

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**

---



**CULTIVO, EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA**

---

**TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
PRESENTA:**

**ADRIÁN FERNANDO GUTIÉRREZ MALDONADO**

**ZAPOPAN, JALISCO. MARZO DEL 2011**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y**  
**Agropecuarias**

*Coordinación de carrera de Licenciado en Biología*

**C. ADRIÁN FERNANDO GUTIÉRREZ MALDONADO**  
**PRESENTE**


Manifiestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "Cultivo, Expansión y Diferenciación de células mesenquimales de médula ósea" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al **Dr. Edgardo Flores Torales** y como asesor al **Dr. Jorge Peregrina Sandoval**.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA".**

Las Aguas, Zapopan, Jal., 14 de octubre de 2009.

  
DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

  
BIOL. MARGARITO MORA NÚÑEZ  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS, opción TESIS con el título: "Cultivo expansión y diferenciación de células mesenquimales de médula ósea" que realizó el pasante **Adrián Fernando Gutiérrez Maldonado** con número de código **398329935** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.


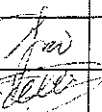
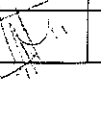

Atentamente  
 Las Agujas Nextipac, Zapopan, 2011.

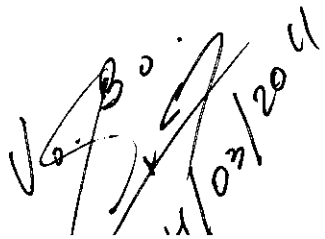


Dr. Edgardo Flores Torales  
 Director del trabajo,



Dr. Jorge Peregrina Sandoval  
 Asesor

Nombre completo de los Síndicos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Arturo Orozco Barocio		11 Ene 2011
Dra. Graciela Gudiño Cabrera		11-ENE-2011
QFB. Adolfo Cárdenas Ortega		11-01-11
<sup>Supl</sup> Dr. Jorge Peregrina Sandoval		11/01/2011

  
 11/03/2011

## Tabla de contenidos

<b>1- Introducción</b> .....	1
<b>2- Antecedentes / marco teórico</b> .....	2
2.1- Generalidades .....	2
2.2- Antecedentes históricos .....	2
2.3- Clasificación .....	4
2.3.1- De acuerdo al tipo de tejido de origen .....	4
2.3.2- De acuerdo al tejido de donde se pueden obtener .....	5
2.3.2.1- Embrionarias .....	5
2.3.2.2- Adultas .....	5
2.3.2.2.1- Células madre hematopoyéticas .....	5
2.3.2.2.2- Side population cells .....	6
2.3.2.2.3- Células progenitoras adultas multipotenciales .....	6
2.3.2.2.4- Células madre mesenquimales .....	6
2.4- Ontogenia de las células madre mesenquimales .....	7
2.5- Plasticidad de las MSC.....	8
2.6- Fuentes de obtención .....	9
2.7- Criterios para la identificación de células madre mesenquimales .....	11
2.7.1- Adherencia en plástico .....	12
2.7.2- Inmunofenotipo: marcadores específicos .....	12
2.7.3- Inducir la diferenciación <i>in vivo</i> de las MSC .....	14
2.8- Evidencias del potencial regenerativo de las MSC .....	14
2.9- Nuevas perspectivas: el potencial de la reprogramación .....	16
<b>3- Planteamiento del problema</b> .....	17

<b>4- Justificación</b> .....	18
<b>5- Hipótesis</b> .....	19
<b>6- Objetivos</b> .....	20
6.1- Objetivo general .....	20
6.2- Objetivos particulares .....	20
<b>7- Materiales y métodos</b> .....	21
7.1- Separación de las células mononucleares .....	21
7.2- Expansión celular .....	22
7.3- Cosecha de las MSC .....	24
7.3- Crialmacenamiento .....	24
7.4- Citometría de flujo .....	27
<b>8- Resultados</b> .....	28
8.1- Descripción de la morfología celular en las diversas etapas del cultivo .....	30
8.2- Identificación de células mesenquimales por medio de citometría de flujo mediante el marcador CD271 .....	33
8.3- Crialmacenamiento en nitrógeno líquido de las células cultivadas .....	35
<b>9- Discusión</b> .....	36
9.1 Cultivo de las MSC. ....	36
9.2 Expansión y descripción morfológica de las MSC. ....	36
9.3 Identificación de las MSC. ....	37
9.4 Crialmacenamiento de las MSC. ....	38
<b>10- Conclusión</b> .....	39
<b>11- Bibliografía citada</b> .....	40

## Índice de tablas

1- Tabla 1 (Algunos eventos clave en el desarrollo de la tecnología de células madre)	3
2- Tabla 2 (Comparación de las 3 fuentes de obtención de MSC)	10
3- Tabla 3 (Resumen de los criterios de identificación de las MSC)	11
4- Tabla 4 (Molécula de adhesión)	12
5- Tabla 5 (Factores de crecimiento y Receptores de citocinas)	13
6- Tabla 6 (Integrinas)	13
7- Tabla 7 (Marcadores específicos)	13
8- Tabla 8 (Curva de congelamiento)	25
9- Tabla 9 (Valores obtenidos de las muestras caracterizadas)	28

## Índice de gráficas

1- Curva de congelamiento	26
2- Citometría Inicial	33
3- Citometría final	34
4- Porcentaje promedio de células positivas al marcador CD271	34
5- Curva de congelamiento	35

## Índice de figuras

1- 24 Horas de cultivo .....	30
2- 48 Horas de cultivo.....	31
3- 1 Semana de cultivo .....	31
4- 2 Semanas de cultivo .....	32
5- 3 Semanas de cultivo.....	32

---

## Abreviaturas

---

<b>MSC*</b>	Células Madre Mesenquimales ( Mesenquimal stem cells )
<b>MO</b>	Médula Osea
<b>CFU-F*</b>	Unidades Formadoras de Colonias de Fibroblastos ( Colony-forming unit fibroblast)
<b>LIF*</b>	Factor Inhibidor de Leucemia (Leukemia inhibitory factor)
<b>HSC*</b>	Células Madre Hematopoyéticas (Hematopoietic stem cells)
<b>SP</b>	Side Population
<b>MAPCs*</b>	Células Progenitoras Adultas Multipotenciales (Multi-Potent Adult Progenitor Cells)
<b>AGM</b>	Aorta-Gónada-Mesonefros
<b>ISCT*</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society Cellular Therapy)
<b>TC</b>	Terapia Celular
<b>IT</b>	Ingeniería de Tejidos
<b>iPS Cells*</b>	Células madre pluripotenciales inducidas (Induced pluripotent stem cell)
<b>SFB</b>	Suero fetal bobino
<b>IBMX</b>	Isobutilmetilxantina
<b>CMT</b>	Células Mononucleares Totales
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido

---

\*Por sus siglas en ingles.



# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

## ***Introducción.***

Las células madre o troncales en los últimos años ha pasado de ser un término no solo del interés científico sino de dominio público, respecto al tratamiento de diversas patologías empleando células madre, ocupando paginas de revistas y medios de comunicación masivos más al alcance de toda la sociedad. Estos nuevos conocimientos que en este campo de la medicina moderna se están generando a un ritmo muy acelerado, han superado las expectativas tanto de médicos como de los pacientes, que las células madre vayan a contribuir a la curación de múltiples enfermedades humanas debido a su potencial de diferenciación, esperanzados en obtener beneficios adicionales a los brindados por los tratamientos tradicionales y con esto, mejorar su calidad de vida. (Próser F. 2003)

Una célula madre es una célula que tiene capacidad de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, producir células de uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad. La mayoría de tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células madre que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular. Algunas células madre adultas son capaces de diferenciarse en más de un tipo celular como las células madre mesenquimales y las células madre hematopoyéticas, mientras que otras son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como por ejemplo las células madre de la piel.

Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en células madre totipotenciales, las cuales son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario y las células madre pluripotenciales que tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y, por último, las células madre multipotenciales, capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria.

Las células madre embrionarias son consideradas como células pluripotenciales, es decir, que una única célula puede ser capaz de diferenciarse a células especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria y además demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que se han diferenciado, mientras que las células madre adultas se caracterizan por ser multipotenciales es decir que derivan de una células madre pluripotencial y experimentan una especialización adicional en las células madre que darán lugar a una función determinada procedentes de la misma capa embrionaria. (Próser F. 2003)

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

## *Antecedentes / marco teórico*

### *Generalidades*

Las células madre mesenquimales (MSC) o denominadas también estromales, son un grupo de células multipotenciales adultas con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia una variedad de tipo celular tales como los osteoblastos (células óseas), condrocitos (células del cartílago) y los adipocitos (células grasas). (Daniel R. Marshak 2001)

La principal fuente de obtención de estas células es la médula ósea (MO) aunque también se han podido aislar de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, sangre de cordón umbilical, entre otros. No obstante, la MO es el tejido más empleado debido al éxito en su aislamiento. (Diana P. G. 2007)

El término de “Células madre mesenquimales” (MSC) fue utilizado por primera vez en el artículo “Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method” por el Dr. Friedenstein y sus colaboradores en el año de 1974, este grupo, utilizando ratones y cobayos, describió por primera vez una población de células de médula ósea (MO) adherentes al plástico que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético. Dichas células fueron denominadas como unidades formadoras de colonias de fibroblastos CFU-F (por sus siglas en inglés) o mecanocitos estromales. (Friedenstein A. J. 1974)

### *Antecedentes históricos*

La historia de las células madre comenzó ya hace seis décadas durante las cuales se ha producido un cambio radical en la medicina moderna. El reconocimiento de la existencia de varios tipos de linajes celulares provenientes del blastocisto y de la sangre periférica del adulto, junto con su capacidad de producir nuevos tejidos, inclusive de capas embrionarias diferentes, ha permitido diseñar nuevos tratamientos antes considerados imposibles.

