



*Revista Médica de la
Universidad Veracruzana*

ISSN: 1870 3267

Investigación, Docencia y Servicio

Instituto de Ciencias de la Salud
Facultad de Medicina Xalapa
Hospital Escuela

Vol. 15 No. 1 Enero - Junio 2015



Revista Médica de la Universidad Veracruzana

Director

Carlos Blázquez Domínguez - Hospital Escuela

Editor

Patricia Pavón León - Instituto de Ciencias de la Salud

Editores Asociados

Rafael Velasco Fernández

Carlos M. Contreras Pérez

Lilia Irene Durán González

Consejo Editorial

Patricia Pavón León - Instituto de Ciencias de la Salud

Alberto Navarrete Munguía - Fac. de Medicina-Xalapa

Director Fundador

José Arenas Benhumea

Indizada:

- Imbiomed
- Latindex
- Medigraphic

Diseño interior y formación

Víctor Olivares García - Instituto de Ciencias de la Salud

Diseño Portada

Gabriela Blázquez Bello

Comité Editorial

Instituto de Ciencias de la Salud

Elisa H. Tamariz Domínguez

María Gabriela Nachón García

María del Carmen Gogeoascoechea Trejo

María Sobeida Leticia Blázquez Morales

Pedro Guillermo Coronel Brizio

Víctor Landa Ortiz

Facultad de Medicina-Xalapa

Ángel Alberto Casillas Cruz

Armando Méndez Pérez

Lorena de los Ángeles Mendoza Camacho

Pedro Chavarría Xicoténcatl

Francisco Malpica Ramón

Saturnino Navarro Ramírez

Hospital Escuela

Carlos Alejandro Galván Peña

Raúl Martínez Campos

Cynthia Elizabeth Díaz Marte

Cirenia Hernández Trejo

Omar Lagunes Merino

John O. Fleming - Inatnacional Universidad de Wisconsin, U.S.A

Universidad Veracruzana

Rectora

Sara Ladrón de Guevara

Secretaría Académica

Leticia Rodríguez Audirac

Secretaría de Administración y Finanzas

Clementina Guerrero García

Directora General de Investigaciones

Carmen Blázquez Domínguez



Revista Médica de la Universidad Veracruzana

Enero - Junio 2015

Contenido

> ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 6** Cultivos clonogénicos: historia y su uso actual como control de calidad pre-trasplante
Alcántara Luz, Bonilla-Cisneros Carlos, Luna Fernando.
- 13** Células Troncales, Nicho y Biomateriales
Citlalli Regalado Santiago, Elisa Tamariz.
- 20** El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje
Juan David Olivares Hernández, Enrique Juárez Aguilar, Fabio García García.
- 29** Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función
Marilú Domínguez Pantoja, Héctor Romero-Ramirez, Juan Carlos Rodríguez Alba.
- 38** Células troncales mesenquimales: biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas
Marta Elena Castro Manreza, Juan José Montesinos Montesinos.
- 45** Células troncales provenientes de sangre de cordón umbilical: de la investigación a la aplicación clínica
- 53** > COMUNICACIÓN CIENTÍFICA



Cultivos clonogénicos: historia y su uso actual como control de calidad pre-trasplante

Clonogenic Assays: As a quality control for pre-transplant onco-hematological diseases

Alcántara Luz¹, Bonilla-Cisneros Carlos², Luna Fernando³

Recibido: 26-01-2015 Aceptado: 15-04-2015

RESUMEN

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas se utiliza actualmente para el tratamiento de enfermedades onco-hematológicas como leucemias y linfomas. Una técnica utilizada para evaluar la capacidad de proliferación in vitro de las células progenitoras hematopoyéticas colectadas en muestra de sangre periférica, sangre periférica movilizada, médula ósea, y sangre de cordón umbilical es el cultivo clonogénico, en el cuál se forman colonias de células de granulocitos-eritroides-macrófagos-megacariocitos (UFC-GEMM), unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (UFC-GM), unidades formadoras de eritroides (UFC-E) en un medio de metilcelulosa. El objetivo de este artículo es dar una breve descripción histórica de los cultivos clonogénicos, así como resaltar la importancia de su utilización en el control pre-trasplante para enfermedades onco-hematológicas; esto es utilizado como un medio de calidad y seguridad para el paciente trasplantado.

