

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS  
HUMANAS AL LINAJE NEURAL: ¿PLASTICIDAD CELULAR O ARTEFACTO?**

Memoria de Título

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

Rodrigo Alfonso Somoza Palacios

Enero, 2008  
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dra. Paulette Conget

Co-Director: Dr. Francisco Javier Rubio

Patrocinante: Dr. Miguel Allende

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

UCH-FC  
Biotecnología  
5693



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS  
HUMANAS AL LINAJE NEURAL: ¿PLASTICIDAD CELULAR O ARTEFACTO?**

Memoria de Título

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

Rodrigo Alfonso Somoza Palacios

Agosto, 2007  
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dra. Paulette Conget  
Co-Director: Dr. Francisco Javier Rubio  
Patrocinante: Dr. Miguel Allende

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
MEMORIA DE TITULO

Se informa a la Escuela de Ciencias de la Facultad de Ciencias que la Memoria de Título presentada por el candidato.

RODRIGO ALFONSO SOMOZA PALACIOS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de la Memoria rendido el día 23, de enero de 2008

Director de Memoria de Título:

Dra. Paulette Conget .....

Comisión de Evaluación de la Memoria de Titulo

Dra. Magdalena Sanhueza .....

Dr. Christian González .....



## AGRADECIMIENTOS

A Javier Rubio por ser un excelente tutor y amigo, además de tener mucha paciencia para guiarme en todos los aspectos de esta tesis

A la Dra. Paulette Conget por darme la oportunidad de hacer este trabajo, por ser una excelente profesora y apoyarme para salir adelante con mi vida profesional

A mis queridos amigos y compañeros Carolina, Julia, Paty, Daniel y Nicolás que alguna vez estuvimos en esta difícil tarea, por su apoyo incondicional, por siempre estar cuando necesite ayuda y compañía

A Carola, Ara, David, Margarita, Paola C. y todos en el laboratorio que me ayudaron y apoyaron en todo momento y que me hicieron sentir parte de este gran grupo

A mi Papá y Mamá por preocuparse de que siempre estuviera bien y darme consejos en los momentos difíciles a lo largo de mi carrera y por supuesto de mi vida

A tía Cristina y tío Carlos por sus consejos y ayuda a motivarme para salir adelante.

Y un especial agradecimiento a Marisel por su amor y por darme el regalo más maravilloso del mundo, nuestro Bebe, Nicolás. Por ustedes luchare por convertirme en un excelente profesional



## RESUMEN

Las células troncales mesenquimáticas (MSC) aisladas de la médula ósea se diferencian hacia los linajes mesenquimáticos: adipo, osteo, condro y miogénico; pero además, utilizando medios de cultivo “especiales” pueden generar células que expresan marcadores neurales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos). Esta propiedad de las MSC ha sido interpretada como plasticidad celular que, podría deberse en el caso de la diferenciación al linaje neural, al mecanismo llamado transdiferenciación. Sin embargo, la expresión de marcadores neurales se ha visto también en cultivos de MSC donde no se ha utilizado medios de inducción neural. En este caso podríamos estar hablando de un artefacto si se demostrara que este hecho es debido a la presencia de células neurales en los cultivos de MSC.

El objetivo de la presente tesis es identificar el(los) fenómeno(s) que da(n) cuenta de la capacidad de MSC humanas (hMSC) de generar células con fenotipo neural. Para ello, 1) se determinaron las mejores condiciones de cultivo que permitieran inducir un fenotipo neural en hMSC, y 2) se generaron clones a partir de cultivos de hMSC los cuales se caracterizaron molecularmente (RT-PCR de tiempo real) en función de la expresión basal de marcadores neurales antes y después de ser expuestos al medio inductor neural, y celularmente (citoquímica) en función de su potencial de diferenciación hacia células del linaje mesenquimático.

De un total de 38 clones obtenidos a partir de 4 muestras de medula ósea de individuos sanos, 87% (33/38) se diferenciaron a células mesenquimáticas. De estos, el 55% (18/33) presentaron algún fenotipo neural dado por la expresión de neuroD1 (factor de transcripción neural) junto con alguno(s) de los otros marcadores de los 3 linajes neurales

estudiados NF-M, GFAP y GalC (marcadores de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, respectivamente). Aquellos clones que no expresaron neuroD1, no fueron considerados dentro del linaje neural. Un 85% de los clones con potencial mesenquimático (26/33) expresaron marcadores neurales antes y después de ser expuestos al medio de inducción neural (medio-NSC), demostrando así el fenómeno de plasticidad neural de hMSC a nivel clonal. Además, la plasticidad neural observada en hMSC pudo ser demostrada a través de 2 mecanismos: transdiferenciación (42,3%) y neuropotencia (57,7%).

La transdiferenciación se define como el mecanismo mediante el cual una hMSC se diferencia a otro linaje distinto mediante la activación de una nueva vía de diferenciación de un linaje distinto al original. En nuestro caso consideramos que los clones con potencial mesenquimático transdiferenciaron al linaje neural cuando, al ser expuestos al medio de inducción, expresaron al menos neuroD1 y adicionalmente alguno(s) de los otros genes neurales analizados (11/26). A su vez, las hMSC pueden tener una capacidad intrínseca de expresar genes neurales en condiciones normales, en ausencia de inducción neural. Aquellos clones con potencial mesenquimático que expresaban genes neurales, antes de la inducción neural fueron considerados clones mesenquimáticos con plasticidad neural debido a un mecanismo que denominamos como “neuropotencia” (15/26). Por otra parte, un 13% del total (5/38) de los clones generados no diferenciaron a ninguno de los linajes mesenquimáticos estudiados, pero expresaron basalmente marcadores neurales, lo que sugiere que en los cultivos de hMSC existe contaminación con células neurales. Así, los resultados de esta tesis demuestran que el fenotipo neural de los cultivos de hMSC se debe tanto a un fenómeno de plasticidad celular como a un artefacto. La identificación de condiciones de cultivo celular que permitan enriquecer los cultivos de hMSC con células neurales, ya sea por un efecto inductor neural o por una selección positiva de la

subpoblación neural contaminante, permitirá disponer de una fuente alternativa de células neurales sin restricciones bioéticas, que podrían utilizarse en estrategias de terapia celular en patologías neurodegenerativas como por ejemplo las enfermedades de Parkinson y Alzheimer.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) isolated from bone marrow can differentiate towards mesenchymal lineages: adipogenic, osteogenic, chondrogenic and myogenic; but in addition, using "special" culture media they can generate cells that express neural markers (neurons, astrocytes and oligodendrocytes). This property of MSC has been interpreted as cellular plasticity that, in the case of differentiation towards neural lineages, can be due to the mechanism called transdifferentiation, nevertheless, the expression of neural markers has been detected in MSC cultures without neural induction media. In this case we can be talking about an artifact if it could be demonstrated that this fact can be due to the presence of neural cells in hMSC cultures.

The objective of the present work is to identify the phenomena that can give account of the capacity of human MSC (hMSC) to generate cells with neural phenotype. For it, 1) the best culture conditions were determined to induce a neural phenotype in hMSC, and 2) clones were generated from hMSC cultures which were molecular characterized (real time RT-PCR) by the basal expression of neural markers before and after exposure to neural induction media, and cellular characterized (cytochemistry) by their potential to differentiate toward mesenchymatic cells.

From a total of 38 clones obtained from 4 samples of bone marrow obtained from healthy individuals, 87% (33/38) of them differentiate into mesenchymatic cells. Of this, the 55% (18/33) presented some neural phenotype because the expression of neuroD1 (neural transcription factor) with some of the other 3 neural lineage marker(s) studied NF-M, GFAP and GalC (neuron, astrocytes and oligodendrocyte markers, respectively). Those clones that did not expressed neuroD1, were not considered within the neural lineage. An



85% of the clones with mesenchymal potential (26/33) expressed neural markers before and after exposure to neural media (NSC-media), demonstrating the neural plasticity phenomena of hMSC at a clonal level. In addition, the neural plasticity observed in hMSC could be demonstrated through 2 mechanisms: transdifferentiation (42,3%) and neuropotency (57,7%).

Transdifferentiation is defined as the mechanism by means of which hMSC differentiate towards a different lineage by the activation of a new differentiation pathway towards another lineage. In our case we consider that clones with mesenchymal potential transdifferentiate towards the neural lineage when, after the exposure to neural media, they expressed at least neuroD1 and additionally some of the other genes analyzed (11/26). By the other hand, the hMSC can have an intrinsic capacity to express neural genes in normal conditions, in absence of neural induction. Those clones with mesenchymal potential that expressed neural genes before neural induction were considered as mesenchymal clones with neural plasticity because of the mechanism we call "neuropotency" (15/26). On the other hand, 13% of the clones (5/38) generated did not differentiate towards any mesenchymal lineage, but expressed neural markers, this result suggest that in hMSC cultures exists contamination with neural cells. Thus, the results of this work demonstrate that the neural phenotype of hMSC cultures is due to a plasticity phenomena and due to and artifact.

The identification of the cellular culture conditions that allow to enrich hMSC cultures with neural cells, by a neural induction effect or by a positive selection of the neural contamination subpopulation, will allow to have an alternative source of neural cells without bioethics restrictions, that can be used in cellular therapy strategies on neurodegenerative pathologies like the Parkinson and Alzheimer disease.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	9
DISEÑO EXPERIMENTAL	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
1. Cultivos celulares	11
1.1 Aislamiento y expansión de hMSC	11
1.2 Aislamiento y cultivo de NSC de rata	12
1.3 Cultivo de células U87 humanas	12
1.4 Viabilidad y proliferación celular	12
1.5 Recuento celular	13
1.6 Criopreservación	13
2. Obtención de medios condicionados por:	14
2.1 Cultivos de hMSC	14
2.2 Cultivos de hU87 y rNSC	14
3. Diferenciación de hMSC a linajes mesenquimáticos	14
3.1 Diferenciación adipogénica	14
3.2 Tinción Oil Red O	15
3.3 Diferenciación osteogénica	15
3.4 Tinción Alizarin red	15
3.5 Diferenciación condrogénica	16

3.6 Tinción Safranina O	16
4. Medio de inducción neural	17
5. Generación de clones a partir de cultivos de hMSC	18
5.1 Obtención de células individuales	18
5.2 Expansión de clones	18
6. RT-PCR de tiempo real	19
6.1 Extracción de RNA	19
6.2 Cuantificación de RNA	19
6.3 Eliminación de posible DNA genómico contaminante	20
6.4 Transcripción reversa	21
6.5 PCR de tiempo real	21
6.6 Curva estándar	22
RESULTADOS	25
1. Aislamiento y caracterización de los cultivos de hMSC	25
1.1. Caracterización celular de cultivos de hMSC	25
1.2. Caracterización molecular de hMSC	26
2. Selección del medio neural	27
2.1 Efecto en la morfología celular	28
2.2 Efecto en la proliferación celular	30
2.3 Efecto en la expresión génica	31
2.4 Medio inductor neural: medio-NSC	33
3. Obtención de células clonales a partir de cultivos de hMSC	34
4. Potenciales mesenquimáticos de los clones derivados de cultivos de hMSC	36

5. Fenotipos neurales de los clones derivados de cultivos de hMSC	38
5.1 Patrón de expresión génica de los clones antes de la exposición al medio-NSC	39
5.2 Patrón de expresión génica de los clones después de la exposición al medio-NSC	41
5.3 Cambios morfológicos observados durante la exposición al medio neural	42
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	59
PROYECCIONES	60
MATERIAL SUPLEMENTARIO	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Potencial mesenquimático y no mesenquimático (plasticidad) de MSC.	4
FIGURA 2: Mecanismos celulares que explicarían la generación de células neurales a partir de MSC <i>in vitro</i> (A-D) e <i>in vivo</i> (E).	5
FIGURA 3: Fenotipos neurales identificados según la expresión de ciertos genes neurales	7
FIGURA 4: Análisis de Tm, PM y sensibilidad de la técnica para los genes analizados en esta tesis mediante RT-PCR de tiempo real	24
FIGURA 5: Morfología y curva de proliferación de células adherentes a plástico aisladas de médula ósea humana	25
FIGURA 6: Inducción de la diferenciación adipo-, osteo- y condrogénica en los cultivos de hMSC	26
FIGURA 7: Efecto de los medios sobre la morfología de cultivos de hMSC	29
FIGURA 8: Efecto de los medios de cultivo sobre la proliferación de cultivos de hMSC	31
FIGURA 9: Potencial de diferenciación mesenquimático de los clones derivados de cultivos de hMSC	37
FIGURA 10: Fenotipos neurales asignados de acuerdo al patrón de expresión de los genes neuroDI, NF-M, GFAP y GalC	39
FIGURA 11: Patrones de expresión de clones derivados de cultivos de hMSC antes de exponerlos al medio neural	40
FIGURA 12: Patrones de expresión de clones derivados de cultivos de hMSC después de exponerlos al medio neural	42
FIGURA 13: Morfología neural observada en algunos clones derivados de cultivos de hMSC	43
FIGURA 14: Efectos del medio de inducción neural (medio-NSC) sobre la expresión génica de clones derivados de cultivos de hMSC	54
FIGURA 15: Plasticidad neural de clones obtenidos de cultivos de hMSC	56

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Medios de cultivo utilizados para seleccionar el mejor medio Inductor neural	17
TABLA 2: Marcadores moleculares utilizados para fenotipificar los cultivos de hMSC y los clones aislados de estos. (se): partidador sentido, (as): partidador antisentido	21
TABLA 3: Condiciones de la PCR para amplificar los distintos marcadores moleculares utilizados para fenotipificar células mesenquimáticas y neurales	22
TABLA 4: Expresión de marcadores mesenquimáticos y neurales en cultivos de hMSC crecidas en medio-MS	27
TABLA 5: Expresión génica de los cultivos de hMSC expuestos a distintos Medios	33
TABLA 6: Eficiencia de clonaje	35
TABLA 7: Clones derivados de cultivos de hMSC con potencial de diferenciación mesenquimático y/o neural	44

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -MEM:	Medio mínimo esencial alfa
AdP:	Precursor adipogénico
ASMA	$\alpha$ actina de músculo liso
bFGF:	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BSA:	Albúmina de suero bovino
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
ESC:	Células troncales embrionarias
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
GF	Factores de crecimiento (bFGF y EGF)
GalC:	Galactocelósido C
GAPDH:	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GFAP:	Proteína ácida fibrilar de glía
hMSC :	Células troncales mesenquimáticas humanas
HSC	Células troncales hematopoyéticas
hU87:	Línea celular de astrocitoma humano
Medio-MSc:	Medio de expansión de MSC ( $\alpha$ -MEM + SFB 10%)
Medio-NSC:	Medio de expansión de NSC
MC-hU87:	Medio condicionado por hU87
MC-rNSC:	Medio condicionado por cultivos primarios de NSC de rata
NF-M:	Neurofilamento medio
NPC:	Progenitor neural
NSC:	Células troncales neurales

OsP:	Precursor Osteogénico
pb:	pares de bases
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA:	Ácido ribonucleico
RT:	Transcriptasa reversa
SFB:	Suero fetal bovino
Ta:	Temperatura ambiente
Tm:	Temperatura de fusión



## INTRODUCCIÓN

Las células troncales o “stem cells” tienen la característica de poder autorrenovarse y además, dar origen a células diferenciadas (Quesenberry y col, 2005).

Las células troncales pueden clasificarse de acuerdo a su potencial de diferenciación en:

i) Totipotentes, capaces de dar origen a las células pertenecientes a las 3 láminas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) y además a los anexos embrionarios.

Las únicas células totipotentes son los blastómeros.

ii) Pluripotentes, capaces de dar lugar a las células de las tres láminas germinales. Estas células derivan de la masa celular interna de un embrión y corresponden a las células troncales embrionarias (ESC).

iii) Multipotentes, capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares de la lámina germinal de la cuál provienen.

Las células troncales también se pueden clasificar dependiendo de su origen. Así se pueden distinguir 2 grandes grupos, aquellas que están presentes en tejidos embrionarios y aquellas presentes en los tejidos no embrionarios, en adelante, células troncales adultas (ASC). Estas últimas pueden ser pluripotentes, multipotentes, oligopotentes o unipotentes.

Existen tantos tipos de ASC como tejidos distintos. Así tenemos descritas células troncales hematopoyéticas (HSC) cuya función es generar los elementos figurados de la sangre (Paquette y col, 2002), células troncales mesenquimáticas (MSC) que dan origen a las células del hueso, cartílago, tendón, tejido adiposo y músculo esquelético o cardíaco (Pittenger y col, 1999) y células troncales neurales (NSC) las cuales se

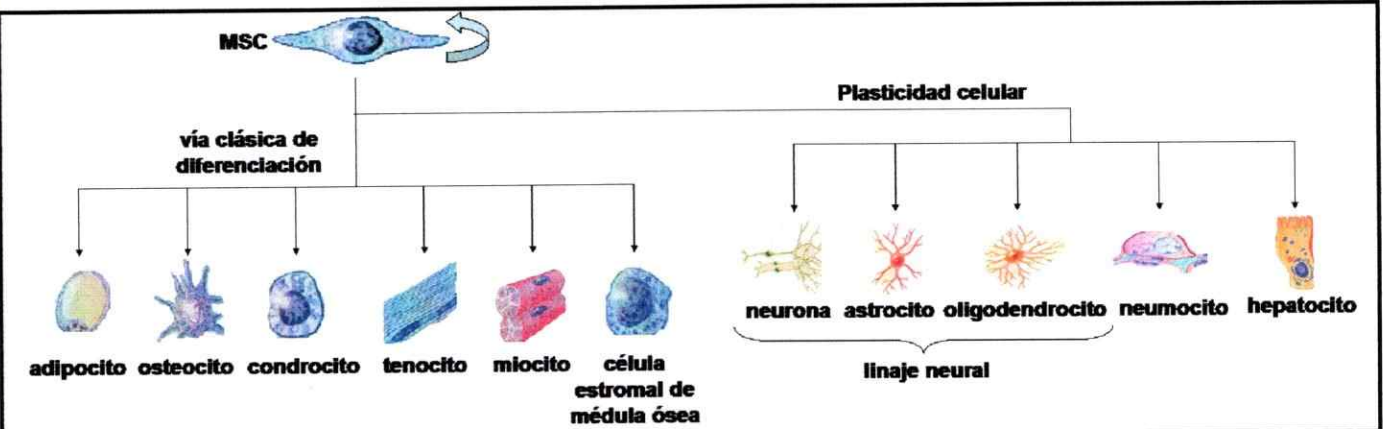
diferencian a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Bottai y col, 2003). También podemos encontrar ASC con un potencial de diferenciación más restringido por ejemplo: progenitor glial (GP) que da origen a astrocitos y oligodendrocitos y progenitor osteocondrogénico que da origen a osteocitos y condrocitos, clasificadas genéricamente como ASC oligopotentes; precursor neuronal (NeuP) que da origen exclusivamente a neuronas, y precursor adipogénico que da origen exclusivamente a adipocitos, clasificadas como ASC unipotentes (Wagers y Weissmann, 2004).

