

**CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
Y LA REPARACIÓN DE TEJIDOS:
UN NUEVO CONCEPTO TERAPÉUTICO**

*Conferencia pronunciada por la Dra. Alejandra Chasseing,
acto organizado por el Instituto de Investigación y Desarrollo
de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires
el 5 de noviembre de 2008*

Presentación

por el Académico Titular Dr. Marcelo A. Dankert

Es un gran placer presentar a la Dra. Alejandra Chasseing, graduada en la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Buenos Aires, con formación post doctoral en la Universidad de Cornell y en el Memorial Sloan Kettering Cancer Center, ambas en New York, Estados Unidos de Norte América. Y ha sido también Investigadora Invitada en este último Centro y en la Clínica Universitaria de Navarra, España.

No voy a detallar lo enorme serie de premios y distinciones recibidas, sólo voy a mencionar que actualmente es miembro de la Carrera del Investigador del CONICET en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBIME), aquí, en Buenos Aires.

Tiene más de sesenta trabajos publicados en revistas internacionales y nacionales en temas de inmunidad, hematología y áreas vinculadas. Y hoy nos va a hablar en un tema que domina, fascinante y de gran actualidad: “Células Madre Mesenquimales y la reparación de tejidos. Un nuevo concepto terapéutico”.

Durante el desarrollo embrionario de animales vertebrados y el ser humano, uno de los eventos iniciales más importantes, es la formación de tres líneas germinales embrionarias específicas como son el ectodermo (da origen al linaje neural y piel), el mesodermo (da origen a los linajes sanguíneo, óseo, muscular, condrocítico y adiposo) y el endodermo (se piensa que contribuye a la formación de tejidos del tracto respiratorio y digestivo). La participación de las células embrionarias en estos tres grupos requiere la acción secuencial de la expresión de ciertos productos de múltiples genes y el preciso momento, en el cual las células embrionarias se transforman en un progenitor comprometido con cada linaje específico aún no está totalmente definido (1). Además, durante la etapa embrionaria las células madre, los progenitores comprometidos y las células maduras de un determinado linaje tisular conservan su especificidad en forma irreversible salvo ciertas excepciones (2). En contraposición, en los últimos años evidencias experimentales mostraron que durante la etapa adulta las distintas poblaciones mencionadas no mantienen su especificidad en forma irreversible (2, 3). Observaciones, que permiten afirmar que bajo ciertas circunstancias las células madre presentes en los distintos tejidos, así como los progenitores comprometidos y ciertas células diferenciadas presentes en los mismos, tienen las propiedades de diferenciarse, desdiferenciarse y transdiferenciarse dando células maduras del mismo o distinto origen. La transdiferenciación se define como la conversión de la célula de un linaje tisular específico en otra célula de un linaje completamente diferente, con la pérdida de sus marcadores específicos y función inicial, adquiriendo así marcadores y función del nuevo linaje específico. La propiedad de transdiferenciación de la célula madre adulta dio lugar al concepto de plasticidad (Stem Cell Plasticity), el cual es función del microambiente estromal (factores solubles, componentes de la matriz extracelular, células accesorias y estromales) del tejido que se necesite recuperar (4).

Las células madre son células indiferenciadas que se caracterizan por su capacidad de auto-renovación, su alto potencial de proliferación y su diferenciación en progenitores comprometidos no auto-renovables y células efectoras diferenciadas (2, 5).

Las células madre han sido clasificadas por su potencial de desarrollo como totipotenciales (capaces de dar todos los tipos de células embrionarias y extra-embrionarias), pluripotenciales (capaces de dar todos los tipos celulares embrionarios), multipotenciales (capaces de dar un gran número de linajes celulares), oligopotenciales (capaces de dar un número más limitado de linajes celulares que la multipotencial) y unipotenciales (capaces de contribuir con un solo linaje celular específico) (2, 6). Ejemplo de *totipotencial* es un embrión, de *pluripotenciales* son las células derivadas de la masa interna de los blastocitos (inner cell mass=ICM) y de *multipotenciales* son las células madre adultas hematopoyéticas (HSC) y mesenquimales (MSC) de organismos post-natales (2) (Figura 1).