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

En la siguiente tabla [1] se presentan algunos de los eventos más representativos que han sido claves en el desarrollo de la tecnología de las células madre. (Kristina Blum 2007)

Tabla 1	Algunos eventos claves en el desarrollo de la tecnología de células madre
1954	John Enders recibe el Premio Nobel de Medicina por cultivo virus de polio en células humanas de riñón embrionario.
1958	En el Laboratorio Jackson en Maine, el científico Leroy Stevens descubre un tumor dentro del escroto de un ratón, y traza el origen del tumor de una célula madre. Es la primera persona en identificar las tendencias de estas células pluripotenciales.
1968	Primer trasplante de médula ósea con células madre adultas. Se utiliza con éxito en el tratamiento del SCID (Inmunodeficiencia combinada severa).
1981	El primer aislamiento de células madre embrionarias en ratones, se llevó a cabo tanto por los investigadores Gail Martin, Martin Evans y Kaufman MH de la Universidad de California en San Francisco y de la Universidad de Cambridge en Inglaterra.
1988	El biólogo James Thomson de la Universidad de Wisconsin publica en la revista <i>Science</i> el primer aislamiento de sangre de cordón umbilical que después es usada en trasplante de médula ósea.
1995	Por primera vez, científicos de la Universidad de Wisconsin aíslan con éxito células madre embrionarias de un primate.
2000	La Institución Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos de Norte América anuncian nuevas directrices en el estudio de las células madre, prohibiendo las investigaciones con células madre embrionarias
2001	El presidente de los Estados Unidos, George W. Bush, inicia una revisión de las directrices del NIH sobre fondos federales para investigación con células madre.
2001	Bush crea un Consejo Presidencial para la evaluación y seguimiento de las células madre en la investigación.
2005	Científicos de Corea del Sur, liderado por Woo Suk Hwang informan de la creación de 11 nuevas líneas de células madre.
2005	La empresa Advanced Cell Technology informa con éxito la extracción de una célula de un embrión humano sin dañar el embrión. Sin embargo, su afirmación de no dañar el embrión es posteriormente desmentido.
2007	El presidente Bush reduce el financiamiento federal para la investigación de células madre.

Tabla 1 Algunos antecedentes históricos en la tecnología de células madre. (Kristina Blum 2007)

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

## **Clasificación**

La clasificación de las células madre obedece principalmente a diversos criterios de identificación, obtención y origen, dentro de los cuales se encuentran principalmente dos grandes grupos:

- De acuerdo al tejido de origen.
- De acuerdo al tejido donde se pueden obtener.

### ***De acuerdo al tipo de tejido de origen***

De acuerdo al tipo de tejido de origen, existen cuatro tipos de células madre: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales. El término "totipotencial" (del latín *totus* que significa completo) hace referencia a la capacidad de una célula de dirigir el desarrollo total de un organismo (como las células de la placenta, las que forman las tres capas embrionarias o el cigoto), las células madre "pluripotenciales" (del latín *plures*, que significa muchos o varios), son aquellas que no pueden formar un organismo completo, pero si cualquier tipo de célula correspondiente a las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo, las células madre multipotenciales en cambio, son aquellas que sólo pueden generar células de su misma capa o linaje de origen embrionario, por ejemplo una célula madre mesenquimal de MO, al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de esa capa como miocitos, adipocitos u osteocitos. Y finalmente las células madre unipotenciales (del latín *unus*: uno) que solo pueden formar únicamente un tipo de célula particular. (Viviana M. 2005, Sadler 2004, Orlik D. 2001)

Durante mucho tiempo se considero a las células madre hematopoyéticas (CMH) como células madre unipotenciales, esto aparentemente, por su relación con la generación de células sanguíneas únicamente, mas sin embargo la flexibilidad de estas células de diferenciarse en otras células distintas a su tejido de origen, denominada posteriormente *plasticidad celular*, ubico a estas células como multipotenciales. (Erica L. Herzog 2003)

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

## *De acuerdo al tejido de donde se pueden obtener*

Las células madre también se pueden clasificar de acuerdo al tejido de donde se pueden obtener, estas pueden proceder del embrión (Células madre embrionarias) o de un órgano adulto (Células madre no embrionarias o adultas). Las células madre embrionarias son aquellas que sólo existen en las primeras fases del desarrollo embrionario entre los 4 y 5 días de gestación y tienen la capacidad de dividirse por periodos indefinidos en cultivos además de dar lugar a las células especializadas y producir cualquier tipo de célula en el cuerpo. Además de las células madre embrionarias, se han identificado células madre adultas que son células multipotenciales no diferenciadas que se encuentran en tejidos y órganos adultos y que poseen la capacidad de diferenciarse para dar lugar a células adultas del tejido en el que se encuentran como la medula ósea (MO), el sistema neuronal, el sistema gastrointestinal, el musculo esquelético, el musculo cardiaco el hígado, el páncreas y el pulmón. (Viviana M 2005, Yuehua J. 2002)

En la MO se han descrito diferentes tipos de células madre como lo son las células madre hematopoyéticas (HSC), las llamadas "Side Population Cells" (SP), recientemente las células progenitoras adultas multipotenciales o MAPCs, y las Células Madre Mesenquimales (MSC). (Próser F. 2003)

## *Células madre hematopoyéticas*

Son las más conocidas y empleadas en la clínica desde hace más de medio siglo en trasplantes de MO para pacientes que padecen patologías como la leucemia o aplasias medulares, su obtención principalmente es de la MO pero actualmente se obtienen mediante un proceso mucho menos traumático llamado aféresis (técnica mediante la cual se separan los componentes de la sangre, siendo seleccionados los necesarios para su aplicación en medicina y devueltos al torrente sanguíneo el resto de componentes). En humanos adultos, se encuentran fundamentalmente con una frecuencia relativa de 1 entre  $10^4$  a 1 entre  $10^5$  células nucleadas. Como su nombre lo indica, "Hematopoyesis" significa fabricación o producción de sangre lo cual garantiza la repoblación de células en un individuo. Tienen la capacidad de autor renovación y diferenciarse en dos grupos de progenitores hematopoyéticos: progenitor mieloide y progenitor

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

linfoide, los cuales a su vez se diferencian hacia linajes de células sanguíneas especializadas. (Vivian M. 2005, Próser F. 2003)

## ***Side population cells***

Su descubrimiento fue hace ya más de una década mediante células somáticas adultas, ya que tienen la capacidad de convertirse en células pluripotenciales por la sobreexpresión de factores de transcripción, factor clave para la diferenciación. Las "side population cells (SP)" han sido aisladas tanto a partir de MO como de músculo, utilizando técnicas de citometría de flujo para su identificación. Estas células se caracterizan por ser CD34 negativa, CD45 positiva/débil y CD38 débil/negativa, a su vez las células SP son también negativas para los marcadores CD54, CD90, CD117 y CD133. Estas células son capaces de diferenciarse en HSC y demostrado recientemente su diferenciación con características de músculo cardíaco y endotelio en un modelo murino de infarto al miocardio. (Ramalho S. 2009, Yamanaka S. 2009)

## ***Células progenitoras adultas multipotenciales (MAPCs)***

Las MAPCs han sido descritas recientemente, su descubrimiento ha suscitado la atención del mundo científico ya que se han descrito como células pluripotenciales con una capacidad de diferenciación muy similar a las células madre embrionarias. Las MAPCs han sido aisladas tanto de MO humana como murina. Las MAPCs, son capaces de proliferar *in vitro* más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento ya que mantienen unos niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo. *In vitro*, muy similar a las células embrionarias pluripotenciales, se identifican por medio de marcadores muy altos de CD13 y SSEA-1, niveles bajos de Flk-1, Sca-1 y Thy-1 así como ausencia de CD34, CD44, MHC I, MHC II, CD45 Y c-kit, también se detecta la activación de factores de transcripción Oct-4 nanog y Rex-1, factores que son necesarios para mantener a las células en un estado proliferativo e indiferenciado. Las MAPCs pueden ser inducidas para diferenciarse a tejidos derivados del mesodermo como hueso, cartilago, adipocitos, músculo esquelético, estroma hematopoyético o endotelio. (Jiang Y. 2002, (Prósér F. 2003)

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

## *Células madre mesenquimales*

Finalmente, la médula ósea también contiene células madre mesenquimales denominadas células madre estromales, MSC, unidades formadoras de colonias de fibroblastos CFU-F (por sus siglas en inglés) o mecanocitos estromales. (Friedenstein A. J. 1974)

Las MSC son un grupo específico de células multipotenciales adultas con morfología fibroblastoide y capaces de diferenciarse y adquirir características de células derivadas del mesodermo, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miotubos, fibroblastos, células estromales, así como células que poseen propiedades ectodérmicas. (Daniel R. Marshak 2001, Dolores Baksh 2004)

La médula ósea es la principal fuente de aislamiento de MSC, aunque también se han aislado de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético y sangre de cordón umbilical. (Sarah A. Wexler 2003)

## *Ontogenia de las células madre mesenquimales (MSC)*

Su ontogenia inicia durante la fecundación, del siendo sugerido por algunos autores que las MSC tienen un desarrollo embrionario paralelo con las HSC, cuando el óvulo y el espermatozoide se fusionan y dos núcleos haploides que se dividen mitóticamente dando origen a dos células hijas; las cuales entran a la etapa de segmentación (Serie de divisiones mitóticas que provoca el aumento de células) donde cada una de ellas sufre divisiones mitóticas produciendo más células hijas a las que se les denomina blastómeras. Después de la tercera división las blastómeras se compactan formando un conjunto apretado de células organizadas en una capa interna y otra externa. La mórula son 16 blastómeras que ingresan a la cavidad uterina 3 ó 4 días después de la fecundación, momento en el cual en la mórula se forma una cavidad constituyendo el blastocisto. La capa interna de células es la que se convertirá en embrión propiamente dicho y se sitúa en un polo del blastocisto, mientras que la masa celular externa formará el trofoblasto. (Sadler 2004)

Durante la tercera semana después de la fecundación, cuando tiene lugar un fenómeno muy característico denominado gastrulación (proceso mediante el cual se establecen las tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo) en el embrión, comienza la aparición de la línea primitiva en la superficie del epiblasto (originado en el octavo día del desarrollo de la masa celular interna) que, en su extremo cefálico, presenta el nódulo primitivo. En la región del nódulo y de la línea, las células epiblasticas se desplazan hacia el interior (se invaginan) para