Teóricamente las ESC poseen un mayor potencial terapéutico, pues serían capaces de generar células pertenecientes a todos los tejidos de un organismo adulto. Sin embargo el uso de ESC humanas implica importantes cuestionamientos y limitaciones bioéticas debido a que presupone la destrucción de embriones. Además el uso de ESC en terapias celulares tiene un alto riesgo teratogénico debido a su alto potencial proliferativo no controlado. Por lo tanto, el uso de ESC en el tratamiento de enfermedades será posible en la medida que se acepte la clonación terapéutica y se consiga controlar su proliferación *in vivo*.

En el proceso de gastrulación las ESC se comprometen hacia las tres láminas germinales, dando lugar a los tipos celulares que conforman cada lámina (Wagers y Weissmann, 2004). Este compromiso de linaje se mantiene durante toda la vida del organismo, gracias a que existen ASC con potencial de regenerar las células perdidas (homeostasis celular) frente a daños en los tejidos en los cuales residen (Wagers y Weissmann, 2004). Por mucho tiempo se pensó que las ASC sólo podían dar origen a células pertenecientes al tejido donde se encuentran. Sin embargo, recientemente se ha descrito que, tanto *in vivo* como *in vitro*, las células troncales adultas podrían diferenciar

a células de otros tejidos totalmente distintos al que se aislaron (Bjornson y col, 1999; Brazelton y col, 2000; Sekiya y col, 2002; Wang y col, 2005). A este fenómeno se le ha denominado plasticidad celular, concepto que sugiere que la determinación de linaje de una ASC, no está definido rígidamente sino que puede ser flexible. En consecuencia, el potencial terapéutico de las ASC se ampliaría, y su uso en terapia celular para el tratamiento de distintas enfermedades sería más factible debido a las pocas o nulas restricciones bioéticas relacionadas con su obtención.

Sin embargo existen ASC que se encuentran en tejidos poco accesibles, como el cerebro y su aislamiento directo tiene muchas limitaciones clínicas. Por esta razón, la búsqueda de una fuente alternativa de ASC con plasticidad neural aisladas de tejidos adultos humanos más accesibles esta siendo el objetivo de varios trabajos (Wislet-Gendebien y col, 2003; Hermann y col, 2004). Las hMSC son un tipo de ASC que se aíslan a partir de la médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical en humanos y otros mamíferos. Estas células pueden ser expandidas *ex vivo* e inducidas, tanto *in vivo* como *in vitro*, a diferenciarse hacia todos los fenotipos maduros del linaje mesenquimático: adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos, tenocitos y estroma de soporte hematopoyético (Minguell y col, 2001; Horwitz y col, 2005; Dominici y col, 2006). Además, se ha descrito que a partir de cultivos de MSC derivadas de distintas especies se pueden obtener células no mesenquimáticas como células neurales, neumocitos y hepatocitos (Gussoni y cols, 1999; Petersen y cols, 1999; Woodbury y col, 2000; Weimann y col, 2003; Hermann y col, 2004; Bossolasco y col, 2005; Fig. 1).

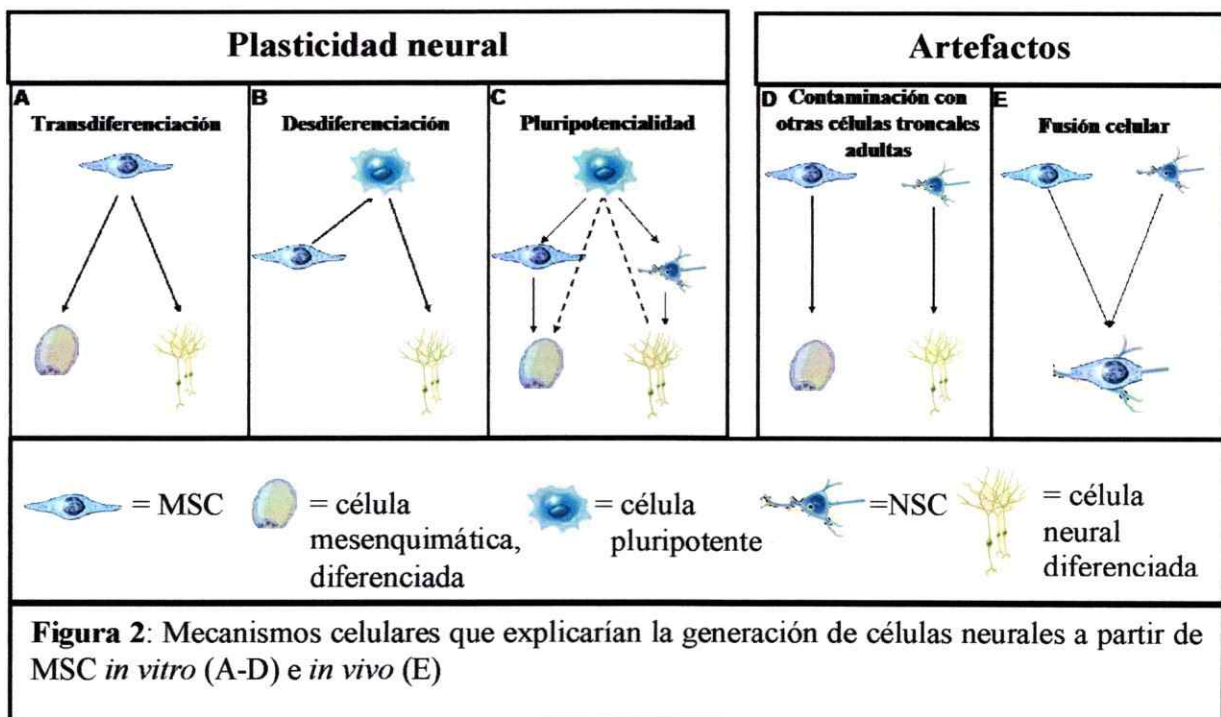


**Figura 1.** Potencial mesenquimático y no mesenquimático (plasticidad celular) de MSC.

En los numerosos trabajos que han mostrado que se pueden obtener células del linaje neural a partir de cultivos de MSC (Brazelton y col, 2000; Sanchez-Ramos y col, 2000; Woodbury y col, 2000; Weimann y col, 2003; Wislet-Gendelbien y col 2003; Hermann y col 2004; Song y col, 2004; Suzuika y col, 2004; Ting y col, 2004; Tondreau y col 2004; Bossolasco y col, 2005; Deng y col, 2005; Wislet-Gendelbien y col, 2005) se han utilizado cultivos primarios, no clonales. Al fenómeno observado se le ha llamado generalmente con el nombre de “transdiferenciación”. Sin embargo este término se refiere a uno de los posibles mecanismos que darían cuenta de la plasticidad descrita en los cultivos de MSC (Wagers y Weissman, 2004). Esencialmente, la plasticidad celular podría ser debida a uno de los siguientes mecanismos: transdiferenciación, desdiferenciación y pluripotencia (Fig. 2). La transdiferenciación, implica que las MSC se diferenciarían a células del linaje neural mediante la activación de la nueva vía de diferenciación (Song y col, 2004). La desdiferenciación, implica un retorno a un estado más indiferenciado, adquiriendo así una potencialidad adicional para diferenciar ahora al menos hacia el linaje neural (Li y col, 2004). Por último, el mecanismo llamado

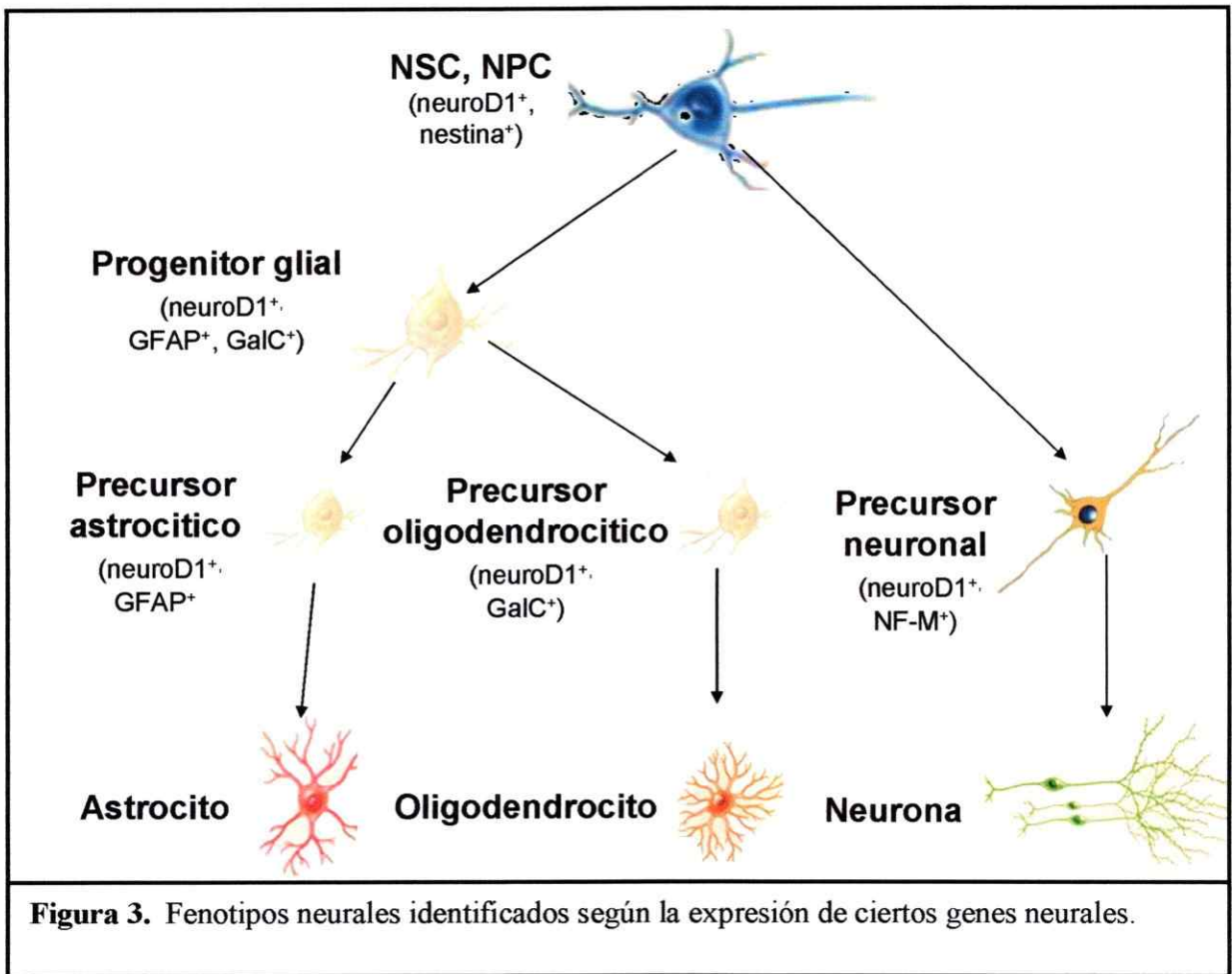
pluripotencia consiste en una capacidad intrínseca de las ASC para diferenciarse a otros tipos celulares distintos al tejido de origen (Jiang y col, 2002; Fig. 2A-C). Sin embargo también podría ser un artefacto debido a contaminación de los cultivos de MSC derivados de médula ósea con células neurales (Ratayczak y col, 2005). In vivo, además existe el artefacto llamado fusión celular por el que aparentemente una célula no neural como las MSC puede expresar marcadores neurales (Alvarez-Dolado y col, 2003; Fig. 2D-E).

A partir de los resultados reportados hasta la fecha no ha sido clasificado el(los) mecanismo(s) involucrados en la obtención de células con fenotipo neural a partir de cultivos de hMSC. Esto es debido principalmente a que no se han hecho estudios a nivel de células individuales o clones.



Para discriminar entre los posibles mecanismos que pudieran dar cuenta del fenómeno de plasticidad celular en los cultivos de MSC humanas (hMSC) es necesario realizar un estudio a nivel clonal, aislando células individuales y confirmando primero su potencial mesenquimático para demostrar después su capacidad de generar células con fenotipo neural, lo cual se realizó en la presente tesis. Para esto utilizamos un conjunto de marcadores moleculares específicos del linaje neural que fueron analizados mediante RT-PCR de tiempo real. Además se analizó el potencial de diferenciación mesenquimático de los clones hacia el fenotipo adipo- y osteogénico.

La expresión de neuroD1 es necesaria y suficiente para iniciar el desarrollo de fenotipos neurales. Además en el cerebro adulto, el factor de transcripción neuroD1 promueve la generación de NSC y NPC localizados en regiones como el hipocampo (Cho y Tsai 2004). Por lo tanto, neuroD1 lo utilizamos como un marcador de compromiso al linaje neural, esencial para cualquier fenotipo neural. Nestina es un filamento intermedio que se expresa predominantemente en NSC y NPC (Steinert y Liemp, 1990; Dahlstrand y col, 1992; Tsai y McKay 2000; Wislet-Gendelbien y col, 2005). Durante el desarrollo, los filamentos intermedios sufren una extensiva remodelación. (Dahlstrand y col, 1992), dando lugar a que se expresen los neurofilamentos maduros de cadena ligera y de cadena media, NF-L y NF-M, marcadores característicos de neuronas (Steinert y Liemp, 1990). Por otro lado utilizamos el gen GFAP como marcador de astrocitos y el gen GalC que codifica para un galactocerebrósido expresado en las membranas de los oligodendrocitos. En la figura 3 se resumen los distintos fenotipos neurales asociados a los marcadores neurales que utilizamos en nuestro estudio.



## **HIPÓTESIS**

Los cultivos de hMSC pueden generar células neurales debido a la presencia de algunas células de origen mesenquimático con capacidad de plasticidad celular.

## **HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Los cultivos de hMSC pueden generar células neurales debido a que contienen células de origen neural



## **OBJETIVOS**

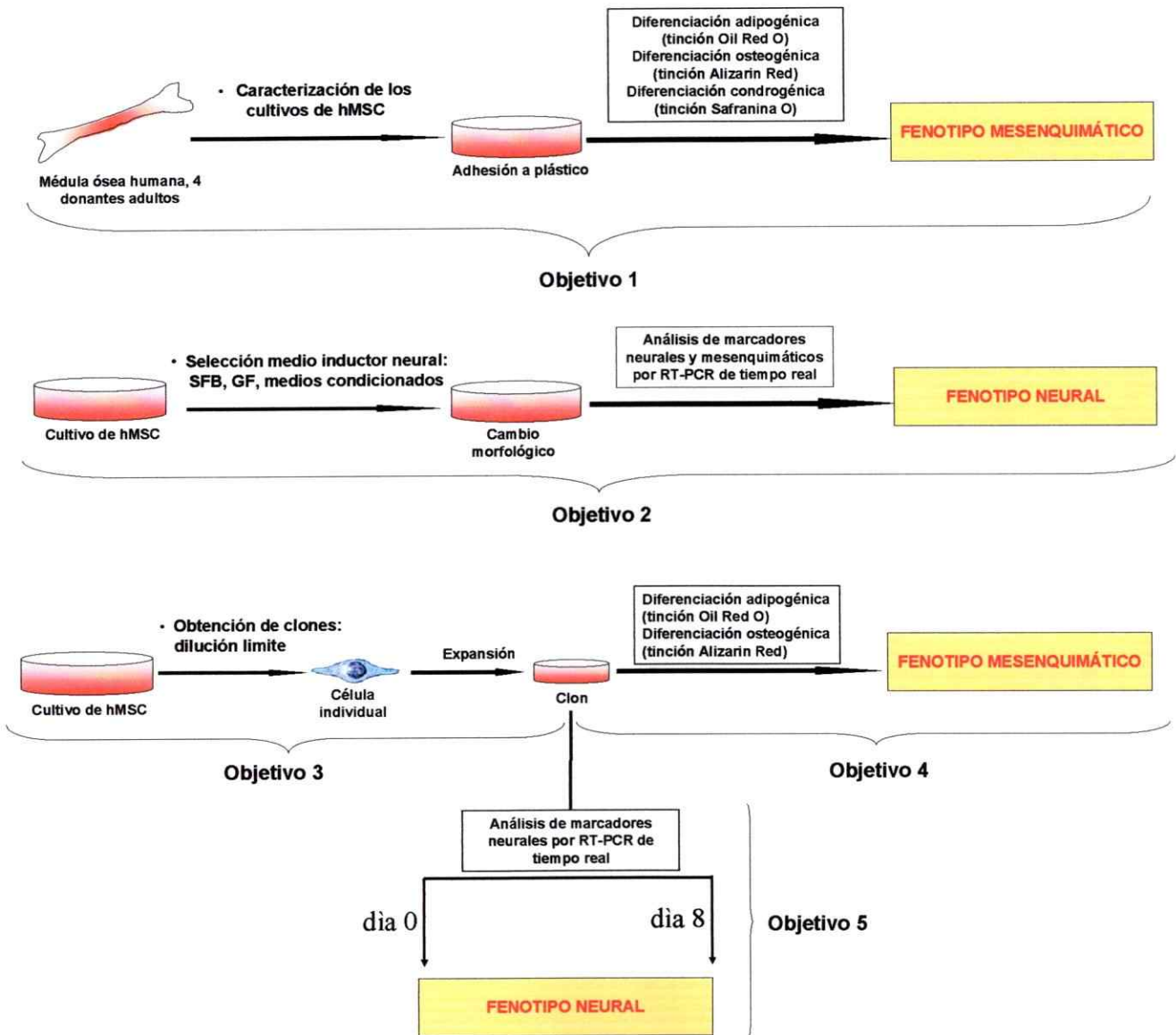
### **Objetivo general:**

Determinar si el fenotipo neural en células derivadas de cultivos de hMSC se debe a la capacidad de plasticidad celular de células o a contaminación por células neurales.

### **Objetivos específicos:**

1. Aislar y caracterizar cultivos de hMSC.
2. Seleccionar un medio inductor neural eficiente que permita obtener un fenotipo neural en células derivadas de cultivos de hMSC
3. Obtener clones celulares a partir de los cultivos de hMSC.
4. Caracterizar los clones derivados de cultivos de hMSC en función de su potencial de diferenciación al linaje mesenquimático.
5. Caracterizar los clones derivados de cultivos de hMSC en función de la expresión génica de marcadores neurales antes y después de exponerlos al medio inductor neural.