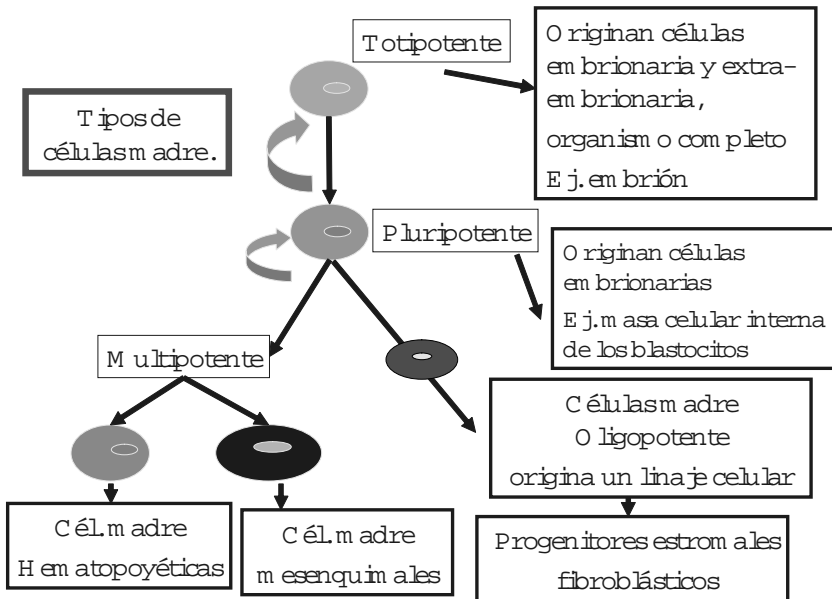


FIGURA 1

Por otro lado, aún no se conoce totalmente si las células madre derivadas del ICM son una población homogénea de células pluripotenciales y si las células madre embrionarias derivan de células pluripotenciales idénticas funcionalmente y fenotípicamente del ICM (2).

Las células madre adultas multipotenciales han sido descritas en distintos tejidos y algunas han sido caracterizadas recientemente

te (HSC y MSC en médula ósea [MO] y sangre periférica; células madre neurales en sistema nervioso central; células madre hepáticas en los canales de Hering; células madre pancreáticas intra-isletos del páncreas; células madre de piel en la lámina basal de la epidermis y folículo piloso; células madre epiteliales en pulmón; células madre del epitelio intestinal; células madre del músculo esquelético en fibras musculares) (7).

Las diferencias más importantes encontradas entre las células madre adultas (ASC) y las embriogénicas/fetales (ESC y FSC) son: **ESC y FSC** = células madre pluripotenciales, con alto potencial proliferativo, responsables del desarrollo embriogénico y organogénesis. Diferenciación a todas las especies celulares. Pueden mantenerse 6 meses sin diferenciarse (auto-renovación). Su estudio ha originado profundos conflictos éticos. Para trasplantes debe ser autóloga por el problema de rechazo que origina en el huésped. Y **ASC**: células madre multipotenciales, con alto y bajo potencial proliferativo, responsables de la reparación de tejidos. Diferenciación limitada. Pueden mantenerse 4 días sin diferenciarse y se pueden subcultivar durante 7 subcultivos sin que se desdiferencien y transdiferencien a células tumorales. Tiene funciones inmunosupresoras. Para trasplantes puede administrarse ASC autóloga o alogénica (2, 7-9).

En este trabajo nos interesa hacer especial referencia a la naturaleza, biología y perspectivas del uso terapéutico de la MSC, en particular de MO.

La MO esta compuesta por dos compartimentos, uno el hematopoyético (HSC y progenitores comprometidos con los distintos linajes específicos) y otro, el estromal o microambiente hematopoyético (células estromales propiamente dichas, células accesorias, componentes de matriz extracelular y factores solubles) (10) (Figura 2). Dentro de las células estromales encontramos MSC, progenitores estromales, fibroblastos, macrófagos, endoteliales y adipocitos (11). Todas las células estromales de MO derivan de la MSC con excepción del macrófago que deriva de la HSC.