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

formar nuevas capas celulares: el endodermo y el mesodermo. En consecuencia, el epiblasto da origen a las tres capas germinativas del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo), quienes a finales de la tercera semana se establecen en la región cefálica dando origen a la formación de órganos y tejidos en dirección cefalocaudal a medida que continúa la gastrulación. En el lapso de la tercera hasta la octava semana del desarrollo denominado "período embrionario", cada una de las tres capas germinativas, ectodermo, endodermo y mesodermo, dan origen a sus propios tejidos y sistemas orgánicos, dividiéndose de este último (mesodermo) en tres componentes de donde provienen las MSC. (Sadler 2004)

La hoja germinativa mesodérmica está constituida por 3 componentes principales que son: el mesodermo paraxial, el intermedio y el de la lámina lateral. El mesodermo paraxial forma somítomeros, que dan origen al mesénquima de la cabeza y se organizan en somitas en los segmentos occipitales y caudales dando origen al miotoma (tejido muscular), al esclerotoma (cartílago y hueso) y al dermatoma (tejido subcutáneo de la piel). La lámina lateral por su parte se separa en dos hojas, la parietal y la visceral. La primera junto con el ectodermo formará las paredes corporales laterales y ventrales; la hoja visceral formará junto con el endodermo la pared del intestino. Finalmente el mesodermo intermedio que conecta temporalmente el mesodermo paraxial con la lámina lateral, se diferencia en estructuras urogenitales. En las regiones cervical y torácica superior forma cúmulos celulares de disposición segmentaria (los futuros nefrotomas), mientras que en dirección más caudal, se produce una masa no segmentada de tejido, el cordón nefrónico. (Sadler 2004)

Finalmente las HSC y las MSC se originan del mesodermo intermedio que rodea a la aorta en una región denominada aorta-gónada-mesonefros (AGM), lo que se demuestra en embriones de ratón con 11 días de gestación, en los cuales se han detectado MSC lugar donde también aparecen las primeras HSC. Las HSC migran a hígado donde cumplirán funciones de hematopoyesis fetal, y luego colonizarán la médula ósea que es el tejido definitivo junto con las MSC, incrementando en número favorecidas por las condiciones del medio en el que se encuentran. La región AGM posee el microambiente necesario para alojar a las HSC, y teniendo en cuenta que son las MSC quienes proveen este microambiente estimulando una coordinación funcional con las HSC se estimula la presencia de MSC en esa región. (Sandra C. Mendes 2005; Ross Summer 2008; Xiao-Yan W. 2008)



# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

## ***Plasticidad de las MSC***

El término “plasticidad celular” empleado en células madre hace referencia a la capacidad que tienen estas células de adoptar un destino diferente como pueden ser células del endodermo o ectodermo y sugiriendo que las MSC pueden diferenciarse no solamente en células del mesodermo.

Se conoce que las MSC están constituidas por poblaciones celulares heterogéneas y en la mayoría de los experimentos, se han utilizado poblaciones heterogéneas, no poblaciones originadas a partir de clones individuales. Teniendo en cuenta esta heterogeneidad, se ha cuestionado la plasticidad de estas células, no obstante, uno de los trabajos que sustenta de manera convincente la plasticidad de las MSC fue publicado en el 2002 por el Dr. Yuehua Jiang de la Universidad de Minesota, donde a través de experimentos con poblaciones clonales de MSC obtenidas de médula ósea de ratones y ratas, identificaron una subpoblación mesenquimal denominada células progenitoras multipotenciales adultas (MAPC), que no sólo se diferenció a células mesenquimales, sino también a células con características morfológicas y marcadores celulares específicos de tipos celulares neuronales, endoteliales y endodérmicos. (Yuehua J. 2002)

La importancia de la plasticidad de las MSC radica por lo tanto en la posibilidad de obtener tipos celulares de cualquier origen embrionario a través de estas células, obtenidas de fuentes como la médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, entre otros, con fines de generar células y/o tejidos que pueden ser utilizados en protocolos terapéuticos. Por lo tanto, es muy importante, conocer los mecanismos moleculares, celulares, microambientales, etc. que regulan la plasticidad en las MSC.

## ***Fuentes de obtención***

La MSC se encuentran en diversos tejidos del cuerpo, por lo que su obtención no representa gran desafío, mas sin embargo, la mayoría de las técnicas empleadas son invasivas, lo que reporta cierto riesgo al momento de la toma de muestras. Las primeras MSC se aislaron a partir de MO hace aproximadamente 4 décadas, debido a la eficiencia del aislamiento y al potencial de diferenciarse en condroblastos, adipoblastos y osteoblastos, considerado este órgano como la principal fuente de obtención de dichas células. (Lindolfo Da S. M. 2008)

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

Actualmente la MO es la fuente de aislamiento de MSC, aunque tiene un mayor éxito, presenta ciertas limitaciones como el bajo número de MSC presentes en ella, el riesgo en el procedimiento al momento que se toma la muestra por ser un procedimiento invasivo, razones por las cuales la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo, entre otros, han sido una nueva opción para lograr el aislamiento y cultivo de MSC. (Susanne K. 2006)

El tejido adiposo representa una fuente alterna para la obtención de MSC. Los depósitos de tejido adiposo subcutáneo son accesibles y abundantes por lo que proporcionan un reservorio de células madre para cada individuo. Se han demostrado que las células madre adultas, derivadas de tejido adiposo, pueden diferenciarse a lo largo de múltiples vías *in vitro* en adipocitos, condrocitos, endotelio, epitelio, hepatocitos, neuronas y los osteoblastos. (James B. M. 2006, Linyi Peng 2008)

En cuanto a la morfología de las MSC puede variar según la fuente de obtención; por ejemplo, se ha observado que cuando se aíslan a partir de sangre de cordón umbilical el 93% de la población celular tiene un aspecto ovoide, con respecto al 7% que conserva una morfología similar a los fibroblastos. Por el contrario, cuando estas células son aisladas a partir de médula ósea, la relación de células fibroblastoides es mayor con respecto a las ovoides. Este aspecto morfológico es de gran importancia ya que podría tener relación con el inmunofenotipo de estas células quienes demuestran que si la población mesenquimal es obtenida de sangre de cordón umbilical la gran mayoría no expresan cierto antígeno en su membrana (CD90), mientras que si la población es de MO, este marcador puede ser determinante en su identificación. (Wolfgang Wagner 2005)

Sobre la obtención de las MSC a partir de sangre de cordón umbilical, este procedimiento es sencillo y no tiene ningún tipo de riesgo, ni para la madre ni para el bebé, mas sin embargo es necesario optimizar puntos críticos para lograr un cultivo exitoso, tales como el tiempo de recolección y procesamiento, así como el volumen de sangre recolectado igual o superior a 30 ml. (Wolfgang Wagner 2005)

La siguiente tabla [2] muestra las diferencias de algunos de los parámetros de comparación de las 3 fuentes más usuales de obtención de MSC. (Susanne K. 2006)

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

Parámetro	Médula ósea (MO)	Sangre de cordón umbilical	Tejido adiposo
Numero de muestras (N)	21	59	18
Formación de monocapa adherente	4-5 días	2-4 semanas	4-5 días
UFC-F obtenidas en monocapa adherente (Número)	83 / 61	0.002 / 0.004 (p<.001)	557 / 673
Células adherentes fibroblastoides	100%	29%	100%
Capacidad de diferenciación osteogenica	71.4%	100%	78.8%
Capacidad de diferenciación adipogenica	100%	0%	94%
Capacidad de diferenciación condrogénica	100%	100%	100%

Tabla 2. Diferencias entre parámetros de comparación de SCU, MO y tejido adiposo. (Susanne K. 2006)

### ***Criterios para la identificación de células madre mesenquimales***

El potencial terapéutico de las MSC ha generado un creciente interés muy marcado en una amplia variedad de disciplinas biomédicas. Por ello, los informes acerca de las MSC han tenido diferentes enfoques, en cuanto al criterio de caracterización de estas células obstaculizando el progreso en este campo que, está generando nuevos resultados y que día a día se está haciendo más difícil de comparar. La sociedad internacional de terapia celular (ISCT) ha propuesto 3 criterios para caracterización *in vitro* de MSC, estos son: Primero, las MSC deben mostrar adherencia en plástico de las células aisladas con morfología fibroblastoide. Segundo, al menos el 95% de las células deben expresar CD105, CD73 y CD90, y la ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19 Y HLA clase II y Tercero, ser capaces de inducir la diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipoblastos y condroblastos. (Massimo Dominici 2006)

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

### Resumen de los criterios de identificación de las MSC

1. Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo.
2. Fenotipo

	Positivo ( $\geq 95\%$ )	Negativo ( $\leq 2\%$ )
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 o CD11b
		CD79 $\alpha$ o CD19
		HLA-DR
3. Inducir la diferenciación *in vitro* de las MSC a osteoblastos, adipoblastos y condroblastos

Tabla 3 Criterios de identificación de las MSC. (Massimo Dominici 2006)

#### **Adherencia en plástico**

Una de las propiedades que caracteriza y diferencia a las MSC de las HSC es su capacidad de permanecer adherida sobre las superficies plásticas, la cual se da por su interacción con el medio de cultivo así como por cuestiones de pH y composiciones iónicas las cuales hacen que se produzcan rápidamente esta afinidad involucrando propiedades fisicoquímicas que le permiten mantenerse y proliferar en estas condiciones facilitando su identificación. (Massimo Dominici 2006)

#### **Inmunofenotipo: marcadores específicos.**

Uno de los criterios para identificar las MSC por caracterización inmunofenotípica está basado en un extenso panel de anticuerpos monoclonales, incluyendo la determinación de marcadores de diferenciación, moléculas de adhesión, marcadores de la matriz extracelular y factores de crecimiento. El inmunofenotipo aceptado para la identificación de MSC es la co-expresión de CD44, CD73 (SH3 Y SH4), CD90, CD105 (SH2) y HLA-I, en ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45. (Massimo Dominici 2006)

En las siguientes tablas [4, 5, 6 y 7], se muestran los diferentes marcadores fenotípicos conocidos actualmente de las células mesenquimales expansión *in vitro*. (Robert J. 2000)

