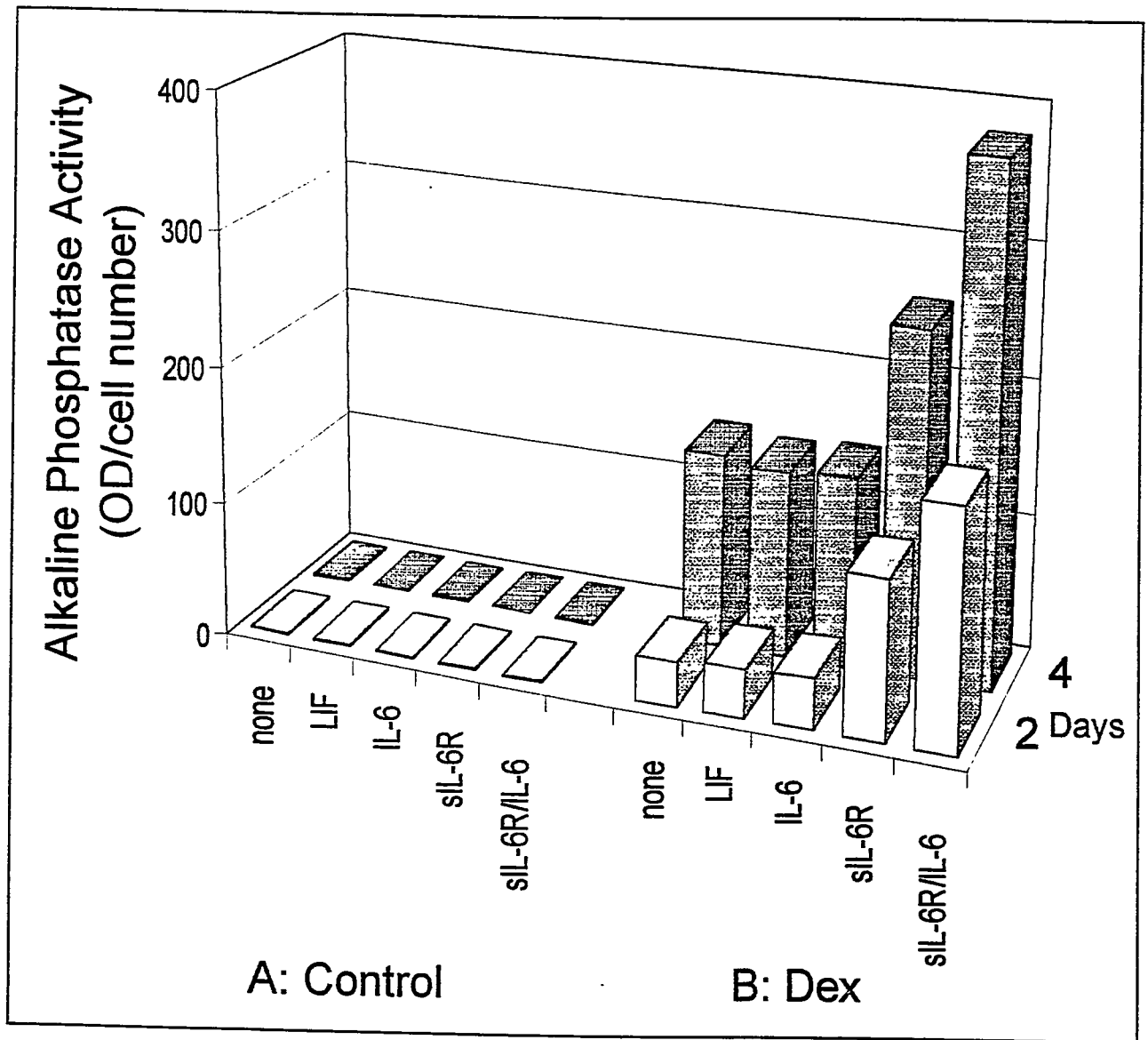


Figure 5.