Las MSC se conocen también como células estromales o progenitores mesenquimales de MO. Las MSC son células quiescentes, *in vitro* comienzan a proliferar frente a un estímulo adecuado (PDGF, FGF-2, TGF- β , EGF, entre otros) (12, 13) (Figura 3). Las MSC y los progenitores estromales son células adherentes al plástico, no fagocíticas, capaces de diferenciarse, *in vivo e in vitro*, en líneas celulares específicas del mismo origen como osteocitos, condrocitos, adipocitos, tenocitos, células musculares y células estromales (3, 14,

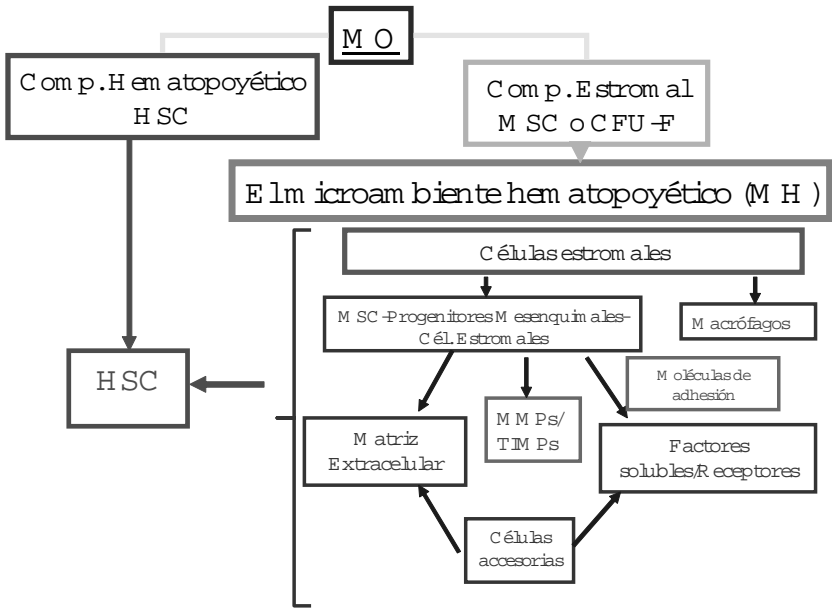


FIGURA 2

MSC de MO humana normal



FIGURA 3

15) (Figura 4). Sin embargo, las MSC pueden transdiferenciarse en diferentes tipos celulares de distinto origen como células neuronales, hepáticas, pancreáticas, renales, y mioblastos, entre otras (3, 16, 17).

**Diferenciación a osteocito, condrocito,
adipocito.**

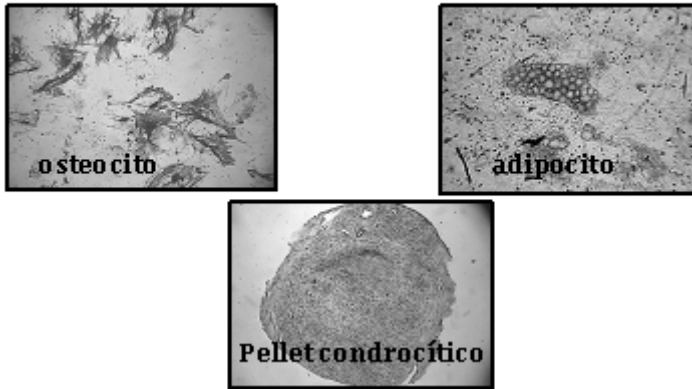


FIGURA 4

Las MSC son capaces de originar unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) *in vitro*, es decir cada CFU-F se origina de una MSC (18) (Figura 5). Por lo tanto, la alteración de la capacidad de clonado de la MSC para dar CFU-F podría representar un mecanismo no caracterizado previo a una falla en la plasticidad de la MSC y de los progenitores estromales para diferenciarse y transdiferenciarse a células de distintos linajes (endodérmico, mesodérmico).

MSC=CFU-F

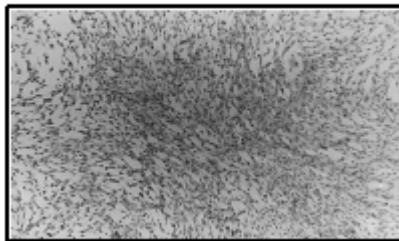


FIGURA 5

co y ectodérmico). En cultivos de MO realizados en medio a con 20% de suero bovino fetal, la forma celular estromal que predomina dentro de cada CFU-F es la fusiforme, característica de células estromales de naturaleza fibroblástica (prolil 4 hidroxilasa, CD44, stro-1, positivas) (18, 19, 20).

Cada CFU-F está compuesta por células estromales diferenciadas, progenitores y células madre de distinto potencial de diferenciación (multi, cuatro, tri, bi, unipotencial) y proliferación, de ahí la importancia de aislarlas, caracterizarlas y estudiar su funcionalidad antes de ser utilizados para la reparación de tejidos o terapia génica (21).