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

<b>Molécula de adhesión en las MSC</b>		
Nombre común	Marcador de membrana	Detección
ALCAM	CD66	Positiva
ICAM-1	CD54	Positiva
ICAM-2	CD102	Positiva
ICAM-3	CD50	Positiva
L-selectina	CD62L	Positiva
LFA-3	CD58	Positiva
NCAM	CD56	Positiva
HCAM	CD44	Positiva
VCAM	CD106	Positiva

Tabla 4 Inmunofenotipo: Molécula de adhesión en las MSC. (Robert J. 2000)

<b>Factores de crecimiento y Receptores de citocinas de las MSC</b>		
IL-1R	CD121	Positiva
IL-3R	CD123	Positiva
IL-4R	CD124	Positiva
IL-6R	CD126	Positiva
IL-7R	CD127	Positiva
Interferón $\alpha$ R	CDw119	Positiva
Factor de Necrosis tumoral $\alpha$ 1- R	CD102a	Positiva
Factor de Necrosis tumoral $\alpha$ 2- R	CD102b	Positiva
Receptor de transferina	CD71	Positiva

Tabla 5 Inmunofenotipo: Factores de crecimiento y Receptores de citocinas de las MSC. (Robert J. 2000)

<b>Integrinas en las MSC</b>		
VLA - $\alpha$ 1	CD49a	Positiva
VLA - $\alpha$ 2	CD49b	Positiva
VLA - $\alpha$ 3	CD49c	Positiva
VLA - $\alpha$ 5	CD49e	Positiva

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

VLA-β	CD29	Positiva
B4- INTEGRINA	CD104	Positiva

Tabla 6 Inmunofenotipo: Integrinas en las MSC. (Robert J. 2000)

Marcadores específicos de las MSC		
Tetraspan	CD9	Positiva
5' nucleotidasa	CD73	Positiva
Thy-1	CD90	Positiva
Endogлина	CD105	Positiva
MUC-18	CD146	Positiva
BST-1	CD157	Positiva

Tabla 7 Inmunofenotipo: Marcadores específicos de las MSC. (Robert J. 2000)

En nuestro laboratorio se realizó un estudio donde se compararon los marcadores CD90, CD105, CD45, CD34 y CD79 contra el marcador CD271 para la identificación de las MSC. Los resultados mostraron que el DC271 puede ser utilizado como marcador único, ya que mostró una alta correlación con los marcadores recomendados por la ISCT en la identificación de las MSC. (Flores Torales. 2011 en prensa)

### **Inducción de la diferenciación *in vivo* de las MSC**

Y finalmente la inducción *in vitro* de las MSC a diferentes células de tipo mesodérmico como: osteoblastos (células del hueso, sintetizadoras de la matriz ósea, involucradas con el crecimiento de los huesos), condroblastos (células basófilas que muestran los orgánulos necesarios para la síntesis de proteínas) y adipoblastos (células que forman el tejido adiposo) que es la última de las características que define a las MSC como entidades clonales y de multipotencialidad *in vitro*. (Sadler 2004)

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

## Evidencias del potencial regenerativo de las MSC

Las MSC juegan un papel importante en la reparación de los tejidos, como en la diferenciación *in situ* de las células de los tejidos dañados. La ingeniería de tejidos (IT) es un campo multidisciplinario de investigación que combina los conocimientos científicos, de áreas como la biología celular y molecular ofreciendo una alternativa para el tratamiento de las lesiones condrales y con esto prevenir la aparición de osteoartritis (OA). El principio de la IT se basa en el cultivo y la expansión de células sembradas en estructuras o andamios tridimensionales biocompatibles y biodegradables que, con o sin la ayuda de factores de crecimiento, dan lugar a la formación de tejido nuevo para reparar o regenerar la estructura o función de tejidos lesionados o ausentes. Las células madre mesenquimales tienen por definición una alta tasa de proliferación, mostrando un fenotipo estable y permaneciendo en monocapa, además de su capacidad de diferenciación hacia tejidos del aparato locomotor, por lo que su uso en IT parece ser un campo muy prometedor. (Clemente Ibarra 2007)

Reflexionando en lo descrito anteriormente, en menos de 10 años los datos respecto a la aplicación y diferenciación de las MSC, se han visto enormemente enriquecidos, pareciendo ser un instrumento muy prometedor bien como materia prima para terapia regenerativa de enfermedades hasta ahora incurables como la enfermedad de Parkinson, diabetes o enfermedades cardíacas crónicas o bien como vehículo de terapia génica.

**CARTÍLAGO, HUESO.** Respecto a sus aplicaciones clínicas, podemos hacer referencia a modelos experimentales en donde se ha demostrado que las MSC son capaces de regenerar tejidos deteriorados o lesionados como hueso, cartílago, tendón y la reparación de músculo esquelético, en los cuales, en la mayoría de los casos solo se ha podido corregir pequeños defectos inducidos en los modelos de investigación y mostrando aun algunas carencias. (Mauro Krampera 2006)

**INMUNOLOGÍA.** Por otra parte, como moduladoras de reacciones inmunes en colagenopatías (enfermedades del tejido conectivo), esclerosis múltiple y trasplantes de médula ósea, cooperando con las células dendríticas en todos sus procesos inmunes. (Mauro Krampera 2007)

**CARDIOLOGÍA.** Una de las características biológicas de las MSC, es su destacada capacidad de flexibilidad metabólica y resistencia a isquemia, mismas que le proporcionan una ventaja en resistencia de conservación de su potencial de diferenciación en los órganos afectados por la

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

falta de riego sanguíneo, tal como nos muestran los estudios realizados por el Dr. Mylotte quien sometió a las MSC en condiciones de hipoxia y a la privación de glucosa, demostrando que las MSC cuentan con la protección necesaria en un ambiente isquémico para funcionar con capacidad reparativa o regeneradora. Estas características de las MSC, tienen una importancia considerable en el mejoramiento de la eficacia de la terapia celular en enfermedades cardíacas. (Louise A. Mylotte 2008)

Algunos ejemplos de terapias con MSC en cardiología, ha sido la implantación local de dichas células en modelos experimentales, resultando la reparación del músculo dañado, presentando mejoras significativas en su funcionamiento, además de la liberación de factores de crecimiento y citocinas que apoyan en la reparación del tejido afectado sin presentar rechazo por el sistema inmune, lo que nos lleva al uso de MSC (reparación de daño cardiovascular) como una alternativa de tratamiento muy prometedor. (Martin 2004)

**NEUROLOGÍA.** El Dr. Sánchez Ramos en el 2002 describe que células de MO o de sangre de cordón umbilical, inducidas *in vitro* para originar células mesenquimales, podrían ser diferenciadas en células gliales y neuronas. Además, anticipando el potencial terapéutico de estas observaciones, el autor demuestra en un modelo murino la corrección de defectos neurológicos inducidos previamente (Sanchez-Ramos 2002). De igual forma, para el tratamiento de la paraplejia traumática experimental, ocasionada por la pérdida de la función neurológica después de una lesión sometida a una laminectomía a nivel T6-T8, mediante un modelo murino, el Dr. Vaquero ha reportado una clara y progresiva recuperación motora de los animales a partir de las dos semanas siguientes al trasplante. Los estudios histológicos realizados un mes después del tratamiento, sugieren que las células madre administradas se diferencian a neuronas y aportan factores tróficos capaces de inducir fenómenos de regeneración medular, posiblemente activando las células madre endógenas de la médula espinal traumatizada. (Vaquero J. 2005)

### ***Nuevas perspectivas: el potencial de la reprogramación***

La posibilidad de utilizar células madre mesenquimales en el tratamiento de diversas enfermedades humanas como la diabetes, la enfermedad de Parkinson o la cardiopatía isquémica, constituye uno de los retos más importantes de la medicina moderna. Sin embargo, antes de que los resultados de los estudios con células madre se traduzcan clínicamente, existen múltiples problemas que deben ser resueltos.



# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

## ***Planteamiento del problema***

Existen diversas enfermedades crónico degenerativas que ocupan gran incidencia y tasa de mortalidad en nuestro país y en el mundo, esto representa un gran problema de salud, y con gastos enormes para los gobiernos por otorgar tratamientos costoso y a largo plazo a sus ciudadanos, es por ello, la necesidad de introducir nuevas estrategias terapéuticas que subsanen, este problema de salud.

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

### ***Justificación.***

Se ha propuesto el uso de células madre adultas (no embrionarias), como regeneradoras de tejidos dañados y de la recuperación de las funciones del órgano afectado. Para lograr dicho fin, es necesario iniciar con una serie de estudios que nos permitan tener la seguridad de poder cultivar, expandir y diferenciar dichas células *in vitro*; por otro lado, el uso de este tipo de células nos permite eliminar los problemas éticos que causan el uso de células embrionarias, ya que este tipo de población celular (mesenquimales) pueden ser obtenidas de fuentes mucho más accesibles como la medula ósea sin repercusiones para el individuo del cual se obtienen.

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

## ***Hipótesis.***

Las células mesenquimales de medula ósea, pueden ser diferenciadas, cultivadas, y expandidas *in-vitro*.

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

## **Objetivos.**

### **Objetivo general.**

- Diferenciar, cultivar y expandir células mesenquimales de medula ósea.

### **Objetivos particulares.**

1. Cultivar células mesenquimales a partir de la purificación de células mononucleares obtenidas de muestras de médula ósea.
2. Expandir y diferenciar las células mesenquimales cultivadas *in vitro*.
3. Identificar las células mesenquimales por medio de citometría de flujo mediante el marcador CD271.
4. Describir la morfología celular en las diversas etapas del cultivo.
5. Criopreservar las células MSC en nitrógeno líquido para estudios posteriores.

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

## ***Materiales y Métodos.***

Para la toma de las muestras de médula ósea (MO) (n=30), se contó con la colaboración de los servicios de la unidad de trasplante de médula ósea del Nuevo Hospital Civil de Guadalajara Dr. Juan I. Menchaca. Las muestras, fueron tomadas de pacientes sometidos a diagnóstico de enfermedades hematológicas, se obtuvieron 20 muestras de MO de pacientes con edades comprendidas de 1 a 16 años, mientras que las muestras de los individuos sanos a enfermedad hematológica (n=10), se obtuvieron de personas adultas sometidas a tratamiento de terapia celular, el tiempo promedio de procesamiento, fue de 6 horas después de su obtención. Las muestras fueron donadas para actividad de investigación por los pacientes bajo su consentimiento informado.