## DISEÑO EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y METODOS

### 1. Cultivos celulares.

#### 1.1 Aislamiento y expansión de hMSC

Las hMSC fueron aisladas a partir de muestras de médula ósea de 4 individuos jóvenes sanos, muestras que eran material "sobrante" del banco de médula ósea de la Clínica Alemana Santiago. Cada muestra de médula ósea se diluyó 1/5 (v/v) en tampón fosfato salino (PBS), y luego se centrifugó durante 20 min a 400 x g a temperatura ambiente (Ta). Las células se sembraron en medio mínimo esencial alfa ( $\alpha$ -MEM) (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU) conteniendo suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v) y gentamicina 40 mg/ml (Laboratorio Biosano. Santiago, Chile), en adelante medio-MSC a una densidad de  $1 \times 10^6$  células nucleadas/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en un ambiente aire/CO<sub>2</sub> 95/5% a 37 °C. Aproximadamente 33 h después se lavó la placa 2 veces con PBS para eliminar las células no adheridas y se agregó medio-MSC, el cual se renovó completamente cada 72 h. Cuando el cultivo alcanzó aproximadamente un 80% de confluencia, se tripsinizó incubando con tripsina 0,25% (p/v), EDTA 2,65 mM, (Gibco, Burlington, ON, Canadá) por 10 min a 37 °C. Luego la tripsina se inhibió agregando 2 volúmenes de medio-MSC y se eliminó centrifugando por 10 min a 400 x g a Ta. Las células se resuspendieron en medio-MSC y se sembraron a una densidad de  $7 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, cuando alcanzaron 80% de confluencia se subcultivaron en las mismas condiciones o se usaron para su caracterización en función de su potencial proliferativo y de diferenciación a los linajes mesenquimáticos y luego para los experimentos de esta tesis.

## **1.2 Aislamiento y cultivo de NSC de rata**

Células troncales neurales de rata (rNSC) son aisladas del bulbo olfatorio de ratas neonatas de acuerdo a un protocolo descrito previamente (Liu y Martin, 2003). Las células disgregadas se sembraron en suspensión a una densidad de  $6 \times 10^5$  células/ml en 7-10 ml de medio neural basal (D-MEM/F12 + BSA 1% + glucosa 6 g/L). Después de 24 h la suspensión celular se centrifugó durante 15 min a  $600 \times g$ , luego el medio neural basal se reemplazó con medio-NSC-GF. Después de 24-48 h las células creciendo en suspensión formaron agregados celulares llamadas neuroesferas. Estas células se utilizaron para obtener medio condicionado y además como control de morfología neural.

## **1.3 Cultivo de células U87 humanas**

Las células U87 humanas (hU87) corresponden a una línea celular de un astrocitoma que se utilizó como un control positivo para la fenotipificación neural, pues expresan todos los marcadores neurales analizados y presentan morfología de células neurales (forman neuroesferas). Las hU87 se cultivaron en las mismas condiciones que las descritas para hMSC. Estas células también se utilizaron para obtener medios condicionados y como control de morfología neural.

## **1.4 Viabilidad y proliferación celular.**

Para analizar la viabilidad celular y proliferación se utilizó el ensayo colorimétrico WST-1 (Roche, Alemania). Para ello, se sembraron las células a una densidad inicial de  $4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y a las 24 h se agregó medio (Tabla 1) + 20%

(v/v) WST-1 y se incubaron durante 4 h a 37 °C. Posteriormente se determinó la absorbancia a 450 nm (referencia 595 nm) en un lector de microplacas (Sunrise Remote Control, TECAN, Alemania). Los valores de  $A_{450}$  se normalizaron con respecto al blanco y al valor inicial (día 0).

### **1.5 Recuento celular**

Para realizar el recuento celular se utilizó una cámara de Neubauer tiñendo las células con azul tripán 0,4% (p/v) (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU). Para ello las células se diluyeron 1:1 con azul tripán y se contaron al microscopio óptico (x10) en 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer. La densidad celular se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad celular: [células/ml]} = \text{Promedio n}^\circ \text{ células contadas} / 4 \times 10^4 \times 2$$

El número total de células se cálculo multiplicando la densidad celular por el volumen total en que se resuspendieron las células.

### **1.6 Criopreservación**

Las células se tripsinizaron y luego se centrifugaron durante 7 min a 400 x g a Ta y se resuspendieron en SFB frío 90% (v/v) + dimetil sulfóxido 10% (v/v) a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. Luego se alicuotaron en criotubos y se enfriaron en vapores de nitrógeno líquido por 20 min en posición 4 de ascensor Taylor-Wharton (velocidad de enfriamiento = 3,5 °C/min) y luego, por 20 min en posición 1 (velocidad de enfriamiento = 8 °C/min). Finalmente se almacenaron sumergidas en nitrógeno líquido a -196 °C.

## **2. Obtención de medios condicionados**

### **2.1 Medio condicionado por hMSC**

Las hMSC se sembraron en medio-MSc a una densidad de  $7 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, 48 h después se les retiró el medio y éste se filtró utilizando filtros de tamaño de poro de 0,2 µm (Orange scientific, Bélgica) para eliminar células o restos celulares. El medio condicionado se guardó a 4°C hasta ser utilizado posteriormente para cultivar los clones.

### **2.2 Medio condicionado por hU87 y rNSC**

Cultivos de hU87 a 80% de confluencia y rNSC formando neuroesferas se mantuvieron con medio-NSC-GF durante 48 h y luego se les retiró el medio y se filtró utilizando filtros de tamaño de poro de 0,2 µm. Alícuotas de los medios condicionados filtrados se congelaron a -20 °C hasta ser utilizados.

## **3. Diferenciación de hMSC a linajes mesenquimáticos.**

### **3.1 Diferenciación adipogénica**

Las hMSC se sembraron a una densidad de  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio-MSc. Luego de 24 h, el medio de cultivo se cambió por el medio de diferenciación adipogénico que contenía dexametasona 1 µM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), isobutilmetil xantina (IBMX) 100 µg/ml (Calbiochem, San Diego, EE.UU), Insulina 0,2 U/ml (Humalog, Indianapolis, EE.UU), Indometacina 100 µM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Luego de 10 días, cambiando el medio 2 veces a la semana, se chequeó la aparición de gotas de grasa intracelulares en el microscopio óptico invertido, entonces se realizó la tinción Oil Red O.

### **3.2 Tinción con Oil Red O**

Se preparó una solución Oil Red O (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) saturado en isopropanol 60% (v/v). Para ello, se entibió a 37 °C, luego se agregó Oil Red O hasta generar una solución saturada y se filtró con un filtro de 0,2 µm. Las células fueron lavadas 2 veces con 0,25 ml/cm<sup>2</sup> de PBS. Se agregó 0,25 ml/cm<sup>2</sup> de Oil Red O saturado en isopropanol y se incubó 1 h a Ta. A continuación, se lavó 2 veces con 0,25 ml/cm<sup>2</sup> PBS y se observaron las gotas de grasa teñidas de color rojo en el microscopio óptico invertido con contraste de fase y se fotografiaron (Cámara digital Olympus, Japón).

### **3.3 Diferenciación osteogénica.**

Las hMSC se sembraron a una densidad de  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio-MS. Luego de 24 h, el medio de cultivo se cambió por el medio de diferenciación osteogénico que contenía dexametasona 0,1 µM, ascorbato-2-fosfato 50 µg/ml (Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania), β-glicero-fosfato 10 mM (Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania). El medio se cambió cada 2 días agregando ascorbato-2-fosfato día por medio. Al día 21 de iniciada la diferenciación, las células se tiñeron con Alizarín Red para analizar la mineralización de la matriz extracelular.

### **3.4 Tinción con Alizarín Red**

Las células se lavaron 2 veces con 0,25 ml/cm<sup>2</sup> de PBS luego se fijaron con etanol 70% durante 30 min a Ta. Se lavaron nuevamente con 0,25 ml/cm<sup>2</sup> de PBS, luego se incubaron con 0,25 ml/cm<sup>2</sup> de una solución Alizarín Red (Sigma, Alemania) en

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM durante 10 min a Ta. Después de lavar 5 veces con agua bidestilada ( $0,5 \text{ ml/cm}^2$ ) se incubaron con  $0,25 \text{ ml/cm}^2$  de PBS durante 15 min a Ta y finalmente se observó el precipitado rojo de hidroxapatita en el microscopio óptico invertido con contraste de fase y se fotografió.

### **3.5 Diferenciación condrogénica**

Las células se sembraron en microgota ( $5 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ ) para lograr la densidad y conformación tridimensional necesarias para inducir la formación de una micromasa. Transcurridas 2 h se reemplazó el medio-MSM por medio de diferenciación condrogénica que contenía dexametasona  $0,1 \mu\text{M}$ , ascorbato-2-fosfato  $50 \mu\text{g/ml}$ , insulina  $0,5 \text{ U/ml}$  y TGF- $\beta 3$   $10 \text{ ng/ml}$  (R&D Systems. Minneapolis, EE.UU). Luego de 7 días, cambiando el medio de diferenciación 2 veces a la semana y agregando ascorbato-2-fosfato día por medio, las células se tiñeron con Safranina O para analizar la mantención de la micromasa y la síntesis de proteoglicanos.

### **3.6 Tinción con Safranina O**

Se preparó una solución Safranina (Merck, Darmstadt, Alemania) O al 0,1% (p/v) en etanol. Las células se lavaron 2 veces con  $0,25 \text{ ml/cm}^2$  PBS y se fijaron con  $0,15 \text{ ml/cm}^2$  de etanol al 70% (v/v) durante 10 min, luego se agregó  $0,15 \text{ ml/cm}^2$  de Safranina O y se incubó 5 min a Ta. A continuación, se lavó 1 vez con  $0,25 \text{ ml/cm}^2$  de agua destilada, 5 veces con  $0,15 \text{ ml/cm}^2$  de etanol 70% (v/v) y 1 vez con  $0,15 \text{ ml/cm}^2$  de etanol absoluto. Finalmente se observó la micromasa y proteoglicanos teñidos de color rojo al microscopio óptico invertido con contraste de fase y se fotografió.



#### 4. Medio de Inducción neural

hMSC se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio-MSC. Después de 24 h, el medio de cultivo se cambió por el medio de inducción neural, llamado medio-NSC que contenía medio basal neural (D-MEM/F12 + BSA 1% + glucosa 6g/L), suplementos B27 (Gibco, EE.UU), N2 (Gibco, EE.UU) y los factores de crecimiento EGF (R&D Systems, Inc. EE.UU) y bFGF (Sigma-Aldrich, Inc. Alemania) a una concentración de 10 ng/ml cada uno. También se utilizó el medio-NSC (sin EGF ni bFGF) (medio-NSC-GF), medio-MSC suplementado con EGF 10 ng/ml y bFGF 10 ng/ml (medio-MSC+GF) y medios condicionados por células hU87 y rNSC (MC-hU87 y MC-rNSC, respectivamente). En la Tabla 1 se resumen los distintos medios de cultivo utilizados en esta tesis. Todos los medios contenían gentamicina 40 mg/ml y fueron renovados completamente 2 veces a la semana.

Medio de cultivo	Composición	Utilizado para	Referencia
<b>Medio-MSC</b>	$\alpha$ -MEM+ SFB 10%	Expansión de hMSC	Conget y Minguell 1999
<b>Medio-MSC+GF</b>	$\alpha$ -MEM+ SFB 10% + EGF 10 ng/ml y bFGF 10 ng/ml	Inducción neural	Sanchez-Ramos y col, 2000
<b>Medio-NSC</b>	D-MEM/F12 + BSA 1% + glucosa 6g/L + suplementos B27 y N2 + EGF 10 ng/ml y bFGF 10 ng/ml	Expansión de NSC humanas	Villa y col, 2000
<b>Medio-NSC-GF</b>	D-MEM/F12 + BSA 1% + glucosa 6g/L + suplementos B27 y N.	Inducción neural	Modificado de Sanchez-Ramos y col, 2000
<b>MC-rNSC</b>	Medio recolectado tras 48 h de cultivo de rNSC en medio-NSC-GF		
<b>MC-hU87</b>	Medio-NSC-GF recolectado tras 48 h de cultivo de hU87		

**Tabla 1:** Medios de cultivo utilizados para seleccionar el mejor medio inductor neural

## **5 Generación de clones a partir de cultivos de hMSC**

### **5.1 Obtención de células individuales**

A partir de 4 cultivos de hMSC obtenidos de 4 individuos sanos que estaban en subcultivo 1-4 se obtuvieron 100 células, las cuales se sembraron a una densidad de  $\approx 300$  células/cm<sup>2</sup> en cada pozo de la primera columna de una placa de 96 pozos. Luego utilizando una micropipeta multicanal se hicieron diluciones seriadas en base 2. Al día siguiente se examinaron los pozos al microscopio óptico con contraste de fase, en aquellos pozos en que se observó 1 célula se agregó medio-MSM más medio condicionado por hMSC en una proporción 1:1, con el objetivo de aportar los factores autocrinos producidos por las hMSC. El medio-MSM condicionado se cambió cada 2 días. A la semana se examinaron los pozos y se eliminaron del estudio aquellos pozos que presentaran más de 1 foco de células dado que podrían provenir de más de una célula, no siendo clones.

### **5.2 Expansión de clones**

Cuando las células en los pozos seleccionados se encontraron a 80% de confluencia, se tripsinizaron al igual que cultivos de hMSC y se sembraron en 1,9 cm en presencia de medio-MSM + medio condicionado por hMSC 1:1. Cuando nuevamente se alcanzó un 80% de confluencia, las células se tripsinizaron y se sembraron a  $7 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en 10 cm<sup>2</sup>, siempre con el medio condicionado por hMSC 1:1 hasta obtener suficientes células para sembrar  $4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en 2 pozos de 10 cm<sup>2</sup> y  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en 2 pozos de 1,9 cm<sup>2</sup>. Al día siguiente se agregaron los medios de diferenciación adipogénico, osteogénico o neural.

## **6. RT-PCR de tiempo real**

### **6.1 Extracción de RNA**

Después de retirar el medio de cultivo, las células, se lavaron una vez con PBS y se agregó 0,1 ml/cm<sup>2</sup> de reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad CA, EE.UU). Luego el lizado se traspasó a un tubo eppendorf libre de RNasa y se incubó 5 min a Ta. Posteriormente se agregó 0,3 ml de cloroformo (Merck. Darmstadt, Alemania) por cada ml de Trizol utilizado, se agitó enérgicamente durante 15 s y se dejó reposar durante 3 min a Ta. Luego se centrifugó durante 15 min a 12.000 x g a 4 °C. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendorf nuevo al que se agregaron 0,5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol utilizado. El RNA se dejó precipitando en isopropanol durante 48 h a -20 °C. Una vez precipitado el RNA, la muestra se centrifugó durante 10 min a 12.000 x g a 4 °C. El precipitado de RNA se lavó con 1 ml de etanol 75% (v/v) preparado en agua libre de RNasa (agua + dimetilpirocarbonato 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania) y se centrifugó durante 10 min a 12.000 x g a 4 °C. Finalmente se eliminó el sobrenadante, dejando evaporar lo que quedó de etanol y se resuspendió el RNA en agua libre de RNasa y se incubó durante 10 min a 65 °C para lograr una mejor disolución del RNA. Finalmente el RNA se guardó a -80 °C para ser utilizado posteriormente.

### **6.2 Cuantificación de RNA**

Una alícuota del RNA se diluyó 300 veces en agua libre de RNasa y se midió su absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro (Biomate 3, Thermo Spectronic. EE.UU). Para calcular la concentración de RNA en la muestra se utilizó la siguiente relación:

$$\text{RNA (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 40 \text{ ng/}\mu\text{l} \times 300$$

### **6.3 Eliminación de posible DNA génómico contaminante**

A 1  $\mu\text{g}$  de RNA total se le agregó 1  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción DNasa I 10x (Amplification Grade, Invitrogen. Carlsbad, EE.UU) (Tris-HCl 200 mM [pH 8,4],  $\text{MgCl}_2$  20 mM, KCl 500 mM), 1  $\mu\text{l}$  de DNasa I 1 U/ $\mu\text{l}$  y agua libre de RNAsa hasta completar un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  y luego se incubó 15 min a Ta. Pasado este tiempo, la enzima se inactivó agregándole 1  $\mu\text{l}$  de EDTA 25 mM y finalmente se incubó durante 10 min a 65 °C. Después del tratamiento se cuantificó nuevamente el RNA por el método descrito anteriormente.

### **6.4 Transcripción reversa**

Un  $\mu\text{g}$  de RNA total se incubó 10 min a 70 °C con 1  $\mu\text{g}$  de oligodT (Tib Molbiol. Berlin, Alemania) en un volumen final de 12  $\mu\text{l}$  en agua libre de RNAsa. A continuación se agregó 8  $\mu\text{l}$  de una mezcla que contenía 1  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM (Fermentas Life Sciences, Hanover, EE.UU), tampón de la enzima transcriptasa reversa (RT) M-MLV 1x (Tris-HCl 50 mM [pH 8,3], KCl 7 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, DTT 10 mM), 1  $\mu\text{l}$  de RT M-MLV 200 U/ $\mu\text{l}$  (Promega. Madison, EE.UU), inhibidor de RNAsa 1x (Promega. Madison, EE.UU) y agua libre de RNAsa, de tal manera que la reacción de transcripción reversa ocurriera en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . El cDNA se sintetizó incubando 50 min a 42 °C. Finalmente la enzima se inactivó incubando 15 min a 70 °C. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

## 6.5 PCR de tiempo real.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 10 µl que contenía 100 ng de cDNA, mezcla de PCR LightCycler-DNA Máster SYBR Green (Roche, Alemania) (*Taq* DNA polimerasa + tampón de reacción + dATP + dUTP + dCTP + dGTP + SYBR Green I) + MgCl<sub>2</sub> entre 3-4 mM, partidador sentido 0,5 µM y partidador antisentido 0,5 µM y se realizó la amplificación en un termociclador LightCycler (Roche, Alemania). Las secuencias de los partidores utilizados, el tamaño esperado de los amplicones y sus temperaturas de denaturación se muestran en la Tabla 2. Las concentraciones de enzima, tampón de reacción y dNTPs corresponden a las recomendadas para el kit LightCycler-DNA Máster SYBR Green I de Roche. Las condiciones de amplificación de los genes se resumen en la Tabla 3.