La MSC de MO son células madre que no se renuevan permanentemente, se forman en ciertos períodos, crecen *in vitro* en fase sólida, presentan vida media larga, forman parte de una estructura compleja como es el microambiente hematopoyético de MO y su fenotipo presenta plasticidad (22-25). Por el contrario, las HSC son células que se renuevan permanentemente y en forma continua, crecen en cultivo en fase líquida, tienen vida media corta, el sistema hematopoyético es una estructura simple y las HSC presentan una vez diferenciadas a los distintos linajes sanguíneos un fenotipo irreversible (22).

La mayor evidencia de la existencia de MSC, se deriva de los experimentos de cultivo largo de MO, donde el rol de estas células estromales es crear un microambiente hematopoyético apropiado para favorecer la auto-renovación, proliferación y diferenciación de HSC y los progenitores hematopoyéticos a través de la liberación de citoquinas (IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, etc.), factores de crecimiento (LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Flt-3, SCF, PDGF, trombo-poyetina, etc.), metaloproteinasas (MMP2 y MMP9), componentes de matriz extracelular (fibronectina, colágeno I, III y IV, laminina, proteoglicanos de heparán sulfato, de dermatán sulfato, de condroitin sulfato y ácido hialurónico). Es decir, crear un microambiente adecuado para mantener la homeostasis de la hematopoyesis (26, 27).

Como se dijo anteriormente el ensayo *in vitro* utilizado para identificar MSC de MO es el ensayo de CFU-F, el cual nos informa del número y potencialidad de la MSC *in vivo*. Por otro lado, Friedenstein y colab., en 1961 fueron los primeros en demostrar que las células derivadas de MO eran capaces de favorecer la osteogénesis (28).

Respecto a la caracterización fenotípica de las MSC de MO grandes progresos han sido realizados utilizando un separador de células

activadas por fluorescencia (FACS) y la técnica de separación magnética. Los estudios de marcadores de superficies de MSC en cultivo mostraron positividad para Stro-1, SH2, SH3, SH4 y negatividad para CD34, CD45, CD14, CD133 (21).

Por otro lado, en trabajos de caracterización fenotípica realizados con células progenitoras mesenquimales no expandidas de MO humana adulta fresca, se han identificado dos fracciones celulares, una CD45⁻CD14⁻/CD73⁺ y otra CD45⁻CD14⁻/CD49a⁺ (29). La expresión antigénica temprana de CD73 y CD49a es una característica que define a las MSC pero hasta el momento no se conoce su significado funcional. El CD73 podría ser un activador de transducción de señales durante las interacciones entre las MSC y el resto de los componentes del microambiente estromal, al ser una molécula de adhesión, favoreciendo así la proliferación y los procesos de diferenciación (30). Y la expresión de CD49a (cadena α de VLA-1) permitiría posiblemente que las MSC interactúen con componentes de la matriz extracelular como colágeno IV y laminina, interacciones ambas que favorecerían la migración. Además, la unión de CD49a a colágeno induciría en la MSC (quiescente) la progresión del ciclo celular y su supervivencia (29, 31). La presencia de MSC se ha encontrado en MO tanto en el período postnatal como adulto y su frecuencia declina con la edad (32). En el nacimiento, la frecuencia es de 1 MSC / 10⁴ células mononucleares de MO, declinando esta relación a 1 MSC / 2x10⁶ células mononucleares en los individuos de 80 años (33). Hay distintos factores intrínsecos y extrínsecos que afectan el número y la capacidad de clonado de la MSC de MO para dar CFU-F *in vitro*, entre ellos está el régimen pre-transplante de MO, el cual induce una disminución reversible del número de CFU-F en los niños e irreversible en el adulto (34). Anomalía que también se manifiesta en la alteración de la capacidad de diferenciación de la MSC de MO, especialmente a osteoblasto-osteocito. Debemos recordar que el hueso y la MO son anatómicamente contiguos y que exhiben una interdependencia funcional marcada. La MO y el hueso, a pesar que se toman en general como sistemas separados, funcionan como una unidad simple. Las MSC regulan no sólo la osteogénesis sino también la osteoclastogénesis, es decir los procesos de desarrollo óseo y remodelación (35). Los osteoclastos derivan de los progenitores monocíticos de MO pero la diferenciación de los mismos está regulada de forma autócrina y/o parácrina por las MSC, a través de la liberación y expresión de múltiples factores como son citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y reguladores transcripcionales (35). Por otro lado,