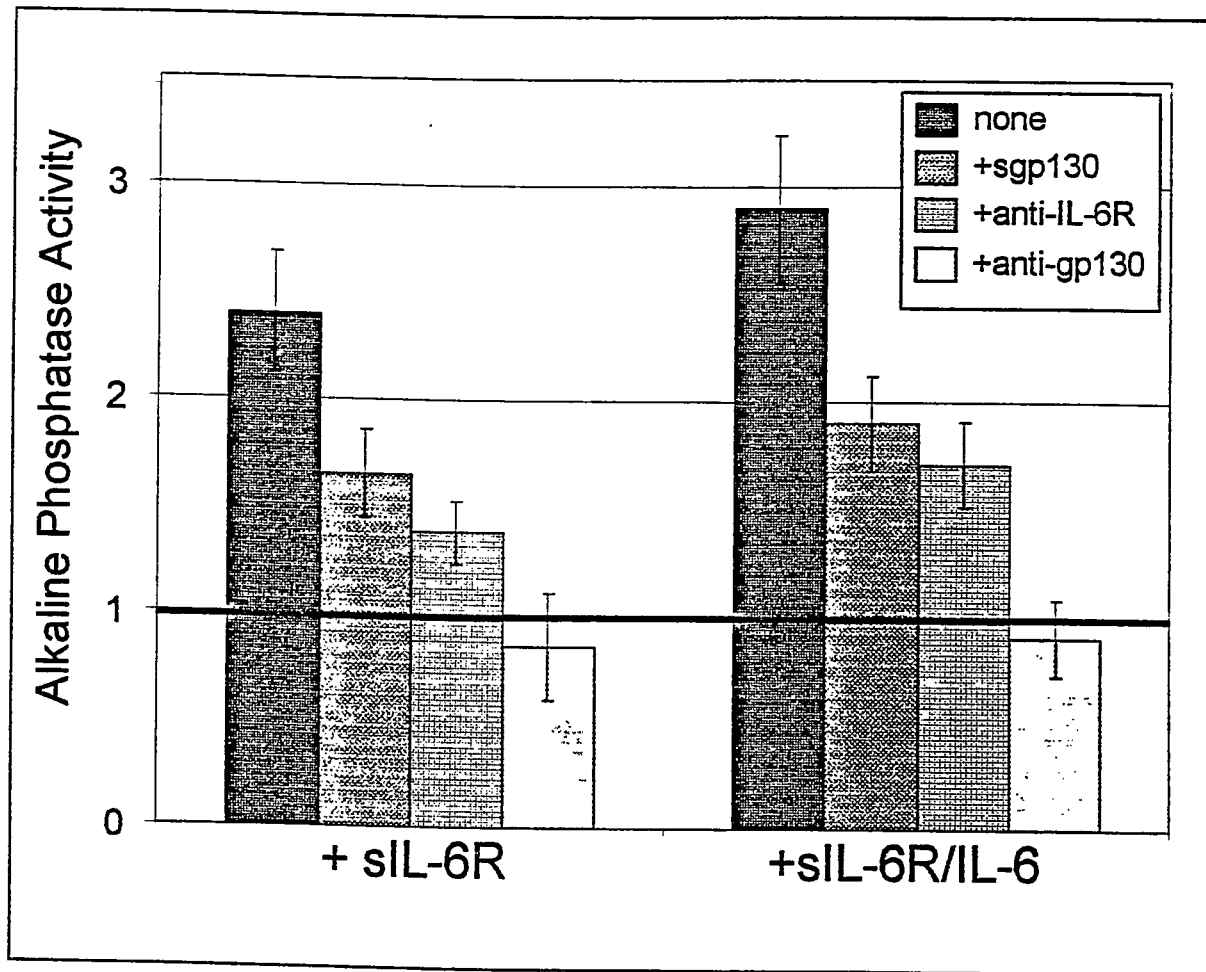
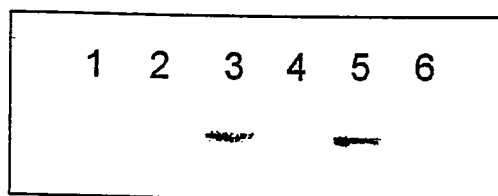
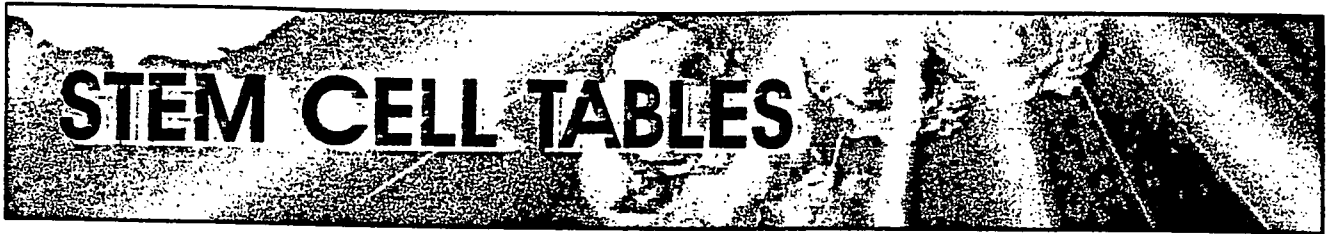


Figure 6



APPENDIX D:



COMPENDIUM OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS REGARDING THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF STEM CELLS

The following tables provide an overview of information about stem cells that have been derived from mice and humans. The tables summarize published research that characterizes cells that are capable of developing into cells of multiple germ layers (i.e., multipotent or pluripotent) or that can generate the differentiated cell types of another tissue (i.e., plasticity) such as a bone marrow cell becoming a neuronal cell. The tables do not include information about cells

considered progenitor or precursor cells or those that can proliferate without the demonstrated ability to generate cell types of other tissues.

The tables list the tissue from which the cells were derived, the types of cells that developed, the conditions under which differentiation occurred, the methods by which the cells were characterized, and the primary references for the information.

Appendix D.v. (cont.)

Origin Tissue	Cell Type	Cell Types Developed	Differentiation Conditions	Methods of Characterization	Reference
Liver (fetal)	HSC	Hematopoietic progenitor cell (HPC) Red blood cell lineages White blood cell lineages	Co-culture of HSCs with mouse stromal cells Implantation of fetal hematopoietic liver cells into immunocompromised mice	Demonstration of differentiation into red and white blood cell lineages through colony-forming assays and detection of surface markers characteristic of the hematopoietic system	McCune et al., 1988 Namikawa et al., 1990
Pancreas	Nestin-positive islet-derived progenitor cell (NIP)	Pancreatic Hepatic	NIPs obtained from pancreatic islets and cultured for extended periods	Observation of extended proliferative, self-renewing, and multipotent capacity Expression of hepatic and exocrine pancreatic markers Demonstration of ductal and endocrine pancreatic features Production of insulin and glucagons	Zulewski et al., 2000
Umbilical cord blood	HPC	Most red and white blood cell lineages	Collection and sorting Stimulation with colony-stimulating factors and interleukin-3	Demonstration of multipotent progenitor, granulocyte-macrophage, and erythroid cell lines	Broxmeyer et al., 1989
	HSC Mesenchymal progenitor cell (MPC)	Most red and white blood cell lineages Osteoblasts Adipocytes	Mixtures of dexamethasone, β -glycerol, ascorbate, insulin, isobutylmethylxanthine, and indomethacin	Cell morphology Cytochemical analysis of osteoblast and adipocyte products Immunophenotyping	Erices et al., 1999