Marcador	Tipo celular que lo expresa	Secuencia partidores	Amplificación		Referencia	N° acceso gene-bank
			Tm (°C)	Tamaño (pb)		
ASMA	MSC	(se) 5'-gatcaccatcggaatgaacg-3' (as) 5'-cttagaagcattgcggtgga-3'	88±0,3	407	Zhang y col, 2004	4501882
nestina	NSC	(se) 5'-tggtcagaggaagagtctga-3' (as) 5'-tccccatttacatgctgtga-3'	88±0,4	169	Hermann y col, 2004	38176299
neuroD1	células comprometidas al linaje neural	(se) 5'-cgctggagcccttctttg-3' (as) 5'-gcggacggttcgtgttg-3'	87±0,2	118	Hermann y col, 2004	4505376
NF-M	neurona	(se) 5'tgggaatggctcgtcattt-3' (as) 5'cttcattggagcgccaatt-3'	86±0,8	333	Nagai y col, 2002	4885512
GFAP	astrocito	(se) 5'-gaggcggccagttatcagga-3' (as) 5'-gttctcctcgcccttagca-3'	90±0,5	168	Hermann. y col, 2004	24430142
GalC	oligodendrocito	(se) 5'ggatcacgagtgggtgatgaaag-3' (as) 5'tgggtccaggataatgagcc-3'	86±0,2	392	Tracey y col, 2002	431309
GAPDH	todas	(se) 5'-cagcctcaagatcatcagca-3' (as) 5'-catgagtcctccaogatac-3'	85±0,3	100	Millington-Ward y col, 2002	7669491

**Tabla 2:** Marcadores moleculares utilizados para fenotipificar los cultivos de hMSC y los clones aislados de estos. (se): partidador sentido, (as): partidador antisentido.

Partidores humanos	Denaturación		Apareamiento		Extensión		Número de ciclos
	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	
ASMA	95	5	50	10	72	20	45
nestina	95	5	65	3	72	7	45
neuroD1	95	5	61	10	72	5	35
NF-M	95	5	54	20	72	15	45
GFAP	95	5	60	20	72	10	45
GalC	95	5	57	5	72	16	45
GAPDH	95	5	57	20	72	5	35

**Tabla 3:** Condiciones de la PCR para amplificar los distintos marcadores moleculares utilizados para fenotipificar los cultivos de hMSC y los clones derivados de estos.

El análisis de denaturación para cada amplicón se determinó mediante un ciclo después de la amplificación que consistió en aumentar la temperatura a 95°C a 20°C/s para la denaturación total de la doble hebra, luego bajando la temperatura hasta 65°C a una velocidad de 20°C/s para la renaturación y finalmente elevando la temperatura hasta 95°C a una velocidad de 0,1 °C/s, registrando la pérdida de fluorescencia cada 0,1 °C.

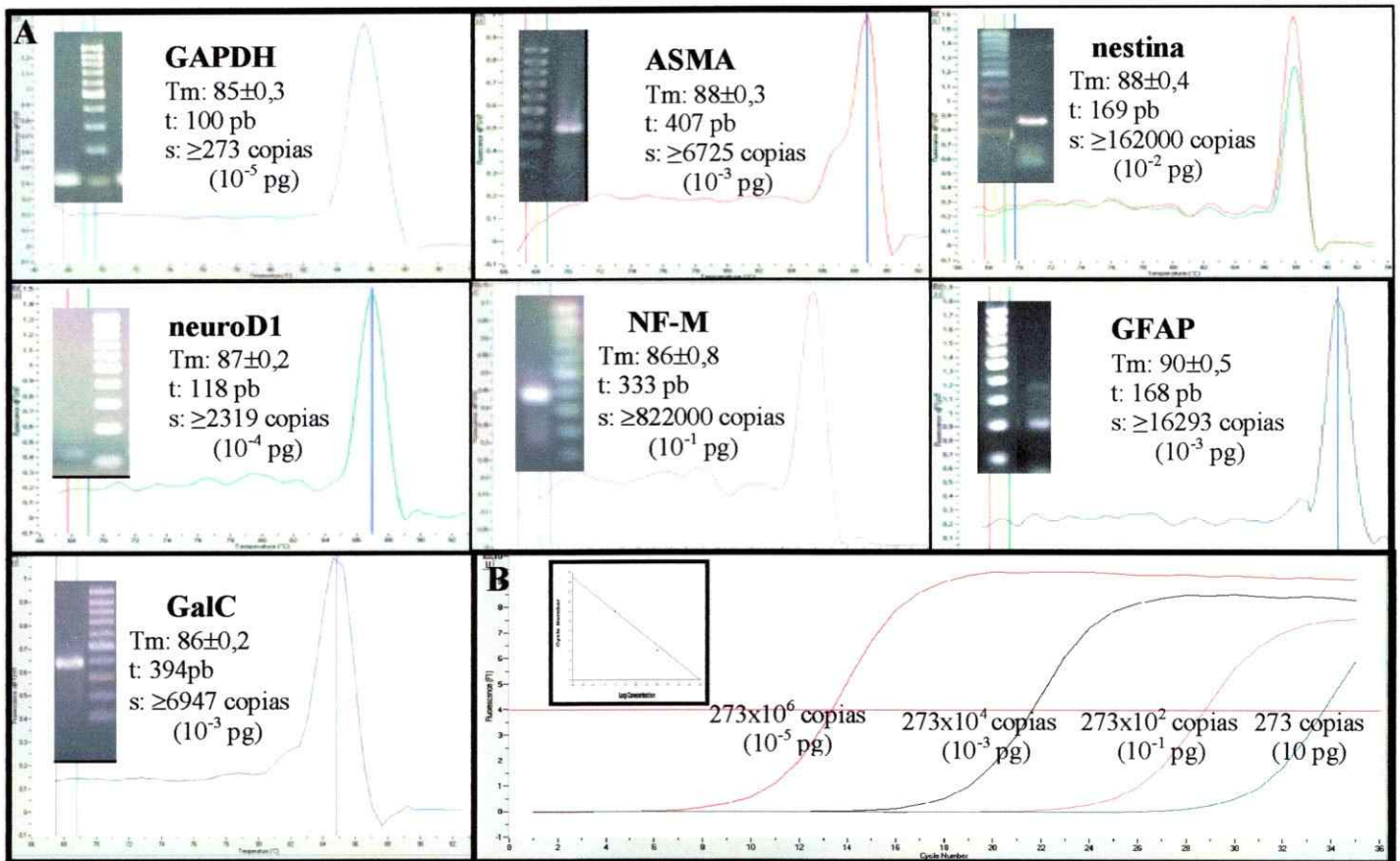
El tamaño esperado para cada amplicón se comprobó electroforéticamente. Para ello, se prepararon geles de agarosa al 2% donde se cargaron las muestras junto con un estándar de peso molecular de 100 pb (GeneRuler™ DNA Ladder 0.5 ug/ul: Fermentas Life Sciences. Hanover, MD, EE.UU). Los geles se tñeron con bromuro de etidio durante 5-10 min, una vez revelados se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (UVP Arquimed, modelo M-20, 230 U 50Hz 0,8 Amp). Finalmente los geles se registraron fotográficamente (Fig. 4A).

## 6.6 Curva estándar

Una vez que las condiciones de amplificación para cada gen estudiado se estandarizaron, se obtuvieron amplicones generados a partir de RNA aislado de hMSC y hU87 (controles positivos) y se precipitaron agregando 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10 M + 2 volúmenes de etanol absoluto a 4 °C. Se dejó durante 10 min a Ta y se centrifugó durante 20 min a 12.000 x g a 4 °C. El DNA así obtenido se resuspendió en agua libre de DNAsa, se y se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{DNA [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times 300$$

A partir de estas soluciones concentradas (“stock”) se generaron diluciones seriadas en base 10, las cuales se usaron como templado para nuevas reacciones de PCR, obteniendo una curva estándar representando el logaritmo de la concentración vs. número de ciclos umbral (Fig 4B). De la curva estándar se obtiene la sensibilidad o límite de detección de la expresión de cada gen utilizado en este estudio. (Fig. 4A). Hay que tener en consideración que las diluciones se realizaron a partir de una reamplificación de los amplicones y por lo tanto la eficiencia de la amplificación, como la sensibilidad (o límite de detección) de la técnica, pudieran ser diferentes a cuando se amplifica una secuencia a partir del cDNA total.



**Figura 4.** Análisis de Tm, PM y sensibilidad de la técnica para cada uno de los marcadores analizados en esta tesis mediante RT-PCR de tiempo real. Análisis de amplicones (tamaño del amplificado, temperatura de denaturación y límite de detección) (A). Determinación del límite de detección (B). Tm = temperatura de melting, t = tamaño del amplificado, s: sensibilidad o límite de detección.

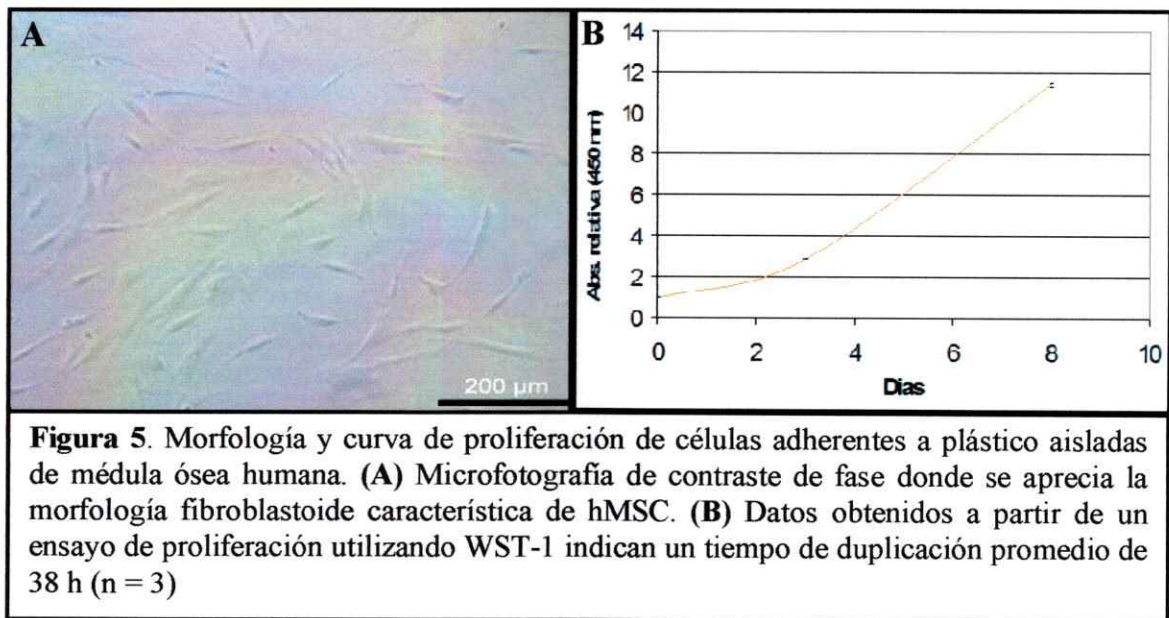


## RESULTADOS

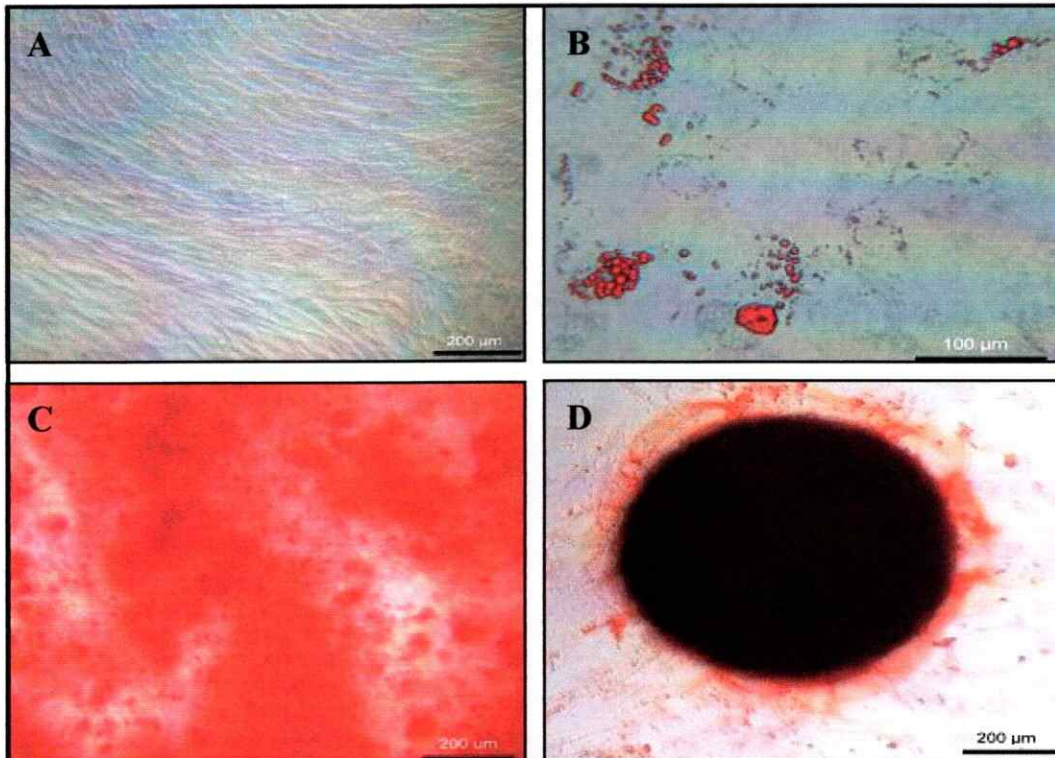
### 1. Aislamiento y caracterización de los cultivos de hMSC.

#### 1.1. Caracterización celular de cultivos de hMSC

Las células adherentes aisladas a partir de aspirados de médula ósea provenientes de 4 individuos sanos mostraban morfología fibroblastoide y proliferaban en presencia de SFB, presentando un tiempo promedio de duplicación de 38 h y mostrando inhibición por contacto (Fig. 5).



Estas células se diferenciaron a adipocitos, osteocitos y condrocitos después de ser incubadas en los medios de diferenciación utilizados clásicamente para inducir la diferenciación de hMSC a estos 3 linajes mesenquimáticos (Fig. 6). Por lo tanto, las células aisladas a partir de médula ósea corresponden efectivamente a hMSC.



**Figura 6.** Inducción de la diferenciación adipo-, osteo- y condrogénica en un cultivo de hMSC representativo. **(A)** Células no expuestas a los medios de diferenciación. La microfotografía es representativa de los controles utilizados para cada tinción. **(B)** Células conteniendo gotas lipídicas teñidas con Oil Red, indican presencia de adipocitos. **(C)** La tinción con Alizarin Red revela mineralización dada por la presencia de osteocitos. **(D)** Micromasa teñida con Safranina O, indicando síntesis de proteoglicanos por células diferenciadas a condrocitos. n=4

## 1.2. Caracterización molecular de hMSC

Mediante RT-PCR de tiempo real se evaluó la expresión del marcador de hMSC, el gen ASMA y de los genes neurales neuroD1, nestina, NF-M, GFAP y GalC en cultivos subconfluentes de hMSC indiferenciadas creciendo en medio-MSM.

ASMA se expresaba en todos los cultivos de hMSC, pero también se expresaban todos los genes neurales que analizamos tanto a los 3 como a los 8 días en cultivo (Tabla

4). Estos últimos datos sugieren que en estos cultivos habían células con fenotipo neural sin haber sido inducidas previamente mediante un estímulo externo.

Condición		ASMA	neuroD1	nestina	$\beta$ tubIII	NF-M	GFAP	GalC	GAPDH
medio- <i>MSC</i>	3d	+	+	+	+	+	+(1)	+(1)	+
	8d	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabla 4.** Expresión de marcadores mesenquimáticos y neurales en cultivos de hMSC crecidas en medio-*MSC*. +: todas las muestras lo expresan; +(1): en 1 muestra no se detectó expresión. La expresión del gen constitutivo GAPDH se utilizó como control de amplificación para evitar resultados falsos negativos. (n=4)

## 2. Selección del medio neural.

Después de caracterizar celular y molecularmente los cultivos de hMSC quisimos determinar una condición de cultivo óptima para inducir un fenotipo exclusivamente neural en los cultivos de hMSC, es decir que expresaran solo los marcadores neurales. Para ello, se utilizaron los medios descritos en la Tabla 1 (pag. 17). Clásicamente se ha utilizado un medio definido sin suero, que contiene EGF y bFGF, para crecer y expandir NSC *in vitro*, (Villa y col, 2000, Martínez-Serrano y col, 2001, Wislet-gendeblien y col, 2003). Por eso, quisimos analizar el efecto de la ausencia de suero en la inducción neural de hMSC, utilizando el medio-NSC-GF, el efecto de factores de crecimiento EGF y bFGF, utilizando el medio-*MSC*+GF y el medio NSC. Por ultimo, con el objetivo de analizar el efecto de otros factores solubles (no definidos) secretados por células de

origen neural, se expusieron los cultivos de hMSC a medio condicionado por rNSC derivadas de bulbo olfatorio (MC-rNSC) y por un astrocitoma humano (MC-hU87).

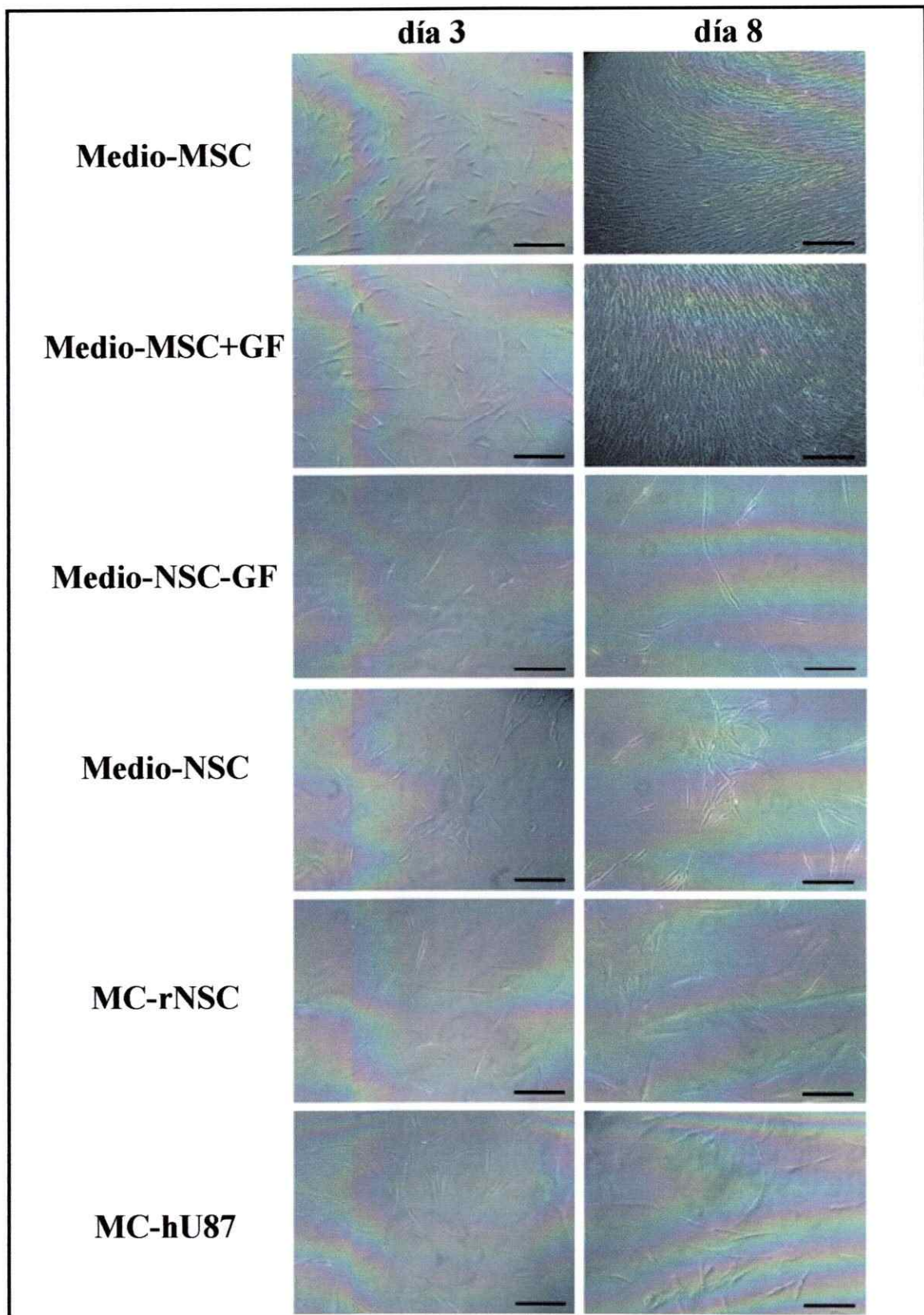
Las hMSC se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio con suero (medio-MS), para favorecer su adhesión a la placa de cultivo. Después de 3-4 h se agregaron los distintos medios para evaluar diferencias en cuanto a la morfología, la proliferación y la expresión génica a los 3 y 8 días post-exposición.