los osteoblastos liberan como las células estromales de MO múltiples factores solubles que regulan la hematopoyesis (IL-11, IL-6, GM-CSF y M-CSF), en particular la mielopoyesis (36). De estas últimas observaciones surge el concepto de que muchos desórdenes de la MO afectan en forma significativa la composición y función del hueso, involucrando interacciones entre las células normales y modificadas de MO y aquéllas que existen en el compartimiento óseo. A pesar de los grandes avances que se han realizado en el tema de la diferenciación de la MSC a osteoblasto/osteocito, así como en la influencia de esta célula madre en la osteoclastogénesis, mucho queda por estudiar sobre los mecanismos por los cuales MO y hueso actúan sinérgicamente para regular la remodelación ósea normal y patológica.

En referencia al aislamiento de MSC de MO se puede realizar por distintas metodologías pero el más común y con un alto rendimiento es a través del aislamiento inicial de células mononucleares por un gradiente de Ficoll-Hypaque ($\delta=1.075 \text{ gr/cm}^3$) y posterior adherencia al plástico durante 24 horas, utilizando medio de cultivo alfa suplementado con 20% de suero bovino fetal. Luego de este período, se descartan las células hematopoyéticas no adherentes, y se vuelven a incubar las células estromales con el mismo medio hasta alcanzar confluencia. Las células estromales se aíslan por tratamiento con solución de Tripsina-EDTA (0,05-0,02% en PBS, respectivamente) (18). Hasta 40 subcultivos se pueden realizar sin que las células mesenquimales estromales (MSC y progenitores estromales) pierdan su multipotencialidad (37). Sin embargo, con los sucesivos subcultivos las MSC y progenitores estromales comprometidos pueden transdiferenciarse y dar un estadio de célula madre intermedio llamado de transición entre la célula de naturaleza epitelial y mesenquimal (*epithelial mesenchymal transition*) que podría favorecer la diferenciación a células madre epiteliales, las cuales podrían dar origen al desarrollo de tumores. Estudios *in vitro* realizados con MSC de tejido adiposo subcultivadas durante 4-5 meses han mostrado la aparición espontánea de ASC transformadas, con características de células neoplásicas como son el incremento del porcentaje de la fase S, la inestabilidad cromosómica, la disminución de los marcadores de las MSC como son CD90 y CD105 o SH2, la pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto en cultivos en medio de agar semi-sólido, cambios de la morfología típica elongada fusiforme a la pequeña y compacta (38). Más aún, células madre neoplásicas han sido aisladas, caracterizadas y definidas en varios tipos de tumores como son el carcinoma mamario, el glioblastoma y las leucemias mielodes,

proponiendo los autores de estos trabajos que dichas células madre derivan de la ASC normal (39).

La regulación de los procesos de auto-renovación y diferenciación de la MSC son muy complejos, depende de múltiples factores tanto intrínsecos (genéticos) como extrínsecos (microambiente del tejido específico). La pérdida del equilibrio entre auto-renovación y diferenciación da lugar a un crecimiento celular descontrolado y/o a un incremento de la maduración de los distintos progenitores comprometidos, lo que da como resultado la aparición de tumores malignos y benignos, así como defectos tisulares. Por lo tanto, un mejor entendimiento de la biología de la MSC es necesario para establecer un criterio seguro para su potencial uso clínico.

Esta posibilidad de expandir las MSC y su multipotencialidad, aumentó el interés clínico de utilizarlas en condiciones muy estrictas de cultivo para la reparación de tejidos y terapia génica.

La diferenciación de la MSC a osteocito, condrocito, adipocito y células estromales es función de un número limitado de factores de crecimiento y nutrientes, mientras que la transdiferenciación por ejemplo a cardiomiocito, neurona y hepatocito es sumamente compleja, está compuesta de múltiples pasos y requiere la presencia de factores de crecimiento preconditionantes específicos y condiciones precisas muy bien definidas (40).

El trasplante de MSC, así como su aceptación y diferenciación en células de los múltiples órganos dañados, ha sido demostrado en muchos modelos de animales y ensayos clínicos en humanos (17, 41, 42). Estos estudios indican que la MSC está preparada funcionalmente para reconocer el sitio de injuria y transformarlo en un tejido apropiado funcionalmente. Sin embargo, no se conoce hasta el momento en forma clara el mecanismo que induce el *homing* de la MSC en el tejido dañado y la diferenciación.