Las muestras obtenidas, fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de inmunobiología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) en Zapopan Jalisco.

A partir de las muestras recolectadas, se aislaron células mononucleares por gradiente de densidad (Lymphoprep™ Axis Shield PoC AS, Oslo Norway), aspirando el anillo de células formado en la interface del interior del tubo, posteriormente fueron cultivadas a 37°C, 5% de CO<sup>2</sup> y 95% de humedad a una densidad de 30x10<sup>6</sup> células mononucleares en medio de cultivo Nonhematopoietic stem cell \* for human marrow stromal cells (*Miltenyi biotec MACS, Bergisch Gladbach Germany*). Después de 48 horas, las células no adherentes, fueron retiradas, eliminando el medio de cultivo y remplazado con medio nuevo, el cambio de medio, se realizó una vez por semana. Una vez que se observó una monocapa de células con una confluencia mayor al 90%, se procedió a realizar el desprendimiento de las células adherentes con 0.05% tripsina/EDTA 1X (Invitrogen, Auckland N.Z.) a 37°C para su posterior expansión, descripción, análisis y criomacernamiento para estudios posteriores.

### • **Separación de células mononucleares.**

Para la separación de células mononucleares, es recomendado usar muestras recién tomadas de médula ósea y manejar todo el proceso en condiciones estériles en campana de flujo laminar.

1. Diluir el aspirado de médula ósea en concentraciones 1:1 con DPBS (GIBCO, Invitrogen) estéril en tubos estériles de 15 mL.

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

2. Cuidadosamente, (gota a gota resbalándolo por la pared del tubo cónico de 15 mL) agregar la muestra diluida a un tubo cónico estéril de 15 mL que contenga 4 mL de Lymphoprep™ (Axis Shield PoC AS, Oslo Norway), teniendo cuidado de no romper el gradiente.
3. Centrifugar por 30 minutos a 1500 rpm. a temperatura ambiente.
4. Aspirar el anillo de células formado en la interface del interior del tubo.
5. Transferir las células aspiradas a un tubo estéril de 15mL.
6. Realizar un primer lavado con 10 mL. de DPBS, centrifugando por 10 minutos a 1500 rpm. a 4 °C.
7. Decantar el sobrenadante, despegar el botón de células situado en el fondo del tubo.
8. Realizar un segundo lavado con 7 mL. de DPBS, centrifugando durante 10 minutos a 1500 rpm. a 4 °C.
9. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón de células en 600 µl de medio de expansión Nonhematopoietic stem cell ® for human marrow stromal cells (*Miltenyi biotec MACS, Bergisch Gladbach Germany*).
10. Contar el número de células y con la tinción de azul de tripano, descartar las células muertas y ajustar la muestra a una densidad de  $30 \times 10^6$  células mononucleares.

- **Expansión de células.**

Las células madre mesenquimales, se encuentran en porcentajes muy bajos en medula ósea, debido a estas cantidades tan pequeñas, es necesaria su expansión con el fin de incrementar su número y para posteriormente ser utilizada en estudios futuros. El medio de expansión Nonhematopoietic stem cell ® for human marrow stromal cells (*Miltenyi biotec MACS, Bergisch Gladbach Germany*), cuenta con las condiciones, factores y nutrientes apropiados para incrementar su número y optimizar el crecimiento celular.

1. Tomar de la muestra previamente procesada, una alícuota de 110 µl. en un tubo eppendorf para realizar el análisis de citometría (CD271).
2. El resto de la muestra se mezcla en 5 mL de medio y se cultivan en cajas de petri de 13 x 100 mm.
3. Incubar las células durante 48 horas a una temperatura de 37°C, 5% de CO<sup>2</sup> y 95% de humedad.

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

4. Al cabo de las 48 horas, las células no adheridas a la base de nuestra caja de petri, serán retiradas mediante una extracción de todo el medio y remplazado con 5 mL de medio nuevo a temperado a 37°C en un ambiente estéril.
5. Realizar cambios de medio de cultivo, cada 7 días, retirando el medio de cultivo de la caja y agregando 5 mL de medio de cultivo nuevo a temperado a 37°C y en ambiente estéril.
6. Revisar en el microscopio invertido en cada cambio de medio para determinar la evolución del crecimiento celular así como el momento de la confluencia mayor de 90%.
7. Una vez que observemos una monocapa de células con una confluencia superior al 90%, realizamos un lavado con DPBS a temperado a 37°C para retirar los desechos celulares (proceso realizado en ambiente estéril).
8. Agregar 1 mL de 0.05% tripsina/EDTA 1X (Invitrogen, Auckland N.Z.) a temperado a 37°C, distribuirlo en toda la superficie de la caja de cultivo.
9. Incubar las células a 37°C durante 5 minutos.
10. Retirar con una pipeta pasteur, la suspensión celular y la tripsina 0.05%/EDTA 1X y depositarla en un tubo cónico de 15 mL estéril.
11. Con la ayuda de un raspador de células (Cell Scraper, 23 cm), desprender las células que hayan quedado pegadas en la caja de petri.
12. Realizar un barrido de células con DPBS y recuperar la suspensión celular con la pipeta y depositarla en el mismo tubo cónico de 15 mL.
13. Centrifugar la suspensión celular por 10 minutos a 1500 rpm.
14. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón de células en 10 mL de medio de expansión Nonhematopoietic stem cell.
15. La suspensión celular, es dividida en dos cajas petri de 13 x 100 mm (5 mL de suspensión celular por cada caja) y se reinicia el cultivo en las mismas condiciones.
16. Este procedimiento, se repite 4 veces, hasta obtener la cantidad de células deseadas.

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

- **Cosecha de las MSC.**

1. Una vez que observemos una monocapa de células con una confluencia superior al 90%, realizamos un lavado con DPBS a temperatura a 37°C para retirar los desechos celulares (proceso realizado en ambiente estéril).
2. Agregar 1 mL de 0.05% tripsina/EDTA 1X (Invitrogen, Auckland N.Z.) a temperatura a 37°C, distribuirlo en toda la superficie de la caja de cultivo.
3. Incubar las células a 37°C durante 5 minutos.
4. Retirar con una pipeta pasteur, la suspensión celular y la tripsina 0.05%/EDTA 1X y depositarla en un tubo cónico de 15 mL estéril.
5. Con la ayuda de un raspador de células (Cell Scraper, 23 cm), desprender las células que hayan quedado pegadas en la caja de petri.
6. Realizar un barrido de células con DPBS y recuperar la suspensión celular con la pipeta y depositarla en el mismo tubo cónico de 15 mL.
7. Centrifugar la suspensión celular por 10 minutos a 1500 rpm.
8. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón de células en 1.1 mL de medio de expansión Nonhematopoietic stem cell.

- **Crioalmacenamiento.**

La criopreservación o crioalmacenamiento, es un proceso en el cual las células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80°C y -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. A estas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producen la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas.

Para el congelamiento de las MSC de MO se utilizan crioprotectores intracelulares como el dimetilsulfóxido (DMSO) y crioprotectores extracelulares (Dextran) en proporciones 1:1.

El DMSO es un solvente bipolar aprótico (no forma puentes de hidrógeno), hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por



## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

Lovelock en 1959, el DMSO se ha usado como un crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua.

El Dextran en cambio, es una sustancia de alto peso molecular, efectivo a velocidades altas de congelación, importante por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suele usarse asociado a los agentes penetrantes.

En cuanto a el proceso de congelamiento, este se lleva a cabo con una curva de congelamiento programada, mediante el software "*Custom BioGenic Sistem*", en un equipo "*CBS Freezer 2100 Series*", que disminuye gradualmente la temperatura mediante 6 etapas presentadas a detalle en la tabla 9, en las cuales la temperatura, desciende de 1.0°C por minuto hasta alcanzar la temperatura de -6.0°C, después de esto se induce el proceso de nucleación disminuyendo abruptamente la temperatura hasta llevarla a -50°C posteriormente es llevado a -14°C y disminuye gradualmente hasta -90°C, una vez alcanzada dicha temperatura, las células son guardadas en tanques de nitrógeno líquido para su posterior aplicación.

	Congelamiento (°C/min)	Temperatura demandada (°C)
1	0.0	1.0
2	1.0	-6.0
3	25.0	-50.0
4	15.0	-14.0
5	1.0	-45.0
6	10.0	-90.0

Tabla 8 Curva de congelamiento.

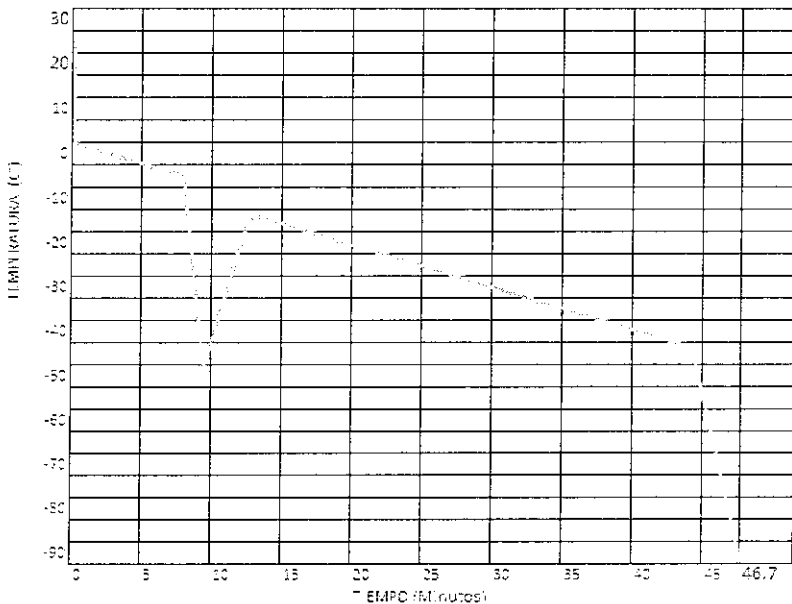
1. Depositar la suspensión celular cosechada anteriormente, en un criotubo de 2.0 mL.
2. Agregar al criotubo, una mezcla 1:1 de Dimethyl Sulphoxide (DMSO, Hybri-Max®, Steinheim Germany) y Dextran en solución salina (Laboratorios Pisa S.A. de C.V.