### **2.1 Efecto en la morfología celular**

Todos los cambios en la morfología de las células fueron evaluados en referencia a la morfología celular adoptada utilizando el medio-MS (Fig. 7). No se observaron cambios en la morfología durante los primeros 3 días en medio-MS+GF, sin embargo se apreció que a los 8 días en cultivo las células adoptan una morfología más refringente (Fig. 7). Con el medio-NSC-GF se apreciaron cambios en la morfología desde el día 3, donde las células adoptan una morfología más alargada, la cual se aprecia mejor a los 8 días de cultivo. Este alargamiento celular es típico de morfologías neuronales (Sanchez-Ramos y col, 2000).

El medio-NSC, utilizado normalmente para crecer rNSC de bulbo olfatorio, induce a las células de los cultivos de hMSC a formar agrupaciones, al igual que se aprecia en los cultivos de rNSC (Figura 13B) y hU87 (Figura suplementaria 1). Además, también existe un alargamiento citoplasmático en las células, al igual que en el medio-NSC-GF (Fig. 7). Aunque también los medios MC-rNSC y MC-hU87 son libres de suero (ver Tabla 1), la forma alargada de las células no es tan marcada a los 8 días post-exposición (Fig. 7).



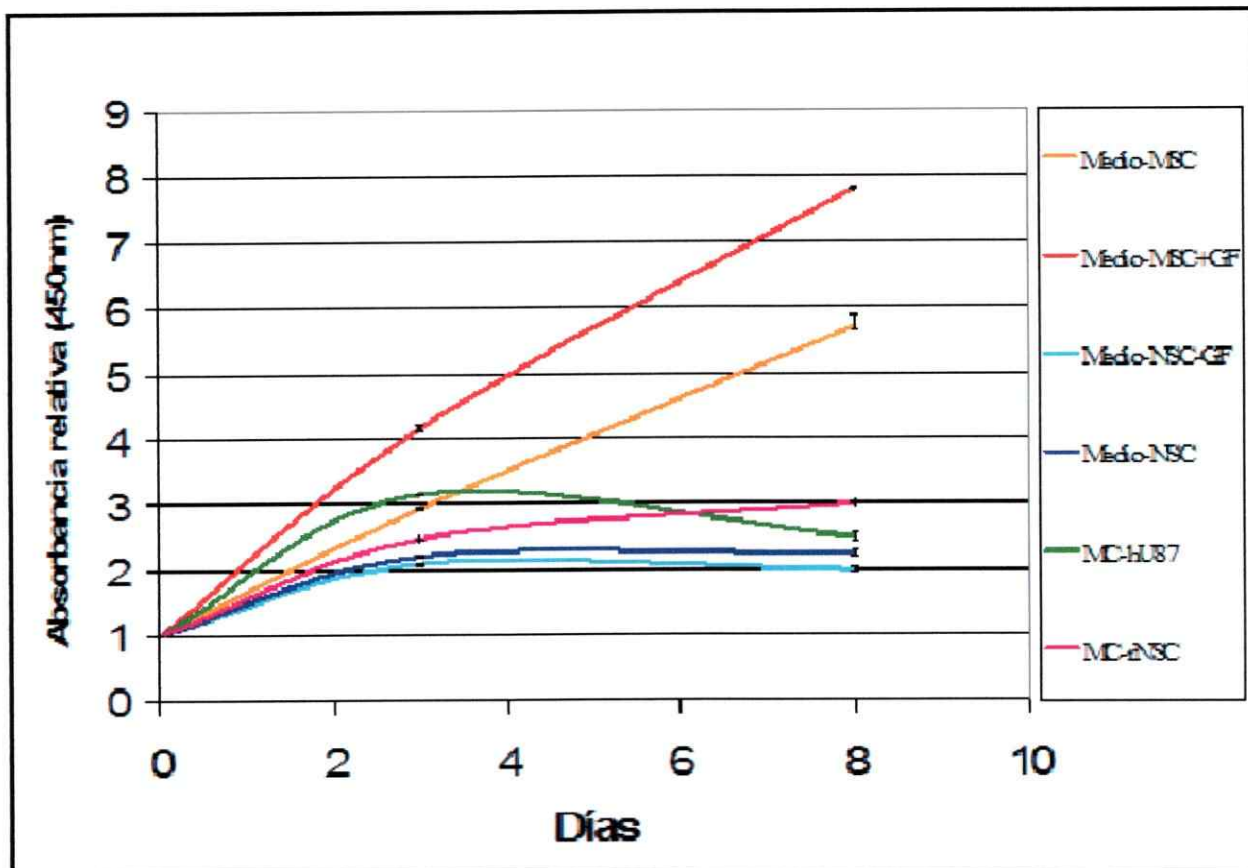


**Figura 7:** Efecto de los medios sobre la morfología de cultivos de hMSC. Las células se cultivaron durante 3 y 8 días en distintos medios y se comparó su morfología con respecto a la condición control (medio-MSK). Las microfotografías son representativas de las 4 muestras. Las barras corresponden a 200  $\mu$ m.

## **2.2 Efecto en la proliferación celular.**

El efecto de los distintos medios sobre la proliferación de las hMSC se evaluó mediante un ensayo colorimétrico utilizando WST-1 (ver materiales y métodos) y se comparó con la condición control (medio-MS). Se observó un aumento en la proliferación celular debido al efecto de los factores de crecimiento EGF y bFGF añadidos al medio de cultivo (medio-MS+GF; Fig. 8). Sin embargo, se observó una disminución de proliferación en aquellos cultivos expuestos a los medios libres de suero (medio-NSC-GF, medio-NSC, MC-rNSC y MC-hU87) al comparar con los medios con suero (medio-MS y medio-MS+GF; Fig. 8).

Dentro de los medios libres de suero, los medios condicionados producen un ligero mayor aumento en la proliferación celular comparado con el medio-NSC y medio-NSC-GF, indicando la existencia de factores liberados por las células neurales murinas y humanas (rNSC y hU87 respectivamente) que favorecen la supervivencia de hMSC. Sin embargo con el MC-hU87 este efecto disminuye drásticamente hacia el final del experimento (Fig. 8).



**Figura 8.** Efecto de los medios de cultivo sobre la proliferación de cultivos de hMSC. Las células se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en distintos medios. A diferentes tiempos post-siembra (0, 3 y 8 días) se determinó la proliferación mediante el ensayo colorimétrico WST-1. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes y en cada experimento las muestras se analizaron por triplicado.

### 2.3 Efecto en la expresión génica

Se evaluó el efecto de los distintos medios en la expresión de los genes ASMA, nestina, NF-M, GFAP y GalC mediante la detección de los mRNA específicos para cada gen por la técnica de RT-PCR. Como se mostró anteriormente, en los cultivos de hMSC se detectaron todos los marcadores que analizamos, incluyendo los marcadores de linaje neural (medio-NSC; Tabla 4).

Al analizar el efecto de factores de crecimiento EGF y bFGF observamos que el patrón de expresión génica no presenta diferencias entre el medio-NSC y el medio-

MSC+GF a nivel global. Sin embargo en algunas muestras no se detectó expresión de algunos genes al día 8 (ver límites de detección en Tabla 4) utilizando el medio-MSC+GF (Tabla 5).

En el medio-NSC que también contiene EGF y bFGF, tampoco se detectó expresión del gen ASMA tanto al día 3, como al día 8. Por lo tanto en este medio los resultados indican que se perdió el compromiso de las células al linaje mesenquimático, pero no así con el linaje neural. De hecho, el gen neural temprano nestina se mantiene expresado durante el tiempo que duró el experimento (en 2 de las 4 muestras analizadas; ver Tabla 5). La expresión de los genes gliales GFAP y GalC no se detectó en 2 y 3 muestras respectivamente, sin embargo la expresión del gen neuronal NF-M siempre se mantuvo. Este resultado podría estar indicando un efecto selectivo ó inductor del medio-NSC sobre la diferenciación hacia el fenotipo neuronal. Con respecto al otro medio libre de suero, medio-NSC-GF, que no contiene EGF ni bFGF, se observa que al día 3 se reprimen totalmente algunos genes siendo el cambio más evidente al día 8, cuando en los 4 cultivos de hMSC se reprimen los genes ASMA y nestina (ver límites de detección en Tabla 4). Este resultado estaría sugiriendo una pérdida de linaje mesenquimático, dado por la ausencia de expresión de ASMA y un mayor compromiso hacia el linaje neural maduro dado por la no detección de la expresión del gen nestina.

En este sentido, también se observa un efecto inductor neural al cultivar las células en MC-rNSC, dado por la ausencia de expresión de ASMA y nestina al día 8 en algunas muestras. Esto nos indica que existen factores que secretan las rNSC que están induciendo a las hMSC a comprometerse hacia el linaje neural maduro. Con el MC-hU87 no se observan variaciones con respecto al control (medio-MSC), lo que indicaría



que los factores secretados por estas células no afectan mayormente a la inducción de un compromiso de los cultivos de hMSC exclusivamente al linaje neural.

Medio	días	ASMA	nestina	NF-M	GFAP	GalC	GAPDH
<b>medio-MS</b>	3	+	+	+	+(1)	+(1)	+
	8	+	+	+	+	+	+
<b>medio-MS+GF</b>	3	+	+	+	+	+(1)	+
	8	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	+
<b>medio-NSC-GF</b>	3	+(2)	+(2)	+	+(2)	+(1)	+
	8	-	-	+	+(3)	+(2)	+
<b>medio-NSC</b>	3	-	+(1)	+	+(2)	+(1)	+
	8	-	+(2)	+	+(3)	+(1)	+
<b>MC-rNSC</b>	3	+(1)	+	+(1)	+(1)	+(1)	+
	8	-	+(2)	+	+(2)	+(2)	+
<b>MC-hU87</b>	3	+(1)	+	+	+(1)	+(1)	+
	8	+(1)	+	+(1)	+(2)	+(1)	+

**Tabla 5.** Expresión génica de los cultivos de hMSC expuestos a distintos medios. Se detectó la expresión de los mRNA mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. +: todas las muestras lo expresan; +(1): en 1 muestra no se detectó expresión; +(2): en 2 muestras no se detectó expresión; +(3): en 3 muestras no se detectó expresión; -: en ninguna muestra se detectó expresión (ver límites de detección en Tabla 4). La expresión del gen constitutivo GAPDH se utilizó como control positivo para evitar resultados falsos negativos.

#### 2.4 Medio inductor neural: medio-NSC

Comparando los distintos medios utilizados anteriormente, el medio-NSC es el mejor en cuanto a que se consigue que los cultivos de hMSC tengan un patrón de expresión génica más parecido a un cultivo de células neurales. Tras ser expuestos al medio-NSC, los cultivos de hMSC expresan exclusivamente los genes neurales que nosotros analizamos y dejan de expresar el marcador mesenquimático ASMA. Estos resultados darían cuenta de un enriquecimiento de los cultivos en células con fenotipo

neural. Los resultados obtenidos con el medio-NSC han sido los más reproducibles comparando con resultados similares obtenidos con el MC-rNSC, y analizando diferentes muestras de médula ósea ( $n = 4$ ). Además, existe proliferación de células utilizando el medio-NSC, aunque en menor grado que cuando se utiliza el medio-MSC (Fig. 8). Por lo tanto elegimos este medio-NSC como el más adecuado para demostrar el fenómeno de la plasticidad neural de hMSC en células individuales.

Adicionalmente las células siguen proliferando en este medio de cultivo, aunque en menor grado que en su medio de crecimiento normal (medio-MSC). Esta discreta proliferación observada con el medio-NSC podría estar dada por: (1) progenitores neurales ya presentes en el cultivo ó (2) progenitores neurales generados a partir de las hMSC. Para investigar ambas hipótesis realizamos un estudio clonal utilizando el medio-NSC como medio inductor neural.

### **3. Obtención de células clonales a partir de cultivos de hMSC**

Con el objetivo de responder a la pregunta si la expresión de marcadores neurales en los cultivos de hMSC se debe a que estos están compuestos por progenitores mesenquimáticos que tienen plasticidad celular, o si están compuestos por una mezcla heterogénea de progenitores incluido aquellos progenitores que pueden ser debidos a la contaminación de células neurales, en la presente tesis se aislaron células individuales mediante la técnica de dilución límite. Todos los cultivos ( $n = 4$ ) se sembraron en 2 placas de 96 pozos, por lo tanto el número de clones generados a partir de cada cultivo o eficiencia clonal depende de cada muestra. La eficiencia se calculó a partir del número de células individuales aisladas y el número de clones finalmente obtenidos (Tabla 6).

La eficiencia de clonaje fue similar para todos los cultivos (67-70%), excepto para el cultivo C (15%).

El tiempo de expansión desde el día en el cual se aisló 1 única célula, hasta el día en el que se extrajo RNA (aproximadamente  $2 \times 10^5$  células, 18 divisiones poblacionales) fue variable (Tabla 6).

cultivo de hMSC	N° subcultivo	N° pocillos con una sola célula	tiempo de expansión (días)	N° clones	eficiencia de clonaje (%)
A	4	15	30-35	10	67
B	1	27	25-29	19	70
C	3	20	38	3	15
D	1	12	22-30	8	70


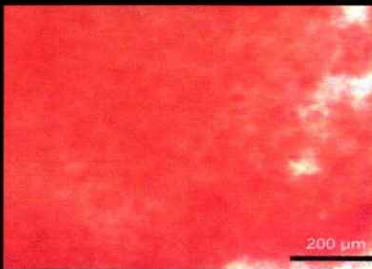
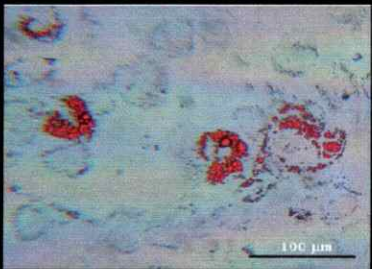
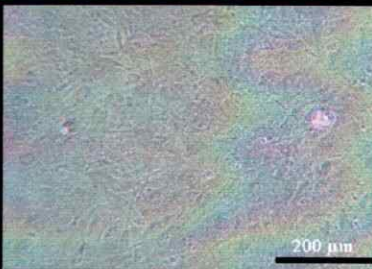
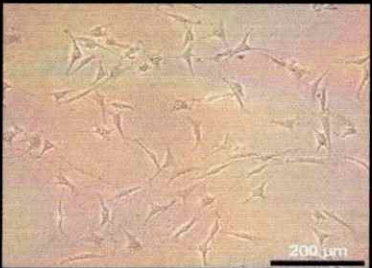
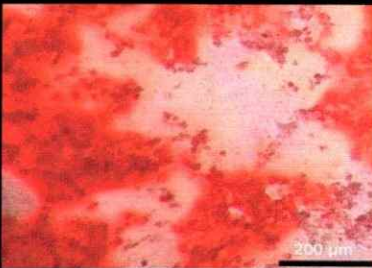
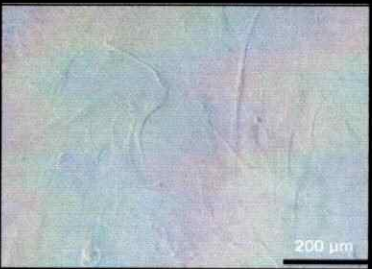
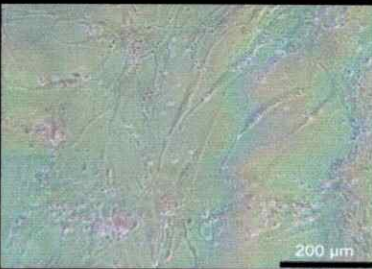
**Tabla 6.** Eficiencia de clonaje. Se obtuvieron clones mediante dilución límite a partir de cultivos de hMSC provenientes de 4 pacientes sanos (A, B, C y D). La eficiencia corresponde al cociente del número de células individuales aisladas y el número de clones finalmente obtenidos.

Luego de la expansión, cada clon se diferenció a células del linaje mesenquimático (adipocitos y osteocitos) con el mismo protocolo utilizado para los cultivos de hMSC de los cuales provenían los clones. En paralelo, cada clon se expuso durante 8 días al medio inductor neural (medio-NSC).

Dado que no se detectó la expresión de nestina en los clones, para clasificar el fenotipo neural de cada clon, se tuvo en cuenta diferencias en la expresión de los otros marcadores neurales (neuroD1, NF-M, GFAP y GalC) antes y después de ser expuestos al medio-NSC.

#### **4. Potenciales mesenquimáticos de los clones derivados de cultivos de hMSC**

Se realizaron los ensayos de diferenciación adipogénica y osteogénica en los 38 clones generados, al igual que se había hecho con los cultivos originales. Los clones fueron clasificados en función de su potencial de diferenciarse a adipocitos y/u osteocitos. Así se obtuvieron 3 tipos distintos de fenotipos mesenquimáticos: MSC, Adp y OsP (Fig. 9). También hubo clones que no dieron lugar a adipocitos ni osteocitos, que fueron clasificados como posibles progenitores no mesenquimáticos “contaminantes”. Resumiendo los resultados, 10 clones se diferenciaron hacia los 2 fenotipos analizados (clones tipo MSC), 21 dieron lugar solamente a adipocitos (tipo AdP), mientras que sólo 2 clones se diferenciaron a osteocitos (tipo OsP). Por último 5 clones no se diferenciaron a adipocitos ni osteocitos (tipo no mesenquimáticos; Fig. 9).