Respecto a la diferenciación *in vitro* de la MSC en adipocitos, osteocitos y condrocitos, grandes avances se han realizado en los últimos años (42, 43). La presencia factores solubles en los medios de cultivo es esencial; por ejemplo: TGF- β y BMP son necesarios para la formación del cartílago, fuente de fosfato orgánico es necesario para la osteogénesis y estímulos hormonales para la adipogénesis (40). Sin embargo, un medio adecuado no es suficiente para alcanzar la diferenciación pues como dijimos anteriormente dentro de un clon de MSC pueden existir hijas de diferente potencialidad, es decir pueden existir multipotenciales, oligopotenciales, unipotenciales. Por lo tanto, algunas podrán dar *in vitro* osteocitos, condrocitos y adipocitos y

otras sólo 2 tipos celulares o quizás una MSC hija dar un solo tipo celular. Además, el número de subcultivo de la MSC también influye sobre el potencial de diferenciación. Observación esta última, que posiblemente sea función de la densidad celular, de la distribución espacial de la MSC y de los componentes de la matriz extracelular presente en el cultivo. Por ejemplo, la distribución tridimensional de la MSC en el cultivo es crítica para el desarrollo de cartilago, donde la suspensión de 100.000-200.000 MSC son centrifugadas y el precipitado (cultivo en micromasa) es luego expuesto a TGF- β y BMP (44, 45). La presencia de ambos factores y la proximidad celular en la micromasa inicia la cascada condrogénica que está integrada por moléculas extracelulares que desencadenan señales cortas como son la unión a membrana de las glicoproteínas Wnt, así como señales inducidas por moléculas de adhesión como N-caderina y conexina (40).

El compromiso y diferenciación de la MSC a un tipo celular maduro específico es un proceso controlado temporalmente y complejo que involucra la actividad de varios factores transcripcionales, citoquinas, factores de crecimiento y componentes de matriz extracelular. Durante la diferenciación aumenta la expresión de genes, y al analizar la expresión génica del osteocito, adipocito y condrocito, se encontró un incremento en la expresión de 914, 947 y 52 genes en cada uno de los procesos de diferenciación respectiva. Ocho genes son comunes a los tres linajes, 235 genes son comunes entre los procesos de adipogénesis y osteogénesis, 10 genes son comunes entre la adipogénesis y condrogénesis y 3 genes son comunes entre condrogénesis y osteogénesis (40). El hecho que el osteoblasto y el adipocito compartan este amplio número de genes durante la adquisición de su fenotipo hizo pensar que ambas progenies podrían derivar de un precursor común (40). Sin embargo; hay otros autores que avalan la teoría de un precursor común osteo-condrogénico (46).

Por otra parte, si bien hay diferentes experimentos que muestran la migración de la MSC de MO a distintos órganos dañados, poco son los estudios que observan el *engraftment* de las MSC transplantadas de una MO alogénica en la MO del huésped. Estudios de cariotipo realizados en cultivos largos de MO del aceptor, post-aceptación del trasplante simultáneo con CD34+ y MSC, muestran que las células estromales son del cariotipo del aceptor. Resultados que podrían estar relacionados con el hecho de que las MSC son células mitoticamente quiescentes con un período de vida larga, y al ser infundidas puedan sobrevivir por un período largo antes de instalarse en MO (47, 48).

Por otro lado, una célula madre es útil para ser transplantada cuando se cumplen ciertos criterios como son: diferenciarse a una célula específica, sobrevivir en el hospedante luego del trasplante, integrarse al microambiente del tejido específico a formar, cumplir una función adecuada en el huésped durante su vida, evitar la reacción del injerto contra el huésped y tener alto poder proliferativo y generar una suficiente cantidad del tejido dañado.

Las funciones de las MSC de MO puede resumirse como:

1- Regular la hematopoyesis: favorecer la auto-renovación, proliferación y diferenciación de la HSC y progenitores comprometidos a través de la formación de un estroma medular verdadero. Importancia en la recuperación post-quimio y/o radioterapia a altas dosis. Importante en la recuperación de plaquetas.