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

Guadalajara Jalisco México) en una proporción del 20% con respecto al volumen de la suspensión celular.

3. Mantener la muestra en hielo y en agitación continua al momento de agregar la mezcla DMSO/Dextran.
4. Finalmente, mediante un sistema de congelamiento automatizado (*CBS Freezer 2100 Series*) la muestra es llevada a  $-90^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente criomacendarla en tanques de nitrógeno líquido, a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ .



Grafica 1. Curva de congelamiento

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

- **Citometría de flujo.**

La citometría de flujo, es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y por supuesto, cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo.

1. En un tubo para citometría, se agregan 10  $\mu\text{l}$  del anticuerpo CD271 conjugado con FITC (MACS Miltenyi Biotec, Germany).
2. En un segundo tubo se agregan 10  $\mu\text{l}$  de isotipo (MACS Miltenyi Biotec, Germany) marcado con FITC.
3. Agregar 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular a cada tubo.
4. Mezclar los dos tubos en Vortex y dejarlos protegidos de la luz y a temperatura ambiente durante 30 minutos (con la finalidad de que el anticuerpo se una específicamente a las moléculas de CD271 presentes en las células).
5. Se agrega 1 mL de buffer de lisis (cloruro de amonio) con la finalidad de lisar los eritrocitos en la citometría inicial y para la citometría final, agregar únicamente 1 mL de DPBS.
6. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz.
7. Realizar la lectura correspondiente en el citómetro de flujo Beckman Coulter EPICS XL, iniciando con la muestra marcada con el isotipo y posteriormente la muestra con el marcador CD271.

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

### Resultados

Para este estudio, se procesaron un total de 80 muestras de MO, a partir de las cuales, 30 muestras fueron las que cubrieron con los criterios de inclusión de nuestro estudio.

La siguiente tabla (9), muestra los valores y datos obtenidos de las muestras caracterizadas.

M = Masculino

F = Femenino

	Volumen de sangre (ml)	SEXO	Edad	Alto (cm) (1/15)	CD271 (1/100)	CD271 (1/100)
1	4.5	M	16	4.8	2.34	49
2	5	F	10	12.3	2.31	53.6
3	4.5	M	4	20.1	1.87	56.7
4	5.5	M	1	20.1	1.73	56.8
5	3	F	12	21.3	1.48	54.7
6	2.2	F	3	24.3	1.81	46.9
7	3	F	9	30	0.71	47.8
8	4.5	M	3	31.2	1.53	50.1
9	2.5	M	7	35.7	0.76	56.2
10	3	M	7	38.1	0.4	48
11	1	M	3	44.5	1.43	55.9
12	1	M	1	51	2.18	48.6
13	2	F	3	54	2.21	50.3
14	2.5	M	4	60.3	0.4	55
15	1	F	5	66	2.45	52.6

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

No.	Volumen de sangre (ml)	Sexo	Edad	No. de GVT	CD271 (total) (%)	CD271 (Spa) (%)
115	1	F	1	87.5	0.85	46.7
17	1	M	3	91	1.42	48.1
11	1	F	4	91	11.21	53.3
18	1	M	3	91	1.46	52.7
20	1	M	1	95	2.48	57.3
21	2.4	M	4	103.8	1.39	51.2
22	2.5	M	5	108	1.45	47.6
23	1	F	7	117	4.49	53.9
24	2	F	1	119	0.44	48.6
25	3	M	11	120.9	0.17	50
26	3	F	1	129.3	0.11	52.7
27	2	M	4	237.3	2.1	55.7
28	1.5	M	4	227	1.73	41.3
29	3	M	10	339	0.25	54.6
31	5	M	2	352.5	0.57	55

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

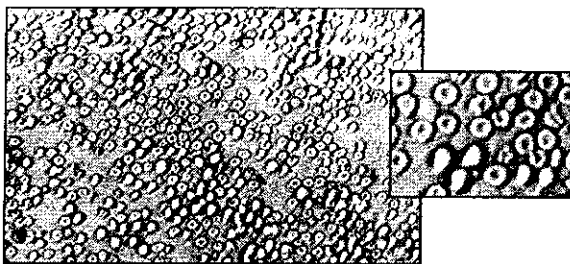
---

## ***Descripción de la morfología celular en las diversas etapas del cultivo***

La descripción del desarrollo de las células mesenquimales se llevo a cabo en los periodos de 24 y 48 horas, así como en 1, 2 y 3 semanas de cultivo las fotos mostradas a continuación son fotos representativas del grupo a describir.

### **24 Horas Figura 1**

*-Se presentan células redondas y pequeñas, observadas en grandes cantidades a lo largo de la superficie cultivada. Se presenta una gran densidad de células rojas en toda la superficie cultivada.*



*Fig. 1. Foto representativa que cubre entre un 85 y 90% del total de la superficie cultivable, observadas en un invertoscopio con objetivo 40X. Tomadas en el laboratorio de inmunobiología de la Universidad de Guadalajara.*

### **48 Horas Figura 2**

*-Se presentan células adheridas al plástico, mostrando un mayor tamaño, con estructura redonda bien definida, en cantidades mucho menores, refringentes y distribuidas a lo largo de la superficie cultivada. Ya se observan solo algunas células rojas de manera muy dispersa a lo largo del cultivo.*

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

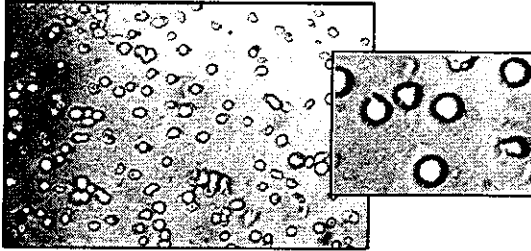


Fig. 2. Foto representativa que cubre entre un 40 y 45% del total de la superficie cultivable, observadas en un invertoscopio con objetivo 40X. Tomadas en el laboratorio de inmunobiología de la Universidad de Guadalajara.

## 1 Semana Figura 3

-Se observan células totalmente adheridas al plástico con formas diversas, tamaños grandes, fusiformes irregulares, con prolongaciones alargadas, núcleos grandes en los cuales se observan sus nucléolos. Todavía se observan algunas células de forma redonda.

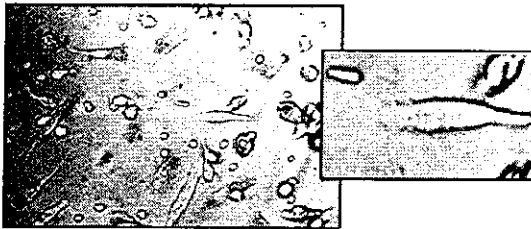


Fig. 3. Foto representativa que cubre entre un 45 y 50% del total de la superficie cultivable, observadas en un invertoscopio con objetivo 40X. Tomadas en el laboratorio de inmunobiología de la Universidad de Guadalajara.

## 2 Semanas Figura 4

-Se observa una gran multiplicación de células distribuidas en toda el área de cultivo, se encuentran totalmente adheridas al plástico. Son células grandes con formas diversas, fusiformes irregulares, con apariencia estrellada, con prolongaciones alargadas y extensas

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

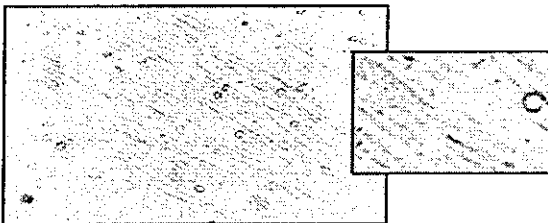
*haciendo contacto con las células vecinas, aparentando estar unas sobre otras y cubriendo una gran extensión del área cultivada, las células presentan núcleos redondos esféricos u ovoides, en los cuales se observan nucléolos de gran tamaño.*



*Fig. 4. Foto representativa que cubre entre un 75 y 80% del total de la superficie cultivable, observadas en un invertoscopio con objetivo 40X. Tomadas en el laboratorio de inmunobiología de la Universidad de Guadalajara.*

### **3 Semanas Figura 5**

-Se observan células que cubren la totalidad del área cultivada, la multiplicación celular ha cubierto la superficie plástica, son células adheridas en su totalidad, alargadas y de menor tamaño, de forma romboide, unidas con las células vecinas, tienen una apariencia regular, uniforme, presentando una cubierta homogénea en la superficie plástica, aparentando una capa de tejido bien definida, se les puede observar núcleos redondos bien definidos y de tamaño pequeño.



*Fig. 5. Foto representativa que cubre entre un 90 y 95% del total de la superficie cultivable, observadas en un invertoscopio con objetivo 40X. Tomadas en el laboratorio de inmunobiología de la Universidad de Guadalajara.*



# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

## ***Identificación de células mesenquimales por medio de citometría de flujo mediante el marcador CD271***

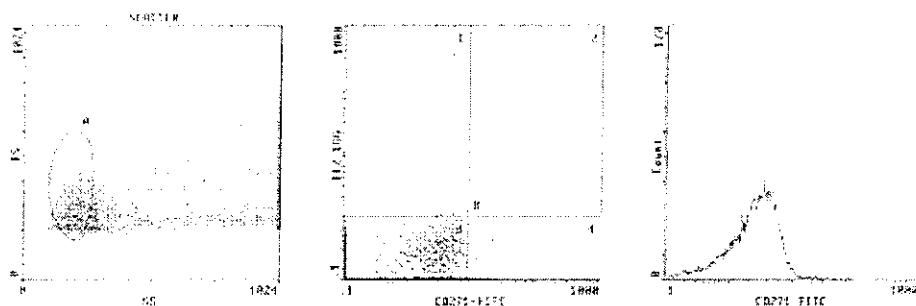
La identificación de las MSC se realizó, por medio de citometría de flujo (Beckman Coulter EPICS XL), esto nos permitió tener un porcentaje de células positivas al marcador CD271 (molécula presente en las MSC y que permite su identificación), antes y después de los cultivos.

La primera cuantificación, fue realizada al iniciar el cultivo y la segunda cuantificación se realizó posterior a la cosecha del último cultivo realizado.

En cuanto a la citometría final, las células fueron tomadas de aquellas muestras que se prepararon para criopreservar.