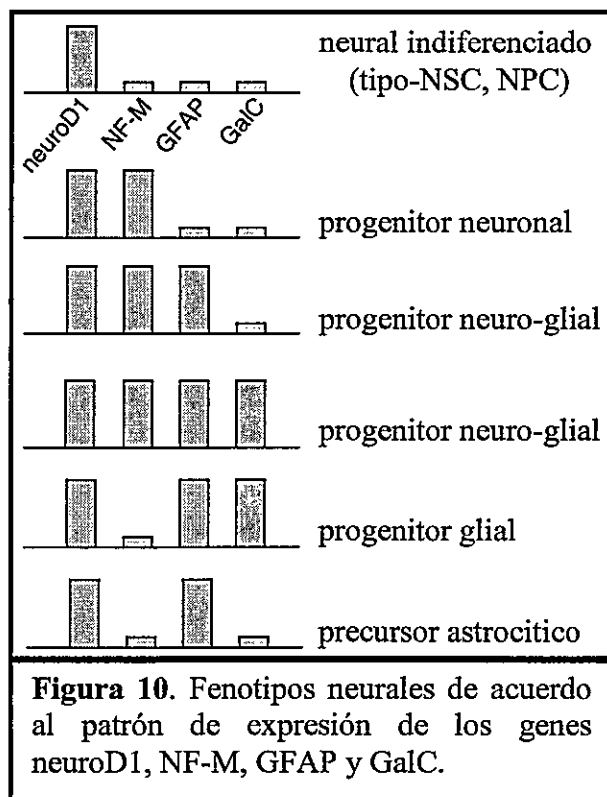
	Diferenciación adipogénica	Diferenciación Osteogénica	Fenotipo asignado	Otros clones con igual fenotipo
clon A01			MSC	A05, A06 A08, A09, A10, B08, B18, D03, D05,
clon D08			Adp	A02, A03, A04, A07, B01, B02, B03, B04, B05, B06, B09, B11, B13, B14, B15, B16, B19, B27, C01, C03
clon B10			OsP	B07
clon D02			no mesenquimático	B17, C02, D06, D07

**Figura 9.** Potencial de diferenciación mesenquimático de los clones derivados de cultivos de hMSC. Microfotografías representativas de los distintos tipos de clones encontrados. La formación de gotas de grasa se evaluó mediante tinción con Oil Red O para la diferenciación adipogénica. La mineralización de la matriz extracelular se determinó mediante tinción con Alizarín Red para la diferenciación osteogénica.

## 5. Fenotipos neurales de los clones derivados de cultivos de hMSC.

Considerando el conjunto de los datos obtenidos mediante RT-PCR de tiempo real, definimos los distintos fenotipos neurales de los clones (Fig. 10), dados por la expresión del factor de transcripción neuroD1 como marcador necesario e indicativo del linaje neural. La expresión de neuroD1 estaría indicando un fenotipo neural indiferenciado (Panchision y McKay, 2002; Bottai y col, 2003; Suzukia y col, 2004). Cuando se observa formación de agregados celulares similares a los cultivos de NSC, esto nos estaría indicando un fenotipo neural tipo NSC. Cuando no observamos formación de agregados celulares lo denominamos progenitor neural NPC.

La expresión de neuroD1 y NF-M la interpretamos como un fenotipo de progenitor neuronal, mientras que la expresión en conjunto de genes neuronales y gliales fue definida como de un progenitor neuro-glial. La expresión de marcadores de glía (neuroD1, GFAP y GalC) la definimos como un fenotipo de progenitor glial. El fenotipo molecular GFAP<sup>+</sup>/neuroD1<sup>+</sup> lo definimos como estado de precursor astrocítico (Fig. 10). La ausencia de los 4 genes neurales analizados es indicativa de un fenotipo no neural. Así como la ausencia de expresión de neuroD1 entre los genes neurales expresados, lo denominamos como fenotipo pseudo-neural. Toda nuestra clasificación está basada en lo descrito anteriormente sobre la expresión de los genes neurales utilizados en esta tesis (Steinert y Liemt 1990; Lodie y col, 2002; Panchision y col, 2002; Wislet-Gendebien y col, 2003; Cho y Tsai 2004; Suzukia y col, 2004).

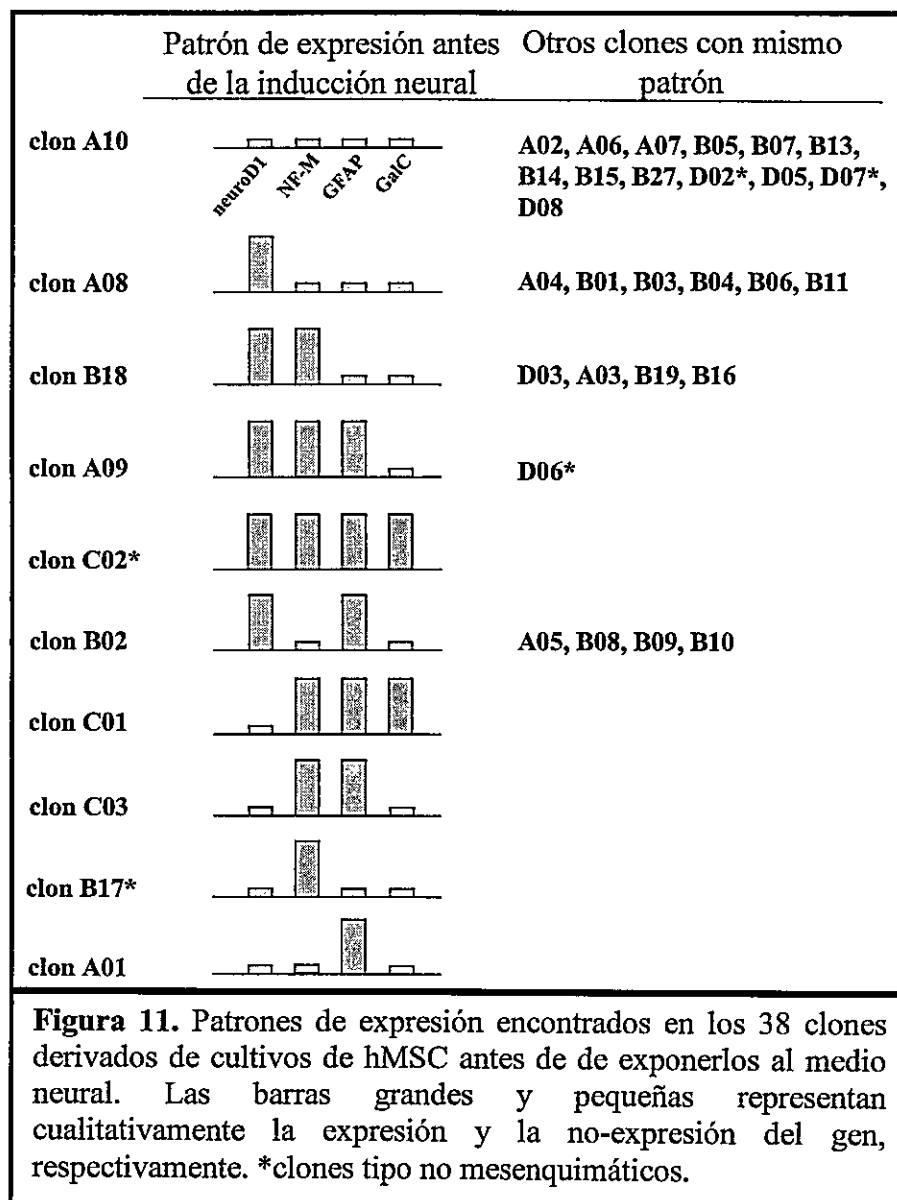


### 5.1 Patrón de expresión génica de los clones antes de exposición al medio-NSC

Con el objetivo de evaluar el fenómeno de plasticidad y la posible contaminación con células neurales se analizó mediante RT-PCR de tiempo real el patrón de expresión génica de cada clon antes (día 0) y después (día 8) de exponerlos al medio-NSC.

Aunque la mayoría de los clones (33/38) tienen potencial mesenquimático (Fig. 9), sorpresivamente ningún clon expresaba el gen ASMA. Este resultado nos sugiere que la ausencia de expresión del gen ASMA no siempre es indicativo de ausencia de potencial mesenquimático. Es decir, un resultado positivo en el ensayo de diferenciación adipogénico y/ó osteogénico es demostrativo por sí mismo del potencial mesenquimático de los clones y un resultado negativo en la detección del mRNA de ASMA no excluye la posibilidad de que los clones derivados de cultivos de hMSC tengan fenotipo mesenquimático.

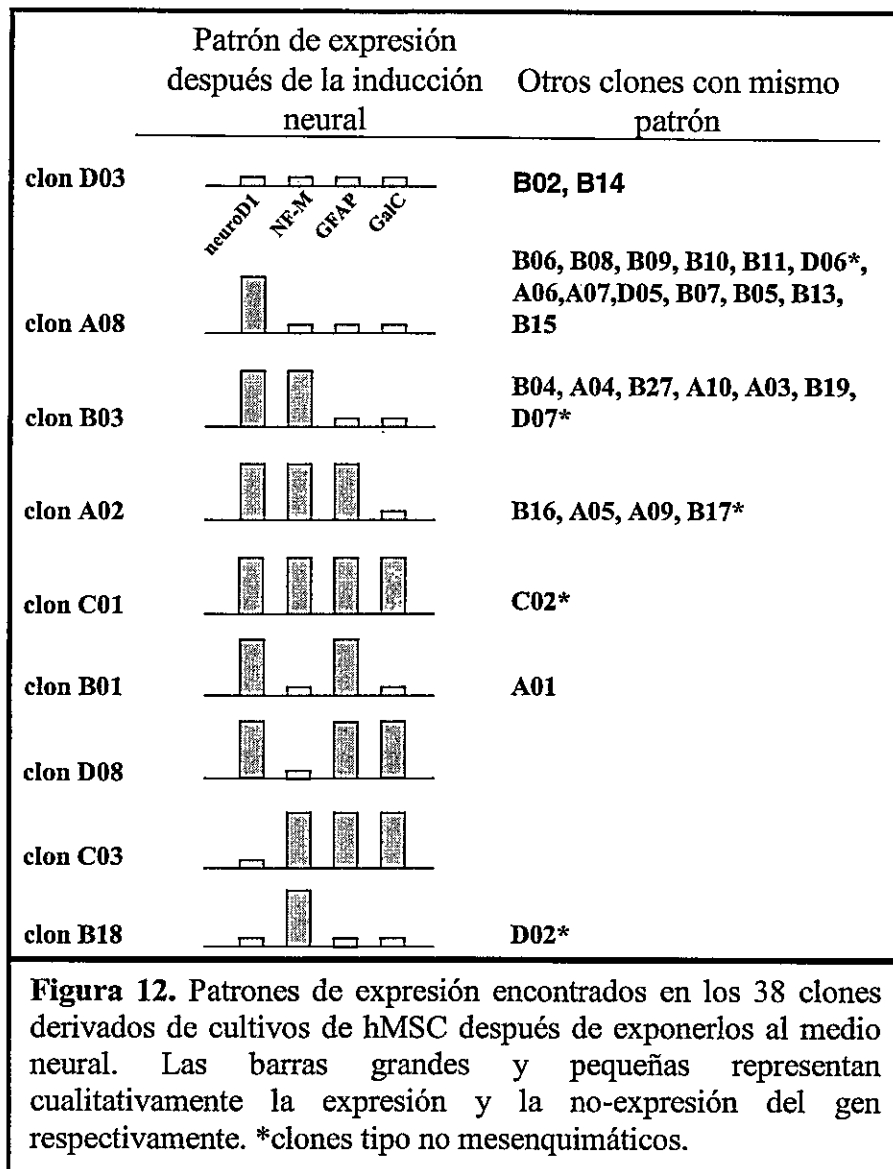
Con respecto a los marcadores neurales, no se detectó expresión del gen nestina en ninguno de los clones analizados. Por esta razón para analizar fenotipos neurales tempranos, las conclusiones se basaron en la expresión exclusiva del factor de transcripción neuroD1, al igual que sucede en células indiferenciadas del sistema nervioso (Cho y Tsai, 2004). En la Figura 11 se muestran los distintos patrones de expresión génica de los clones al día 0.





## **5.2 Patrón de expresión génica de los clones después de la exposición al medio neural**

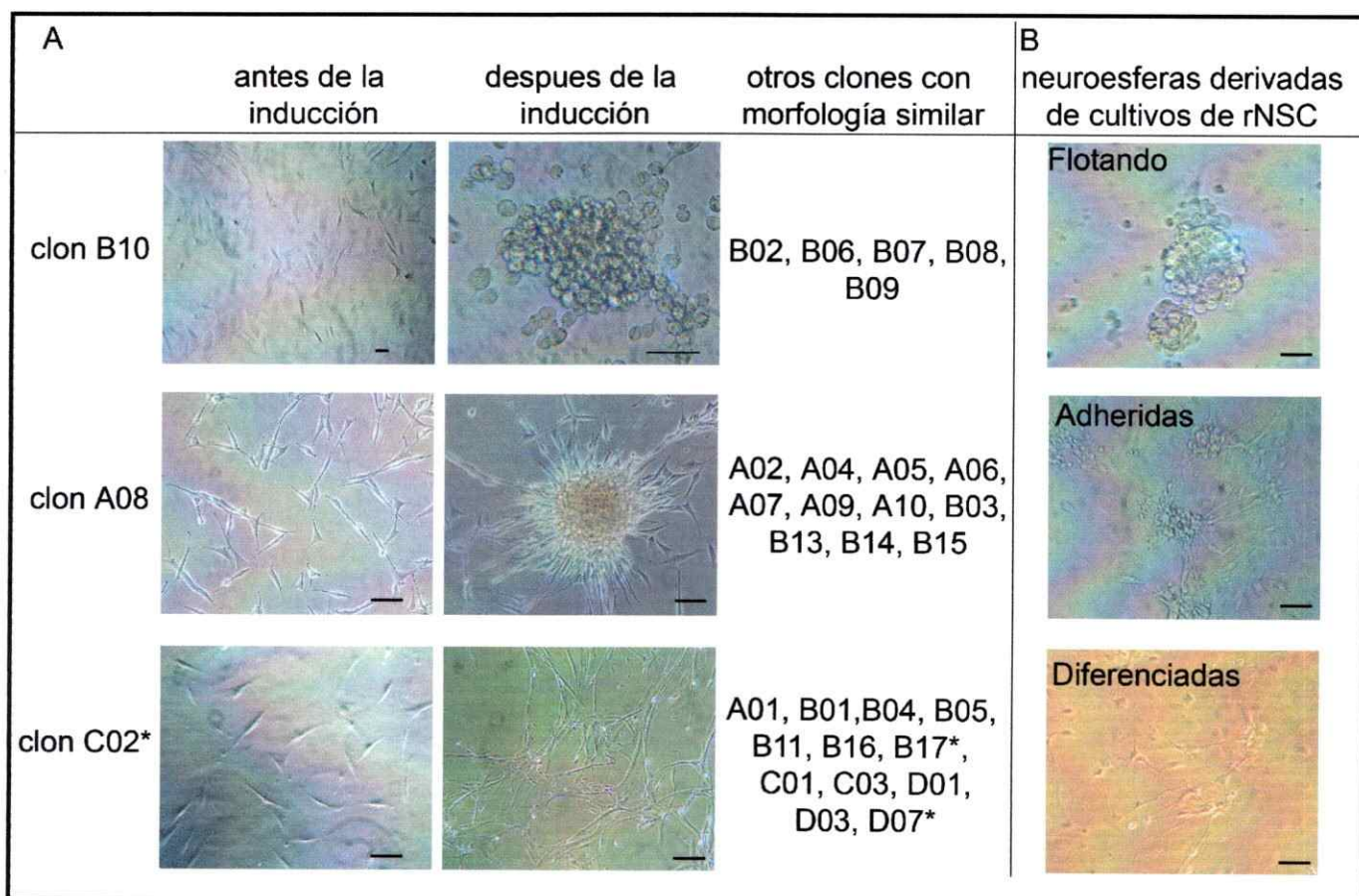
El patrón de expresión génica de los clones también se analizó a los 8 días post-exposición (Fig. 12). Se observó un efecto inductor hacia el linaje neural en los clones que no expresaban ninguno de los genes neurales antes de exponerlos al medio-NSC (ver límites de detección de cada gen en Tabla 4), dado por la expresión de al menos el factor de transcripción neuroD1. También se observó la aparición de un nuevo patrón de expresión (clones D01 y D08) dado por la expresión de los dos genes gliales GFAP y GalC (fenotipo de progenitor glial; Fig. 10).



### 5.3 Cambios morfológicos observados durante la exposición al medio neural

Durante el periodo de exposición al medio neural (medio-NSC) se apreciaron cambios morfológicos en la mayoría de los clones. En algunos clones las células formaron agrupaciones similares a las estructuras celulares llamadas neuroesferas, que se forman en los cultivos primarios de NSC obtenidas del sistema nervioso (Panchision y McKay, 2002; Bottai y col, 2003; Suzukia y col, 2004), perdiendo adherencia al

plástico (clones B10 y A08; Fig. 13A). En otros clones las células se alargaron, pareciéndose a las proyecciones citoplasmáticas de neuronas obtenidas a partir de cultivos de rNSC después de inducirlos a diferenciación (clon C02; Fig. 13A).



**Figura 13.** Morfología tipo neural observada en algunos clones derivados de cultivos de hMSC. **(A)** Las células se fotografiaron antes y después de ser expuestas al medio-NSC durante 8 días. **(B)** Células troncales neurales (rNSC) aisladas del bulbo olfatorio de ratas neonatas en distintas etapas de diferenciación: neuroesferas flotando y adheridas a la placa previamente tratada con polilisina **(A)** (estado indiferenciado y pre-diferenciado, respectivamente) así como neuroesferas disgregadas y diferenciadas derivadas de rNSC. Las barras representan 100  $\mu\text{m}$ .

En conjunto, teniendo en cuenta los cambios en el patrón de expresión génica y los cambios en la morfología celular de los clones generados a partir de cultivos de hMSC, agrupamos los clones en los siguientes fenotipos neurales: no-neural, neural indiferenciado, neuronal, neuro-glial, glial y pseudo-neural (Fig. 9 y texto asociado).