2- Plasticidad: la MSC de MO posee capacidad de auto-renovación, diferenciación y transdiferenciación dando origen a células de origen endodérmico, mesodérmico y neuroectodérmico. Reparación de tejidos.

3- Presenta baja inmunogenicidad pues tiene mínima expresión constitutiva de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) HLA de clase I y los antígenos del CMH-HLA de clase II son sólo inducibles con $\text{INF-}\gamma$. Se encontró también ausencia de moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2, CD40 y CD40 L (49, 50).

4- Función inmunosupresora, la cual favorece la aceptación de diferentes trasplantes de órganos, disminuyendo la reacción de injerto contra huésped y la sintomatología de las enfermedades autoinmunes. La MSC disminuye en la célula dendrítica (DC1) la producción de $\text{TNF-}\alpha$ y estimula en la DC2 la liberación de IL-10 (51). Además, inhibe en los linfocitos (L) T colaboradores de tipo TH1 y en las NK la liberación de $\text{INF-}\gamma$, así como también disminuye en los LTH1 la producción de $\text{TNF-}\alpha$ e induce en los linfocitos TH2 la liberación de IL-4 (51). La IL-6 y el VEGF liberados por las MSC median el efecto inhibitorio de la proliferación del LT (CD4 y CD8 positivos) (52, 53). Las MSC disminuyen la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD40 y CD86 en las células DCs maduras (52) e inhiben la diferenciación dendrítica de los monocitos (54, 55).

La capacidad de inducir inmunosupresión le permite a la MSC ser utilizada para una amplia variedad de terapias génicas (transfectada con el gen del factor VIII y IX, interferón γ , etc.) (51).

Otros autores (56) han encontrado que la MSC de MO inhibe *in vitro* la proliferación de los linfocitos B de sangre periférica a través de su arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular. Más aún, se observó

que las MSC disminuyen la expresión de receptores de quemoquinas en los LB, lo que sugiere una disminución de la capacidad de migración de estas células al sitio de inflamación (56).

5- Función inmuno-estimulante: existen evidencias que un bajo número de MSC induce la respuesta inmune, mientras que un exceso de MSC tienen efecto inhibitorio (57). Por ejemplo su efecto estimulante se evidenció en el aumento de producción de IgG y de INF γ (58).

Por último, a continuación se resumen el uso potencial de la MSC humana: recuperación del proceso hematopoyético, disfunción hepática, desórdenes autoinmunes (ejemplo, artritis reumatoidea), desórdenes del cartílago (osteoartritis), daños óseos (osteogénesis imperfecta, osteoporosis y metástasis), revertir diabetes tipo I, reparación de corazón, cáncer, acelerar la osificación en implantes dentales, Parkinson, Alzheimer, injuria de la médula espinal y quemaduras.

Un gran número de preguntas relacionadas con la biología de la MSC quedan por resolver. Éstas están relacionadas con su sobrevivencia, su capacidad de *homing* post-transplante, la relación entre su fenotipo inmune y su función como tal, su forma de administración sistémica o local y si sus propiedades de auto-renovación, diferenciación y transdiferenciación se mantienen post-transplante. Por lo tanto, de las preguntas expuestas surge la necesidad de continuar avanzando en los conocimientos de la biología de la MSC para acortar la distancia entre la esperanza de su potencial uso en la clínica y su real aplicación terapéutica.

Referencias:

- 1- Wells JM, Melton DA. Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 393-410, 1999.
- 2- Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cell. *Cell* 116: 639-648, 2004.
- 3- La Russa VF, Schwarzenberger P, Miller A, et al. Marrow stem cells, mesenchymal progenitors cells, and stromal progeny. *Cancer Inves.* 20: 110-123, 2002.
- 4- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function. *Cell* 105: 829-841, 2001.
- 5- Alison MR, Poulson R, Forbes S, et al. An introduction to stem cell. *J Pathol* 197: 419-423, 2002.
- 6- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113: 1161-1166, 2000.