Las gráficas 2 y 3, presentadas a continuación, corresponden a la cuantificación de las células positivas al marcador CD271 por citometría de flujo, se presenta una muestra representativa de la cuantificación inicial y final; en ellas se puede observar la diferencia existente entre el porcentaje de células positivas al marcador DC271 de la cuantificación inicial (Gráfica 2) y de la cuantificación final (Gráfica 3), el incremento de las células positivas al marcador CD271, va de 1.79% al inicio del cultivo, a 51.77% al final de los cultivos, el incremento observado es de casi 29 veces.

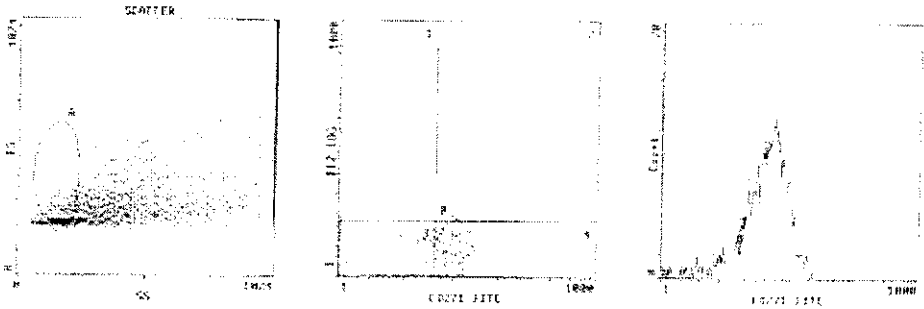
### ***Citometría Inicial***



Gráfica 2. Citometría inicial de células positivas al marcador CD271.

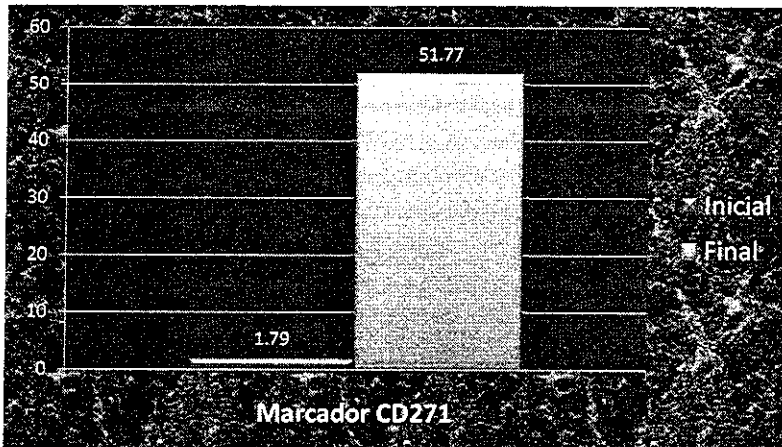
# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

## Citometría final



Grafica 3. Citometría final de células positivas al marcador CD271.

La siguiente gráfica (4), presenta el porcentaje promedio de células positivas al marcador CD271, cuantificado por citometría de flujo a las células antes y después de los cultivos, en esta gráfica, puede observarse de manera clara, el incremento en el porcentaje de células CD271 positivas en las muestras después de cultivadas, con respecto a las muestras antes de ser cultivadas.



Grafica 4. Porcentaje promedio de células positivas al marcador CD271 antes y después del cultivo celular.

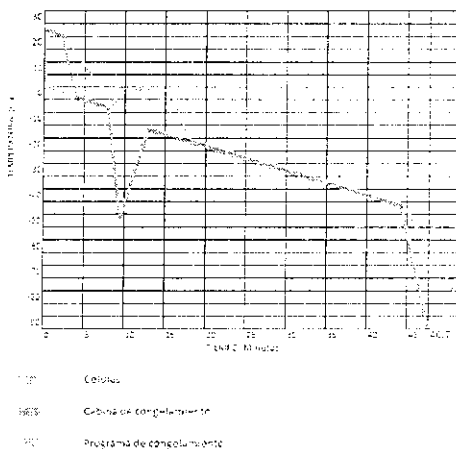
# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

## Crioalmacenamiento de las MSC en nitrógeno líquido

El proceso de crioalmacenamiento de las células madre mesenquimales, inicia con el concentrado celular en un vial de crioalmacenamiento el cual se mantiene en hielo a una temperatura de 0° C para adaptar las células al cambio de temperatura. Posteriormente se agregó gota a gota una mezcla 1:1 de Dimethyl Sulphoxide (DMSO, Hybri-Max®, Steinheim Germany) y Dextran en solución salina (Laboratorios Pisa S.A. de C.V. Guadalajara Jalisco México) en una proporción del 20% con respecto al volumen de la suspensión celular. Finalmente, mediante un sistema de congelamiento automatizado (CBS Freezer 2100 Series) la muestra es llevada a -90°C, para posteriormente crioalmacenarla en tanques de nitrógeno líquido, a una temperatura de -196°C.

Las MSC son almacenadas a -196°C. en un tanque de crioalmacenamiento con nitrógeno líquido en donde permanecerán inanimadas, permitiendo que se conserven en buen estado para su utilización en experimentos futuros.

La siguiente gráfica (5), muestra una curva de congelamiento representativa de una muestra de células madre mesenquimales cultivadas de médula ósea, en donde se observan los tres parámetros que intervienen en el proceso: las células, la cabina de congelamiento y los valores programados en el sistema (temperatura objetivo).



Gráfica 5. Curva de congelamiento, obtenida del sistema automatizado, durante el proceso de congelación de una muestra de células mesenquimales cultivadas.

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

## ***Discusión***

Las células madre mesenquimales han sido objeto de estudio a partir de la década de los años 70's cuando *Friednestei* y su equipo de investigación las aislaron y las describieron por primera vez como unidades formadoras de colonias fibroblastoides abriendo las puertas a un nuevo campo de estudio el cual se ha convertido en un área importante dentro de la medicina moderna. (Friedenstein A. J. 1974)

La mayoría de los estudios acerca de la mejor fuente de obtención de MSC reportan que son la sangre de cordón umbilical, el tejido adiposo y la médula ósea, siendo esta última la más utilizada por el mayor número de células mononucleares, población celular en la cual encontramos a las MSC. En el estudio realizado en este trabajo se demostró que algunas muestras de MO procedentes de pacientes sometidos a diagnóstico de enfermedades hematológicas, con edades comprendidas entre 1 a 16 años, contienen células adherentes con morfología fibroblastoide y que pueden ser expandidas en cultivo para cumplir los criterios establecidos por la ISCT, para considerarlas MSC. (Massimo Dominici 2006, Susanne K. 2006)

### **Cultivo de las MSC.**

En nuestro trabajo, nosotros utilizamos un medio de cultivo selectivo para MSC (Nonhematopoietic stem cell<sup>®</sup> for human marrow stromal cells) el cual, nos reportó resultados similares a los del medio de cultivo Amniomax (GIBCO) utilizado por el Dr. Roberto Estrada (2007), coincidiendo que el tiempo óptimo de crecimiento es variable pero se mantiene dentro de los primeros 15 días después de iniciado el cultivo de las células.

### **Expansión y descripción morfológica de las MSC.**

Para optimizar los tiempos de expansión y cambio de medio de cultivo de las MSC, se procedió a monitorear el crecimiento en distintos tiempos, observando resultados muy favorables para el cambio de medio de cultivo en el transcurso de una semana, optimizando al máximo los nutrientes dados a las células mediante el medio de expansión y coincidiendo con los trabajos realizados por el Dr. Roberto Estrada (2007), sin embargo no se puede establecer un tiempo común para el crecimiento y expansión de las células en cultivo ya que estos varían dependiendo de la fisiología individual de las células, más sin embargo, la morfología de estas células, se comportó de la misma manera, observando características fibroblastoides en el transcurso de todo el tiempo del cultivo, a lo largo de 3 semanas, pasando por las diversas etapas mencionadas en la descripción realizada en este trabajo. Existen antecedentes en la

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

literatura sobre la morfología de las MSC, en donde se presenta el registro morfológico mediante microscopía invertida de células obtenidas de sangre de cordón umbilical y MO, observándose células con características fibroblastoides con prolongaciones de tamaño medio en sangre de cordón umbilical, mientras que para las derivadas de MO se observaron células con prolongaciones más extensas (Diana P. G. 2007), sin embargo es la primera vez que se presenta una descripción morfológica en los diferentes estadios del cultivo: 24 horas, presentan células redondas y pequeñas, observadas en grandes cantidades a lo largo de la superficie cultivada, 48 horas, células adheridas al plástico, mostrando un mayor tamaño, con estructura redonda bien definida, en cantidades mucho menores, refringentes y distribuidas a lo largo de la superficie cultivada, 1a semana, células totalmente adheridas al plástico con formas diversas, tamaños grandes, fusiformes irregulares, con prolongaciones alargadas, núcleos grandes en los cuales se observan sus nucléolos, 2a semanas células grandes con formas diversas, fusiformes irregulares, con apariencia estrellada, con prolongaciones alargadas y extensas haciendo contacto con las células vecinas, aparentando estar unas sobre otras y cubriendo una gran extensión del área cultivada, las células presentan núcleos redondos esféricos u ovoides, en los cuales se observan nucléolos de gran tamaño y 3a semanas, células adheridas en su totalidad, alargadas y de menor tamaño, de forma romboide, unidas con las células vecinas, tienen una apariencia regular, uniforme, presentando una cubierta homogénea en la superficie plástica, aparentando una capa de tejido bien definida, se les puede observar núcleos redondos bien definidos y de tamaño pequeño.

A su vez presentan una morfología tipo fibroblastoide muy similar a las ya reportadas, manteniéndose constante a lo largo de 3 semanas del cultivo, mostrando características morfológicas homogéneas.