Así, resumiendo nuestros resultados obtenidos en el ensayo de diferenciación adipogénica y osteogénica, así como la detección del mRNA de genes neurales mediante RT-PCR, agrupamos en la siguiente tabla los clones en función de su potencial mesenquimático y fenotipo neural (Tabla 7). Concluyendo, El 86% de los clones poseen potencial mesenquimático y además poseen fenotipo neural por lo que podemos decir que tienen plasticidad neural, mientras que el 13% de los clones no poseen potencial mesenquimático, pero expresan marcadores neurales por lo que pudieran ser contaminación con progenitores de origen neural (“contaminación” con otras células troncales adultas)

Fenotipo	MSC (26%)	AdP (55%)	OsP (5%)	no-mesenquimático (13%)
no-neural (37%)	A10, A06, D05	B27, A02, D08, B14, A07, B05, B13, B15	B07	D02, D07
neural indiferenciado (18%)	A08	B03, B04, A04, B01, B06, B11	–	–
neuronal (13%)	B18, D03	A03, B19, B16	–	–
neuro-glial (8%)	A09	–	–	C02, D06
glial (13%)	A05, B08	B02, B09	B10	–
pseudo-neural (11%)	A01	C01, C03	–	B17

**Tabla 7.** Clones derivados de cultivos de hMSC con potencial de diferenciación mesenquimático y/o neural. El potencial mesenquimático fue determinado a partir de la presencia o no de adipocitos y/u osteocitos, en las condiciones de diferenciación apropiadas (ver materiales y métodos). El fenotipo neural se determinó según el cambio en el patrón de expresión génica durante la exposición al medio neural (medio-NSC) por 8 días.

## DISCUSIÓN

### **Heterogeneidad de los cultivos de hMSC**

Los cultivos utilizados en nuestro estudio se seleccionaron en función de la propiedad de las hMSC derivadas de médula ósea de adherirse a plástico. En términos de morfología, potencial proliferativo y potenciales de diferenciación no había diferencias entre las distintas muestras de médula ósea. Las células de nuestros cultivos de hMSC pudieron ser subcultivadas hasta 6-8 veces sin mostrar ningún signo morfológico de senescencia (datos no mostrados), así como diferenciarse, en medios de diferenciación específicos, a adipocitos, osteocitos y condrocitos (Fig. 6). Clásicamente las hMSC se han caracterizado por su adherencia al plástico, su morfología fibroblastoide y su capacidad de proliferar estimulada por SFB (Minguell y col, 2001; Horwitz y col, 2005; Dominici y col, 2006). Además estas células poseen un tiempo de duplicación poblacional de aproximadamente 33 h (Minguell y col, 2001). Por tanto, de acuerdo a nuestros resultados, los cultivos celulares aquí utilizados tienen las propiedades características de hMSC.

Sin embargo, nuestros resultados de RT-PCR muestran que los cultivos de hMSC expresan varios marcadores neurales tempranos y tardíos en condiciones normales de expansión (medio-MS) sin necesidad de exponerlas a estímulos inductores neurales (Tabla 5). Aunque esto ya se había reportado recientemente en otros estudios (Deng y col, 2000; Blondheim y col, 2006), la expresión espontánea de proteínas neurales específicas en MSC dejan ciertas dudas sobre los protocolos reportados previamente. En algunos estudios se asegura inducir una diferenciación neural en MSC al exponerlas a

medio inductor neural, pero no estudian la expresión de las proteínas neurales antes de la inducción (Deng y col, 2006). La expresión permanente de los marcadores neurales (nestina, NF-M, GFAP y GalC) en nuestros cultivos antes de cualquier protocolo de inducción podría ser debido a que (1) Existen hMSC que están en un estado más pluripotente, expresando estos genes neurales y quizás otros genes de los diversos fenotipos hacia los que tienen potencial de diferenciar; (2) hay presencia en los cultivos de hMSC de células de origen neural que están contaminando los cultivos. Por esto era importante demostrar la plasticidad neural de hMSC *in vitro* realizando un estudio clonal donde se analizara la expresión de genes neurales antes y después de someter los clones a condiciones de inducción neural.

Dada la existencia de clones mesenquimáticos derivados de cultivos de hMSC que expresan genes neurales antes de cualquier inducción, podemos decir que posiblemente sean células “pluripotentes”, es decir, células presentes en los cultivos de hMSC con un potencial neural intrínseco. La presencia de células pluripotentes no embrionarias en medula ósea ha sido descrita anteriormente por Jiang y colaboradores; son llamadas células progenitoras multipotentes adultas (MAPC) y tienen capacidad o potencial de generar *in vivo* células del mesodermo, ectodermo y endodermo, al ser inyectadas en el blastocisto temprano (Jiang y col, 2002). Además, como se ha publicado recientemente, células pluripotentes pueden estar expresando a la vez varios genes de distintos linajes (Eckfeldt y col, 2005).

La 2ª hipótesis que postula el que los cultivos de hMSC no son cultivos mesenquimáticos “puros”, sino que existen en ellos progenitores no mesenquimáticos no es una hipótesis nueva (Ratajczak y col, 2004). Ratajczak y colaboradores han sugerido

que la médula ósea es un reservorio de células troncales de diversos tejidos. Sin embargo nuestros resultados clonales son los primeros que demuestran la existencia de células no mesenquimáticas en los cultivos de hMSC. Adicionalmente, la evidencia de que algunos de estos clones expresan genes neurales sugiere una contaminación de los cultivos con células neurales.

#### **Enriquecimiento de los cultivos de hMSC con células con fenotipo neural.**

La adquisición de un compromiso neural exclusivo en los cultivos de hMSC se evaluó principalmente por la no detección de la expresión del gen mesenquimático ASMA (ver límites de detección en Tabla 4). Sin embargo, tal como vimos después, la no detección de expresión del gen ASMA no es indicativo de ausencia de potencial mesenquimático, dado que existen clones que no expresan ASMA y sí diferencian a adipocitos y/u osteocitos.

La condición de inducción neural que nosotros consideramos mejor fue aquella en la cual observamos la no detección del gen mesenquimático ASMA y del gen neural temprano nestina. Esto se consiguió cuando hMSC son expuestas durante 8 días a medio-NSC y MC-rNSC (Tabla 5). En estas condiciones interpretamos que los cultivos de hMSC se enriquecen en células maduras del linaje neural. Sin embargo, elegimos utilizar el medio-NSC para los estudios clonales debido a que este medio definido es más reproducible que el medio condicionado por rNSC (MC-rNSC) que depende tanto de factores solubles, no conocidos, liberados por rNSC como del procedimiento de aislamiento y expansión de las células que los liberan. Las células derivadas de los cultivos de hMSC proliferan ligeramente en el medio-NSC que contiene EGF y bFGF

aunque mucho más lenta que en los medios con suero (medio-MSD o medio-MSD+GF). En este sentido se ha descrito que los factores de crecimiento utilizados en el medio-NSC inducen la proliferación *in vitro* de células neurales aisladas del sistema nervioso (Bottai y col. 2003). Además, la composición del medio-NSC es similar al que se utiliza para crecer cultivos de NSC humanas (Martínez-Serrano y col, 2001). En este sentido, el medio-NSC induce en las células derivadas de los clones derivados de los cultivos de hMSC a que se agrupen o adopten una morfología bastante más alargada de lo normal, pareciéndose a células neurales indiferenciadas y maduras, respectivamente (Fig. 7). Por todas las evidencias anteriores, concluimos que los cultivos de hMSC se pueden enriquecer con células neurales al exponerlos al medio NSC durante 8 días.

### **Heterogeneidad en el potencial mesenquimático de clones derivados de cultivos de hMSC**

En la presente tesis, 38 clones fueron obtenidos a partir de un total de 74 células individuales (Tabla 6). Los clones fueron expandidos durante 35-45 días (aproximadamente 18 duplicaciones poblacionales) hasta lograr tener un número de células adecuado para realizar nuestros experimentos. Algunas células individuales, aunque sobrevivían varios días en cultivo, no proliferaban. Esto podría ser debido a que permanecieron en un estado quiescente o  $G_0$ , mientras que aquellas que proliferaron podrían corresponder a los progenitores mesenquimáticos que realmente dan cuenta de las propiedades y características de un cultivo de hMSC (Conget y Minguell, 1999; Minguell y col, 2001).



Las características de los clones no cambiaron durante la expansión, proliferaron en medio con 10% SFB (medio-MS), se mantuvieron adheridas al plástico y mantuvieron la morfología típica fibroblastoide típicas de MSC. Sin embargo es necesario demostrar su potencial mesenquimático hacia al menos 3 fenotipos: adipogénico, osteogénico y condrogénico (Dominici y col, 2006). Según lo reportado por Muraglia y colaboradores, el fenotipo osteogénico en clones de hMSC siempre va ligado al fenotipo condrogénico (Muraglia y col, 2000). Por esto, en nuestro estudio clonal solo estudiamos la diferenciación adipogénica y osteogénica y no la condrogénica (que además requería de una mayor cantidad de células).

Así, el 26% de los clones que diferenciaron hacia adipocitos y osteocitos, los clasificamos como clones tripotentes tipo MSC (Tabla 7). Sin embargo, la mayoría de nuestros clones son precursores adipogénicos (AdP), debido a que sólo se diferenciaron a adipocitos. Este resultado difiere del obtenido por Muraglia y colaboradores, donde no reportaron ningún clon con estas características (Muraglia y col. 2000). Ahora bien, la explicación puede estar en que el medio de inducción adipogénico que ellos utilizaron no contiene IBMX, un componente muy importante que la mayoría de los autores sí utilizan para diferenciar cultivos de MSC a adipocitos (Conget y Minguell, 1999; Pittenger y col, 1999; Halleux y col, 2001). El IBMX estimula la producción de cAMP, lo cual se traduce finalmente a nivel celular en favorecer la acumulación de lípidos y formación de gotas de grasa citoplasmáticas. Por tanto, Muraglia y colaboradores podrían haber subestimado la presencia de AdP en sus cultivos a causa de no utilizar IBMX en su medio de inducción adipogénico. El 5% de los clones se diferenciaron hacia osteocitos, y los llamamos precursores osteogénicos (OsP), aunque también podrían

haberse llamado progenitores Osteo-Condrogénicos, según se discutió anteriormente sobre las evidencias de correlación que existe entre los fenotipos condrogénico y osteogénico en clones derivados de cultivos de hMSC.

Finalmente un 12% de los clones (5 clones) no se diferenciaron hacia ninguno de los fenotipos del linaje mesenquimático analizados, por lo que fueron clasificados como progenitores no-mesenquimáticos. Este resultado está a favor de la hipótesis alternativa que manejamos en este trabajo, demostrando que el fenotipo neural de los cultivos de hMSC podría estar dado por la presencia de células de origen neural (no-mesenquimáticas). No consideramos que la expansión clonal que realizamos antes del ensayo de diferenciación provocara una pérdida de potencial mesenquimático, pues se ha reportado que esto ocurre en subcultivos mayores al número 10 y por encima de las 18 duplicaciones poblacionales que aproximadamente se dividen nuestros clones derivados de los cultivos de hMSC (Muraglia y col, 2000; Halleux y col, 2001).

### **Fenotipos neurales encontrados en clones derivados de cultivos de hMSC**

Para la fenotipificación neural usamos marcadores moleculares que son expresados durante la neurogénesis (neuroD1, NF-M, GFAP y GalC). Se ha demostrado que el factor de transcripción neuroD1 es necesario y suficiente para iniciar el desarrollo de linajes neurales (Cho y Tsai, 2004). En este sentido, neuroD1 ha sido utilizado en otros trabajos para indicar el compromiso neural de las hMSC (Hermann y col, 2004). Debido a esto, clones que expresan genes neurales, pero en los cuales no se detectó expresión del gen neuroD1 (ver límites de detección en Tabla 4) fueron llamados clones pseudo-neurales (Tabla 7).

En el cerebro adulto, neuroD1 promueve la generación de progenitores localizados en regiones del cerebro donde hay NSC inmaduras y multipotentes (Cho y Tsai, 2004). Por otro lado, la mayoría de los cultivos de NSC humanos crecen en suspensión formando agregados llamados neuroesferas (Martinez-Serrano y col, 2001). Algunos de nuestros clones positivos para neuroD1 formaron estructuras similares a las neuroesferas de los cultivos de NSC (Fig. 13). Esta propiedad fue directamente relacionada a la expresión exclusiva del factor de transcripción neuroD1. Sin embargo, este cambio morfológico ocurrió después de la exposición al medio-NSC, indicando que las condiciones de cultivo aumentaron la capacidad de células neuroD1-positivas para formar este tipo de estructuras (Fig. 13). También observamos en algunos clones cierto crecimiento de estas agrupaciones tipo neuroesferas en el medio-NSC (clones B02, B07 y B08, datos no mostrados), e indujo a otros a expresar genes neuronales (clones B03, B04 y A04) y gliales (clon B01; Fig. 11 y 12).

La formación de estructuras tipo neuroesferas y la capacidad de algunos clones neuroD1-positivos para proliferar o diferenciar hacia fenotipos neuronales y gliales después de la exposición al medio-NSC es indicativo de un fenotipo de NSC. Sin embargo, para clasificar definitivamente estos clones como NSC sería necesario demostrar su potencial de diferenciación *in vivo* para generar los tres linajes neurales: neuronal, astrocítico y oligodendrocítico. Aunque nestina se expresó en nuestros cultivos de hMSC, en ninguno de los clones analizados se detectó la expresión de este marcador clásico de NSC. Esto podría explicarse por una baja sensibilidad o límite de detección del gen nestina con los partidores y técnica utilizada (RT-PCR), que no permite detectar los niveles de expresión del gen nestina que posiblemente existan en los clones (Tabla

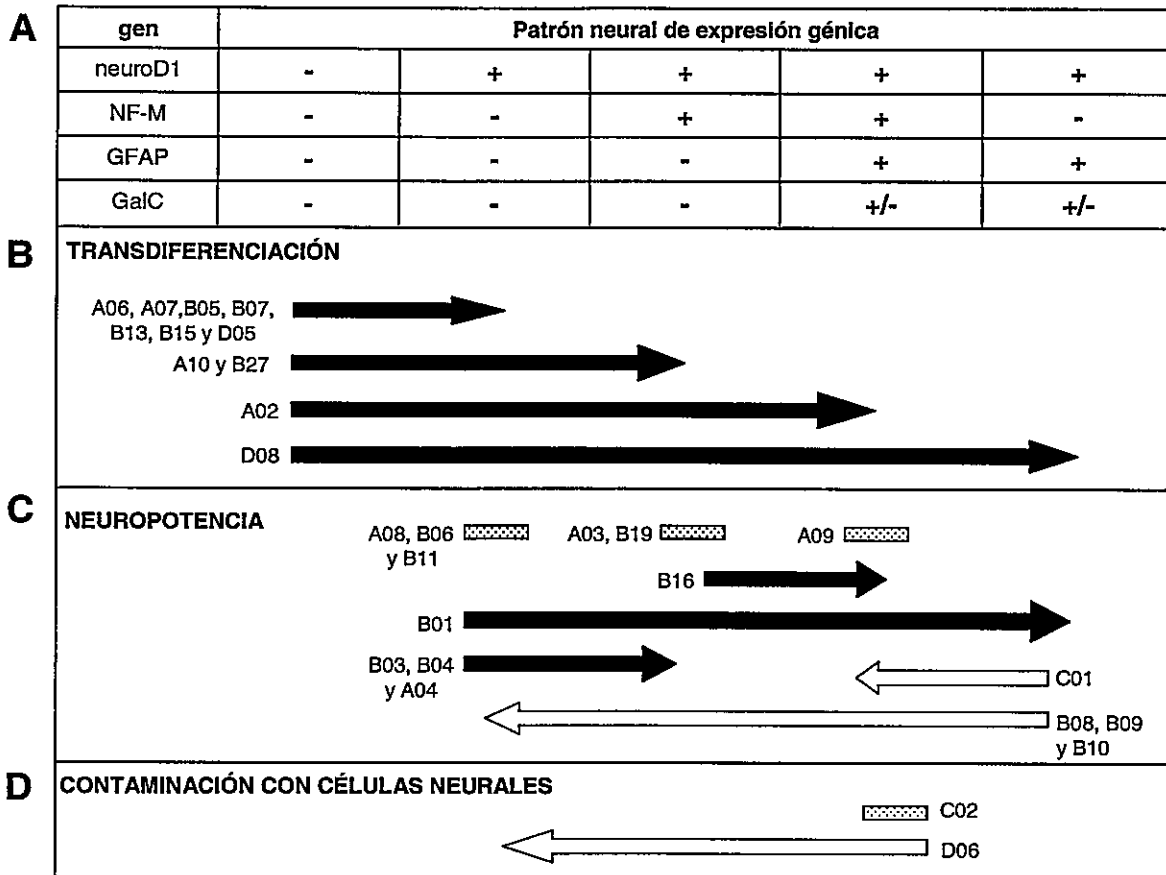
4). De cualquier forma, nuestros resultados con MSC humanas están en contraposición con un estudio en MSC murinas donde describieron que un alto número de duplicaciones poblacionales junto con la ausencia de suero en el medio está relacionado con un aumento en la expresión de nestina (Wislet-Gendebien y col, 2005). En nuestro diseño experimental, todos los clones derivados de cultivos de hMSC fueron expandidos aproximadamente 18 veces antes de ser expuestos a un medio libre de suero (medio-NSC), pero en ninguno de ellos se detectó la expresión de nestina (datos no mostrados). Debido a estas diferencias, sugerimos que nestina no es el mejor marcador para identificar un fenotipo de NSC en células que provienen de cultivos de hMSC.

Para definir el fenotipo neuronal en los clones derivados de hMSC nos basamos en que las neuronas co-expresan NF-M y neuroD1 a niveles estables en el sistema nervioso central y periférico (Lee y col, 2000). Por otro lado, utilizamos GFAP y GalC como marcadores de un fenotipo astrocítico y oligodendrocítico, respectivamente. Aunque GFAP ha sido utilizado como marcador de glía en algunos estudios de plasticidad neural, no así GalC (Sanchez-Ramos y col, 2000; Wislet-Gendebien y col, 2005). En nuestros clones GalC se expresaba siempre junto con el gen GFAP (Fig. 11 y 12), no obteniendo ningún clon donde se detectara expresión exclusivamente del marcador de oligodendrocitos. Así, el fenotipo glial lo definimos basándonos en la expresión de GalC y/o GFAP, y el fenotipo neuro-glial basados en la co-expresión del marcador neuronal NF-M junto con los marcadores gliales GFAP y GalC (Fig. 10 y Tabla 7).

## **Plasticidad celular de hMSC y contaminación con células neurales: evidencias clonales**

Los clones con potencial de diferenciación mesenquimático (33/38; Tabla 7) fueron fenotipificados molecularmente en función de su patrón neural de expresión génica antes y después de ser expuestos al medio-NSC (Fig 11-12).