- 7- Korblyng M, Estrov Z. Adult stem cells for Tissue Repair-A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349: 570-582, 2003.
- 8- Bishop AE, Buttery LDK, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol* 197: 424-429, 2002.
- 9- Drukker M, Katz G, Urbach A, et al. Characterization of expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 9864-9869, 2002.
- 10- Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Auto-crine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells* 19: 99-107, 2002
- 11- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in-vitro. *J Cell Physiol* 91: 335-344, 1978.
- 12- Rougier F, Dupuis F, Denizot Y. Human bone marrow fibroblasts-an overview of their characterization, proliferation and inflammatory mediator production. *Hematol Cell Ther* 38: 241-246, 1996.
- 13- Yamada M, Suzu S, Tanaka-Douzono M, et al. Effect of cytokines on the proliferation/ differentiation of stroma-initiating cells. *J Cell Physiol* 184: 351-355, 2000.
- 14- Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury Int J Care* 36 S: 8-12, 2005.
- 15- Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 13: 436-448, 2004.
- 16- Zipori D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis* 33: 211-215, 2004.
- 17- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49, 2002.
- 18- Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 56: 289-301, 1980
- 19- Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, et al. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med*. 10: 165-181,1999.
- 20- Castro-Malaspina H. Myelofibrosis and the biology of connective tissue. *Progress in clinical and Biological Research* vol 154. Berck PD, Castro Malaspina H, Wasserman LR Editors. Alan R. Liss Inc, New York; 1984.
- 21- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8: 301-316, 2004.
- 22- Bianco P, Robey PG. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105: 1663-1668, 2000.
- 23- Docheva D, Popov C, Mutschler W, et al. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med* 11: 21-38, 2007.
- 24- Jackson L, Jones DR, Scotting P et al. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 53: 121-127, 2007.

- 25- Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 110: 3438-3446, 2007.
- 26- Dexter TM, Wright EG, Krizsa F, et al. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine* 27: 344-349, 1977.
- 27- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells and stromal cells. *J Cell Physiol* 176: 186-192, 1998.
- 28- Friedenstein AJ. Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium. *Acta Anat (Basel)* 45: 31-59, 1961.
- 29- Boiret N, Rapatel Ch, Veyrat-Masson R, et al. Characterization of non-expanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol* 33: 219-225, 2005.
- 30- Barry F, Boynton R, Murphy M, et al. The SH3 and SH4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 519-524, 2001.
- 31- Wang R, Stromer MH, Huiatt TW. Integrin expression in developing smooth muscle cells. *J Histochem Cytochem* 46: 119-126, 1998.
- 32- Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plas Surg* 21: 429-435, 1994.
- 33- Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and Hematopoietic stem cells transplantation. *Ann NY Acad Sci* 996: 235-244, 2003.
- 34- Galotto M, Berisso G, Delfino L, et al. Stromal damage as consequence of high dose chemo-radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 27: 1460-1466, 1999.
- 35- Compston JE. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* 173: 387-394, 2002.
- 36- Talchman RS, Emerson S. The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells* 16: 7-15, 1998.
- 37- Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 4: 92-96, 2003.
- 38- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65: 3035-3039, 2005.
- 39- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 895-902, 2003.
- 40- Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironment "Niches" in culture: A two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci STKE* 294: pe 37, 2005.
- 41- Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL, et al. One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11917-11923, 2003.
- 42- Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 306: 330-335, 2005.

- 43- Ng F, Boucher S, Koh S, et al. PDGF, TGF-B and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. *Blood* 112: 295-307, 2008.
- 44- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4: 415-428, 1998.
- 45- Tuli R, Tuli S, Nandi S, et al. TGF-beta mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem* 278: 41227-41236, 2003.
- 46- Muraglia A, Corsi A, Riminucci M, et al. Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells. *J Cell Science* 116: 2949-2955, 2003.
- 47- Simmons PJ, Przepiorka ED, Tomas B, et al. Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature* 328: 429-432, 1987.
- 48- Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, et al. Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Hematol* 84: 722-727, 2005.
- 49- Patel SA, Sherman L, Munoz J, et al. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp* 56: 1-8, 2008.
- 50- Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 11: 3499-3506, 2007.
- 51- Aggarwal S and Pitterger M. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune responses. *Blood* 105: 1815-1822, 2005.
- 52- Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an IL-6 dependent mechanism. *Stem cells* 25: 2025-2032, 2007.
- 53- Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (IL-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 60: 307-315, 2004.
- 54- Jiang X, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105: 4120-4126, 2005.
- 55- Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, et al. Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD 83 mRNA. *J Exp Med* 191: 1581-1590, 2000.
- 56- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B cell functions. *Blood* 107: 367-372, 2006.
- 57- LeBlanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulated mixed lymphocyte cultures and mitogenic re-

sponses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 57:11-20, 2003.

- 58-** Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B et al. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* 65: 336-343, 2007.