### Identificación de las MSC.

Algunos criterios para identificar a las MSC *in vitro* establecidos por la ISCT, consisten en probar la adherencia a plástico de las células aisladas con morfología fibroblastoide y determinar la expresión de los marcadores CD105, CD73 y CD90 en ausencia de marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45, en el presente trabajo nosotros llevamos a cabo, este primer parámetro de validación, reconociendo como células madre mesenquimales a aquellas células que permanecieron adheridas al plástico después del primer cambio de medio de cultivo, en el segundo parámetro a considerar por la ISCT para la identificación de MSC (presencia de marcadores CD105, CD73 y CD90 en ausencia de marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45)

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

(Massimo Dominici 2006, Susanne K. 2006), nosotros utilizamos solamente el marcador DC271 recomendado por el Dr. Edgardo Flores Torales (2011) , el cual mostró una alta correlación con los marcadores recomendados por la ISCT en la identificación de las MSC, siendo esta, una manera más rápida y práctica de identificar MSC. La inmunofenotipificación de las MSC para el estudio que nosotros realizamos, cumplió con el criterio de la presencia del marcador CD271 con una alta distribución en las células. Este resultado, comprueba que el marcador CD271 es un marcador clave en la identificación de las MSC a través de su determinación fenotípica.

### Crioalmacenamiento de las MSC.

Para la criopreservación de las MSC se utilizó una curva de congelamiento muy similar a la utilizada por otros autores (Yang H. 2005) en donde se disminuye la temperatura gradualmente hasta alcanzar los rangos de  $-4^{\circ}\text{C}$  a  $-6^{\circ}\text{C}$  para después inducir el proceso de nucleación, disminuyendo la temperatura abruptamente (alrededor de los  $-55^{\circ}\text{C}$ ) que posteriormente es llevada a un rango de  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-25^{\circ}\text{C}$  y disminuir lentamente la temperatura hasta alcanzar  $-90^{\circ}\text{C}$ , reportando una curva de congelación similar a la utilizada para las células mesenquimales obtenidas en este trabajo.

Cubriendo los objetivos de este estudio, adicionalmente se realizaron pruebas preliminares de descongelamiento de MSC a 5 muestras, obteniendo resultados favorables en cuanto a su proliferación y morfología, similares a los presentados antes de su congelamiento, dándonos la certeza de que dichas células crioalmacenadas pueden ser utilizadas en estudios posteriores, conservando las mismas características y actividad que se observaba antes de ser congeladas. Esto nos permitirá, continuar con esta línea de investigación y diseñar protocolos de diferenciación de las MSC a células maduras, para la regeneración de tejidos y órganos dañados.

El propósito actual de los científicos, es aislar MSC, diferenciarlas o reprogramarlas y usarlas como fuente de reparación tisular en diversas patologías, mejorando significativamente la calidad de vida de los pacientes y ofreciéndoles un tratamiento alternativo y eficiente a lo actualmente utilizado con poco éxito. Para esto, es necesaria la expansión y caracterización biológica *in vitro* de las MSC, lo cual, nos permite entender sus mecanismos biológicos y esto nos ayudará a tener un conocimiento más amplio de la actividad biológica de las MSC y nos permitirá aplicarlas de manera más eficiente, con implicaciones importantes y avances significativos en los tratamientos de diversas enfermedades.

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

## ***Conclusiones***

1. Aislamos y diferenciamos células mesenquimales, a partir de células mononucleares totales de muestras de medula ósea.
2. Expandimos las MSC *in vitro* presentando un incremento de 29 veces más con respecto a la cuantificación realizada antes de la expansión.
3. Describimos las de MSC en sus diferentes etapas de crecimiento, a lo largo de 3 semanas.
4. Comprobamos la presencia de las MSC, a través de la cuantificación de células positivas al marcador CD271 por medio de citometría de flujo.
5. Criopreservamos y almacenamos en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , las células mesenquimales cultivadas en este trabajo.

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

## ***BIBLIOGRAFÍA CITADA:***

Clemente Ibarra, D. G., Valentín Martínez y Cristina Velasquillo (2007). "Ingeniería de tejidos y osteoartritis." *Reumatol Clin* 3: 17-22.

Daniel R. Marshak, Richard Lavenham Gardner, David Gottlieb (2001). "Stem Cell Biology". Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Diana Páez Guerrero, Jenny Arévalo Romero, Viviana Marcela Rodríguez Pardo. (2007). "Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea". *Nova*, julio-diciembre, año/vol. 5, número 008 Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Bogotá, Colombia pp. 114-126

Dolores. Baksh, L. S., R. S. Tuan (2004). "Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy." *Cell. Mol. Med* 8(3): 301-316.

Erica L. Herzog, L. C., and Diane S. Krause (2003). "Plasticity of marrow-derived stem cells." *Blood* 102(10): 3483-3493.

Edgardo Flores Torales, Arturo Orozco Barocio, Oscar R. González Ramella et al. (2011). "The CD271 expression could be alone for establisher phenotypic marker in Bone Marrow derived mesenchymal stem cells." *En prensa*.

Friedenstein A. J., Deriglasova U. F., Kulagina N. N., Panasuk A. F., Rudakowa S. F., Luriá E. A., Ruadkow I. A. (1974). "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method." *Exp healmat* 2: 83-92.

James B. Mitchell, Kevin McIntosh, Sanjin Zvonice, Sara Garrett, Z. Elizabeth Floyd, Amy Kloster, Yuan Di Halvorsen, Robert W. Storms, Brian Goh, Gail Kilroy, Xiying Wu, Jeffrey M. Gimble,(2006). "Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers". *Stem Cells*; 24:376–385.

Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. (2002). Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100 Suppl 1: 11854-60.



# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

- Kristina Blum and Noel McManus (2007). "Stem Cells Timeline". ProQuest LLC
- Lindolfo Da Silva Meirelles, Arnold I. Caplan, Nance Beyer Nardi. (2008). "In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells". *Stem Cells*; 26:2287–2299
- Linyi Peng, Z. J., Xinhua Yin, Xin Zhang, Yinan Liu, Ping Chen, Kangtao Ma, and Chunyan Zhou (2008). "Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue." *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* 17: 761-774.
- Louise A. Mylotte, A. M. D., Mary Murphy, Timothy O'Brien, Afshin Samali, Frank Barry, Eva Szegezdi (2008). "Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment." *Stem cells* 26: 1325–1336.
- Martin. Mark F., Pittenger, Bradley J. (2004). "Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics." *Circulation research* 95(1): 9-20.
- Mauro Krampera, G. P., Giuseppe Aprili, Massimo Franchini (2006). "Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair." *Bone* 39: 678-683.
- Mauro Kramper, Francesco Bifari, Veronica Lisi, Elda Mimiola, Annalisa Pasini (2007). "Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells." *Transfus Med Hemother* 35: 194-2
- Massimo Dominici, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, FC Marini, DS Krause, RJ Deans, A Keating, DJ Prockop and EM Horwitz. (2006) "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement" *International Society for cellular therapy*. 8(4) 315-317
- Orlic Donald, Jan Kajstura, Stefano Chimenti et al. (2001). "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival". *Cardiovascular Research Institute, Department of Medicine, New York Medical College, Valhalla, NY*. Vol. 98 No. 18.
- Próser F., Verfaillie C. M. (2003) "Células madre adultas". *An.Sist. Navar*. 26(3):345-356
- Ramalho-Santos, M. (2009). "iPS Cells: Insights into Basic Biology." *Cell* 08: 012.
- Roberto Estrada, Patricia Venegas. (2007). "Comparison of different protocols for the cultive of mesenchymal stem cells of adipose origin". *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. Vol. 28 / N° 1 y 2

# Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea

---

- Robert J. Deans and Annemarie B. Moseley. (2000). "Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses". *Experimental Hematology* 28, 875–884.
- Ross Summer, A. F. (2008). "Mesenchymal Progenitor Cell Research." *The American Thoracic Society* 6(7).
- Sadler, T. W. (2004). *Langman, Embriología médica : Con orientación clínica M. Panamericana*. Buenos Aires
- Sanchez-Ramos, J. R. (2002). "Neural Cells Derived From Adult Bone Marrow and Umbilical Cord Blood." *Journal of Neuroscience Research* 69: 880–893.
- Sandra C. Mendes, C. R. a. E. D. (2005). "Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny." *Development and disease* 132(5).
- Sarah A. Wexler, C. D., Patricia Denning-Kendall, Claire Rice, Ben Bradley and Jill M. Hows (2003). "Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. ." *British Journal of Haematology* 121: 368-374.
- Susanne Kern, Hermann Eichler, Johannes Stoeve, Harald Kluter, Karen Bieback. (2006). "Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue". *Stem Cells*; 24:1294–1301
- Vaquero J, Z. M., Oya S, Aguayo C (2005). "Utilización de células madre mesenquimales del estroma de la médula ósea para el tratamiento de la paraplejia traumática experimental." *Mapfre Medicina* 16: 115-121.
- Viviana Marcela Rodríguez. (2005). "Células madre: conceptos generales y perceptivas de investigación". *Revista de la facultad de ciencias Pontificia Universidad Javeriana*. Vol. 10, No. 1, 5-14.
- Wolfgang Wagner, F. W., Anja Seckinger, Maria Frankhauser, Ute Wirkner, Ulf Krause, Jonathon Blake, Christian Schwager, Volker Eckstein, Wilhelm Ansorge, and Anthony D. Ho (2005). "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood." *Experimental Hematology* 33: 1402-1416.
- Xiao-Yan Wang, Y. L., Wen-Yan He, Lei Zhang, Hui-Yu Yao, Chun-Mei Hou, Ying Tong, Yuan-Lin Liu, Guan Yang, and X. Y. Xiao-Dan Liu, Bing Liu, Ning Mao. (2008). "Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos." *Blood*.

## Cultivo, expansión y diferenciación de células madre mesenquimales de medula ósea

---

Yamanaka, S. (2009). "A Fresh Look at iPS Cells." *Cell* 3(34): 13-17.

Yang H., Zhao A., Acker J. P., Liu J.Z., Akabutu J., Mc Gann L. E. (2005). "Effect of dimethyl sulfoxide on post thaw viability assessment of CD45+ and CD34+ cells of umbilical cord blood and mobilized peripheral blood." *Cryobiology*;10:165-75.

Yuehua Jiang, B. N. J., R. Lee Reinhardt, Robert E. Schwartz, C. Dirk Keenek, Xilma R. Ortiz-Gonzalezk, Morayma Reyes, Todd Lenvik, Troy Lund, Mark Blackstad, Jingbo Du, Sara Aldrich, Aaron Lisberg, Walter C. Lowk, David A. Largaespada & Catherine M. Verfaillie (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Natur* 418: 41-49.