Según la aparición de marcadores moleculares durante el desarrollo del sistema nervioso (Panchision y McKay, 2008; Cho y Tsai, 2004) asociamos cada patrón de expresión en los clones a un estado celular específico: estado troncal, comprometido y diferenciado. Para esto definimos una escala de compromiso neural basada en los patrones de expresión encontrados en los clones derivados de los cultivos de hMSC (Fig. 14A), teniendo en cuenta que la expresión de neuroD1 es siempre necesaria para iniciar la vía de diferenciación neural (Cho y Tsai, 2004).



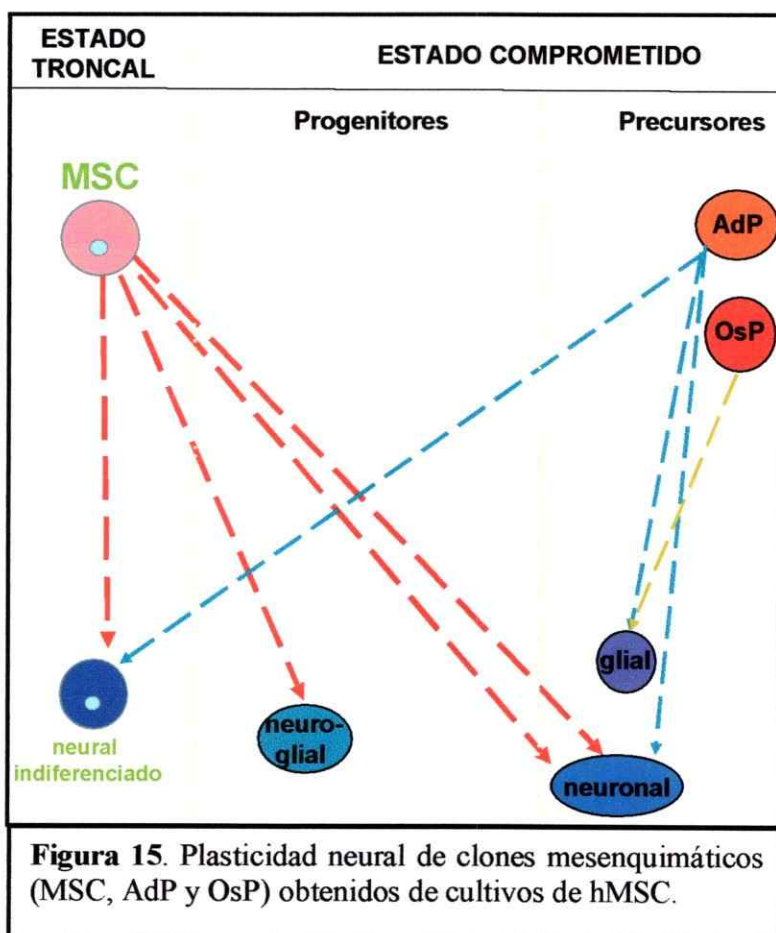
**Figura 14.** Efectos del medio de inducción neural (medio-NSC) sobre la expresión génica de clones derivados de cultivos de hMSC. **(A)** Patrones de expresión neural que se encontraron en los clones antes y después de la inducción neural. **(B-D)** Mecanismos que explican los fenotipos neurales observados en algunos de los clones mesenquimáticos **(B y C)** clones no mesenquimáticos “contaminantes” **(D)**. Las flechas representan las rutas teóricas de diferenciación o dediferenciación para cada clon en función del patrón neural al día 0 y al día 8. El inicio y final de cada flecha están relacionados con los patrones de expresión génica antes y después de la inducción neural respectivamente. Los rectángulos indican que no hay efecto del medio (no diferenciado), las flechas en dirección izquierda-derecha indican diferenciación y las flechas en dirección derecha-izquierda indican dediferenciación.

Dado que en el 33,3% de los clones con potencial mesenquimático (11 de 33) se indujo la expresión del factor de transcripción neuroD1 al cultivarlos durante 8 días en medio-NSC (Fig. 14B), esto fue interpretado como una adquisición de compromiso hacia el linaje neural (Cho y Tsai, 2004). Por lo tanto, nuestros datos moleculares indican la activación de una vía de diferenciación inicialmente inactiva y en

consecuencia demuestran la capacidad de plasticidad neural de esos clones mediante un mecanismo de transdiferenciación (Wagers y Weissman, 2004).

Sin embargo, la mayoría de los clones con potencial de diferenciación mesenquimático (54,5%) ya mostraban un fenotipo neural antes de exponerlos al medio-NSC (18 de 33; Tabla 7). Se ha postulado que la propiedad de pluripotencia en células troncales embrionarias y adultas es debida a la alta accesibilidad de la cromatina, que permite a estas expresar genes de otros linajes (Eckfeldt y col. 2005). Dado que en 15 de los 18 clones a los que nos referimos anteriormente mantenían algún fenotipo neural después de exponerlos a nuestras condiciones de inducción neural, decimos que estos clones tienen plasticidad neural y los definimos como clones mesenquimáticos “neuropotentes” (Fig. 14C) para indicar una propiedad de pluripotencia intrínseca, no adquirida, de algunas células presentes en los cultivos de hMSC. Los 3 clones restantes dejaron de expresar todos los marcadores neurales en las mismas condiciones, por lo tanto, podemos decir que desdiferenciaron completamente perdiendo la capacidad de diferenciación al linaje neural.

Según los resultados clonales (Tabla 7) proponemos un modelo empírico que relaciona el potencial mesenquimático de los clones que presentaron plasticidad neural (mediante el mecanismo de transdiferenciación o neuropotencia, Fig. 14B-C) con el potencial para generar algunos de los fenotipos neurales (Fig. 15). Así, nos dimos cuenta que algunos clones con un potencial mesenquimático determinado (OsP) están directamente relacionados con fenotipo neural específico (glial), mientras que otros clones (clasificados como MSC) pueden generar casi todos los fenotipos neurales conocidos.



Por otro lado, obtuvimos también clones que no se diferenciaron a ninguno de los linajes mesenquimáticos analizados (adipogénico y osteogénico), sin embargo su expansión en cultivo no fue diferente a los demás clones. Esta evidencia las interpretamos como una prueba a favor de la existencia de progenitores no mesenquimáticos en los cultivos de hMSC; y dado que algunos de ellos expresaban marcadores neurales (Tabla 7), fueron clasificados como progenitores neurales “contaminantes”.

Para definir un clon como potencial progenitor neural “contaminante” utilizamos 2 criterios: 1) ausencia de diferenciación demostrada a los fenotipos mesenquimáticos adipo- y osteogénico, y dado que el fenotipo condrogénico está ligado al osteogénico en



clones derivados de cultivos de hMSC (Muraglia y col, 2000) disminuimos la posibilidad de que estos clones (no adipogénicos ni osteogénicos) tuvieran potencial condrogénico, y 2) expresión de al menos el gen neuroD1 para indicar pertenencia al linaje neural (Cho y Tsai, 2004). En resumen, 5 clones (del total de clones obtenidos a partir de los cultivos de hMSC) no tenían potencial mesenquimático (Tabla 7), y de estos, sólo 2 los consideramos del linaje neural dado que poseían un fenotipo neural antes y después de la exposición al medio-NSC (Fig. 14D). Por lo tanto, estos 2 clones (C02 y D06, Fig. 14D) serían potencialmente progenitores neurales que están presentes en los cultivos de hMSC derivados de médula ósea. Los perfiles de estos 2 clones están a favor de la hipótesis que cree que en la médula ósea co-existen varios tipos de ASC de otros tejidos (Ratajczak y col, 2004). Así, es posible que desde las primeras etapas del desarrollo se hayan mantenido en la médula ósea con el fin de que en el individuo adulto exista un reservorio de células troncales tejido específicas capaces de responder a pequeños daños en los tejidos, pudiendo migrar y regenerar las células del tejido dañado.

Por ultimo, viendo el efecto tan diverso de nuestras condiciones de inducción neural en los clones, tanto mesenquimáticos como no mesenquimáticos, podemos inferir que cada clon tiene una propiedad intrínseca para responder al mismo estímulo externo (medio-NSC durante 8 días), que no depende de que tengan el mismo potencial mesenquimático o similar fenotipo neural (Fig. 14B-D).

Cabe señalar que 10 clones (26,3%) no pudieron clasificarse con ninguno de los fenotipos neurales representados en la figura 10, bien porque nunca expresaron los genes neurales que nosotros analizamos (incluso después de exponerlos al medio-NSC), o bien

porque no se detectó en estos el gen marcador de linaje neural neuroD1, condición impuesta como necesaria para la obtención de un auténtico fenotipo neural.

En resumen, nuestros resultados clonales sugieren que el fenotipo neural de los cultivos de hMSC antes o después de someterlos a la inducción neural, es debido tanto a un fenómeno de plasticidad celular (68,4%), debido al mecanismo de transdiferenciación (28,9%) y a la propiedad de neuropotencia (39,5%), como al efecto de una contaminación de los cultivos con células de origen neural (5,3%). Además pudimos inducir con nuestro medio-NSC un fenotipo neural en el 91,7% de los clones con potencial mesenquimático que no expresaban genes neurales antes de someterlos a nuestras condiciones de inducción neural.

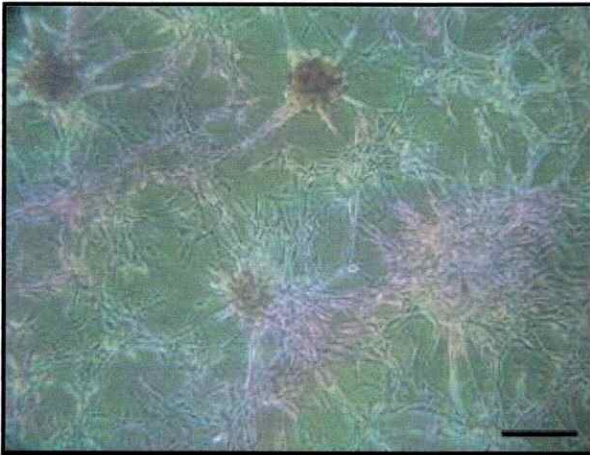
## CONCLUSIONES

1. Cultivando hMSC en un medio sin suero (SFB) y suplementado con factores de crecimiento EGF y bFGF (medio-NSC) durante 8 días, podemos enriquecer los cultivos de hMSC en células con fenotipo neural.
2. La inducción de un fenotipo neural en clones con potencial mesenquimático, cuando son expuestos al medio-NSC durante 8 días, es una señal de plasticidad celular de células derivadas de cultivos de hMSC mediada por el mecanismo de transdiferenciación.
3. El fenotipo neural observado en los cultivos de hMSC, en condiciones normales de expansión, se debe tanto a la presencia de células mesenquimáticas “neuropotentes”, como a la presencia de progenitores neurales “contaminantes”.

## PROYECCIONES

En este trabajo se demostró a nivel clonal el fenómeno de plasticidad celular hacia el linaje neural en hMSC, sugiriéndose a través de nuestros resultados que estas células tendrían potencial para diferenciarse a neuronas y células de la glía. Estas células podrían ser utilizadas *in vivo* en experimentos de trasplante en el cerebro de animales modelo de enfermedades neurodegenerativas. Así por ejemplo, en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson, ayudado por las señales de daño neuronal, las células derivadas de los cultivos de hMSC (previamente comprometidas al linaje neural utilizando nuestro medio neural, medio-NSC) podrían reemplazar las neuronas dopaminérgicas que están degenerando.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



**Figura 1.** Células hU87. Las células son cultivadas a  $7 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio-  
MSC. Barra 200  $\mu$ m

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez-Dolado M., Parda R., Garcia-Verdugo J., Fike J., Lee H., Pfeffer K., Lois C., Morrison S. y Alvarez A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-973
2. Bertani N., Malatestá P., Volpi G., Sonego P. y Perris R. (2005). Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, timelapse video and microarray. *Journal of Cell Science* 118:3925-3936
3. Bjornson C., Rietze R., Reynolds M., Magli C. y Vescovi A. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283:534-537
4. Blondheim N., Levy Y., Ben-Zur T., Burshtein A., Cherlow T., Kan I., Barzilai R., Bahat-Stromza M., Barhum Y., Bulvik S., Melamed E., Offen D. (2006). Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells and development* 15:141-164
5. Bossolasco P., Cova L., Calzarossa C., Rimoldi S., Borsotti C., Lambertenghi G., Silani V., Soligo D. y Polli E. (2005). Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Experimental Neurology* 193:312-32.
6. Bottai D., Fiocco R., Gelain F., Defilippis L., Galli R., Gritti A. y Vescovi A. (2003). Neural Stem Cells in the Adult Nervous System. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research* 12:655-670
7. Brazelton T., Fabio M., Rossi V., Gilmor I., Blau H. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779
8. Cho J. y Tsai M. (2004). The Role of BETA2/NeuroD1 in the Development of the Nervous System. *Molecular Neurobiology* 30(1):35-47
9. Conget PA. y Minguell J. (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cell Physiology*. 181:67-73
10. Dahlstrand J., Zimmerman L., McKay R. y Lendahl U. (1992). Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *Journal of Cell Science* 103:589-597
11. Deng J., Petersen B., Steindler D., Jorgensen M. y Laywell E. (2006). Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture, and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 24(4):1054-64

12. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8:315-317.
13. Eckfeldt C., Mendenhall E. y Verfaillie C. (2005). The molecular repertoire of the "almighty" stem cell. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6:726-737
14. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C., Buzney E., Khan M., Flint A., Kunkel L., Mulligan R. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 401:390-394
15. Halleux C., Sottile V., Gasser J. A. y Seuwen K. (2001). Multi-lineage potential of human mesenchymal stem cells following clonal expansion. *Journal of Musculoskeletal and Neuron Interactions* 2(1):71-76
16. Hermann A., Gastl R., Liebau S., Popa P., Fiedler J., Boehm B., Maisel M., Lerche H., Schwarz J., Brenner R. y Storch A. (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *Journal of Cell Science* 117:4411-4422
17. Horwitz E., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I, Marini F., Deans R., Krause D., Keating A. (2005). The International society for cellular therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement *Cytotherapy* 7:393-395.
18. Jiang Y. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49
19. Li T., Shu C., Wong C., Lo P., Zhu H., Lau M., Chan M., Tsang L., Gou Y., Chung Y. y Chan H. (2004). Plasticity of rat bone marrow-derived 5-hydroxytryptamine-sensitive neurons: dedifferentiation and redifferentiation. *Cell Biology International* 28:801-807
20. Liu Z. y Martin L. (2003). Olfactory bulb core is a Rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *Journal of comparative neurology*. 459:368-391.
21. Martínez-Serrano A., Rubio FJ., Navarro B., Bueno C. y Villa A. (2001). Human neural stem and progenitor cells: *in vitro* and *in vivo* properties and potential for gene therapy and cell replacement in the CNS. *Current Gene Therapy* 1:279-299

22. Millington-Ward S., Allers C., Tuohy G., Conget P., Allen D., McMahon E., Kennal P., Humphries P. y Farrar G. (2002). Validation in mesenchymal progenitor cells of a mutation-independent ex vivo approach to gene therapy for osteogenesis imperfecta. *Human Molecular Genetics* 11:2201–2206
23. Minguell J., Erices A. y Conget PA. (2001). Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine* 226(6):507-520
24. Muraglia A., Cancedda R. y Quarto R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science* 113:1161-1166
25. Nagai A. Suzuki Y., Sun Y. Kwang S. Min L., Lee C., McLarnon J. y Kim S. (2002). Generation and characterization of human hybrid neurons produced between embryonic CNS neurons and neuroblastoma cells. *Neurobiology of Disease* 11:184–198
26. Paquette R. y Dorshkind K. (2002). Optimizing hematopoietic recovery following bone marrow transplantation. *Journal of Clinic Investigation* 109(12):1527-1528
27. Panchision D., y McKay R. (2002). The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Current Opinion in Genetics and Development* 12:478-487
28. Petersen B., Bowen W., Patrene K., Mars W., Sullivan A., Murase N., Boggs S., Greenberger J., Goff J. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-70
29. Pittenger M., Mackay A., Beck S., Jaiswal R., Douglas R., Mosca J., Moorman M., Simonetti D., Craig S. y Marshak D. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147
30. Quesenberry P., Dooner G., Colvin G. y Abed M. (2005). Stem cell biology and the plasticity polemic *Experimental Hematology* 33:389–394
31. Ratajczak M., Kucia M., Majka M., Reza R. y Ratajczak J (2004). Heterogeneous populations of bone marrow stem cells: are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochemica et Cytobiologica* 42:139-146
32. Rubio FJ., Bueno C., Villa A., Navarro B., y Martínez-Serrano A. (2000). Genetically perpetuated human neural stem cells engraft and differentiate into the adult mammalian brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 16:1–13



33. Sanchez-Ramos J., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D., y Sanberg P. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Experimental Neurology* 164:247–256
34. Sekiya I., Vuoristo J., Larson B. y Prockop D. (2002). In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(7):4397-4402
35. Song L. y Tuan R. (2004). Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *The FASEB Journal* 10:1096-1100
36. Steinert M. y Liemt R. (1990). Intermediate filament dynamics. *Cell* 60:521-523
37. Suzukia H., Taguchia T., Tanakaa H., Kataokaa H., Lia Z., Muramatsua K., Gondob T. y Kawaia S. (2004). Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322:918–922
38. Tondreau T., Lagneaux L., Dejeneffe M., Mássy M., Mortier C., Delforge A. y Bron D. (2004). Bone marrow–derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72:319–32
39. Tsai R. y McKay R. (2000). Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells. *Journal of Neuroscience* 20(10):3725-3735.
40. Villa A., Snyder E., Vescovi A., y Martinez-Serrano A. (2000). Establishment and Properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Experimental Neurology* 161:67–84
41. Wang G, Bunnell B., Painter R., Quiniones B., Tom S., Lanson N., Spees J., Bertucci D., Peister A., Weiss D., Valentine V., Prockop D. y Kolls J. (2005). Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: Potential therapy for cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(1):186-191
42. Wagers A. y Weissman I. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116:639-648
43. Weimann J., Charlton C., Brazelton T., Hackman R. y Blau H. (2003). Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:2088–2093

44. Wislet-Gendebien S., Leprince P., Moonen G. y Rogister B. (2003). Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *Journal of Cell Science* 116:3295-3302
45. Woodbury D., Schwarz E., Prockop D. y Black I. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research* 61:364-370
46. Zhang C., Meng X., Zhu Z., Liu J. y Deng A. (2004). Connective tissue growth factor regulates the key events in tubular epithelial to myofibroblast transition in vitro. *Cell Biology International* 28:863-873