Palabras clave: Células Progenitoras Hematopoyéticas, CPH; Unidades Formadoras de Colonias, UFC; Cultivos Clonogénicos, CC.

ABSTRACT

The hematopoietic stem cell transplantation is currently used for the treatment of onco-hematological diseases. One technique used to evaluate the ability of in vitro proliferation of hematopoietic progenitor cells in a sample collected from peripheral blood, mobilized peripheral blood, bone marrow, and umbilical cord blood is the clonogenic culture, in which cells form colonies of granulocytes -erythroid-macrophage-megakaryocyte (CFU-GEMM), colony forming units granulocyte-macrophage (CFU-GM), erythroid forming units (CFU-E) in a methylcellulose medium. The aim of this article is to give a brief historical description of clonogenic assays and highlight the importance of their use in controlling pre transplant in onco-hematological diseases as a means of quality and safety for the transplant patient.

Keywords: Cells progenitor hematopoietic, CPH; units forming colonies, UFC; Clonogenic assays, CA.

¹ Aplicaciones en Terapia Celular, SA de CV. Calle Santa Barbara 9C, Jardines Santa Rosa. Puebla, Pue. luzalcantara@gmail.com

² Laboratorio de Histocompatibilidad y Cultivos Clonogénicos. Banco de Sangre de Cordón Umbilical. Departamento de Investigación. Centro Nacional de Transfusión Sanguínea, Secretaría Salud.

³ Área de Cultivo y Criopreservación. Banco de células de Sangre de Cordón Umbilical Banco Central de Sangre. Centro Médico Nacional "La Raza". Laboratorio de Hematopoyesis Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.

Correspondencia:

Alcántara Luz
Aplicaciones en Terapia Celular, SA de CV.
Calle Santa Barbara 9C, Jardines Santa Rosa. Puebla, Pue.
luzalcantara@gmail.com

Introducción

El creciente éxito del trasplante hematopoyético, ha constituido durante más de medio siglo el paradigma de la existencia de células troncales y de células progenitoras adultas. Hasta hace poco más de una década, hablar de células troncales no embrionarias era referirse casi inequívocamente a la médula ósea o a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH's), ya que fueron éstas las primeras en conocerse y en ser aplicadas al tratamiento de enfermedades humanas¹. El objetivo de este artículo es dar una breve descripción histórica de los cultivos clonogénicos, así como resaltar la importancia de su utilización en el control pre-trasplante para enfermedades onco-hematológicas. El cultivo clonogénico actualmente es utilizado como un medio de control de calidad y seguridad para beneficio del paciente trasplantado, sin embargo aún no se ha podido establecer su estandarización entre laboratorios en nuestro país, por lo que sería importante lograr una unificación de criterios en los laboratorios que realizan este ensayo².

Hoy en día se conoce bien la existencia de las células primitivas llamadas troncales (stem cell) y sus descendientes menos primitivos llamados progenitores³. En este artículo nos referiremos únicamente a las células progenitoras hematopoyéticas y a su potencial de proliferación celular.

El tejido hematopoyético es líquido y trasplantable, se puede cultivar y manipular *ex vivo*, las CPH's se han convertido en una herramienta insustituible para terapias hematopoyéticas celulares y algunas aplicaciones en medicina regenerativa⁴.

Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH's)

La hematopoyesis es un proceso que se origina en la médula ósea y es el responsable de la fabricación o producción continua de células sanguíneas; esto ayuda a mantener una concentración constante y normal de estas células a lo largo de toda la vida de un individuo e indirectamente lleva implícita la noción de CPH's⁵. La hematopoyesis humana tiene una organización jerárquica, que está esquematizada en la **Figura 1**⁶. Brevemente, durante la maduración las células sanguíneas atraviesan por estadios intermedios de diferenciación que generan progenitores multipotenciales y diferenciados a linajes específicos; y las cantidades producidas diariamente mantienen la homeostasis en los individuos (**Tabla I**)⁶.

Los ensayos *in vitro* se han utilizado para monitorear las propiedades de crecimiento de las células progenitoras, en el caso de las hematopoyéticas, se han observado linajes multipotenciales (eritrocitos, monocitos/macrófagos y plaquetas), dependiendo del tipo de cultivo celular. Estas células sanguíneas se producen en la médula ósea a la misma velocidad en que se destruyen (principalmente en el bazo); ejemplo, si se tiene en cuenta que un ratón normal tiene unas 5,000 CPH's,

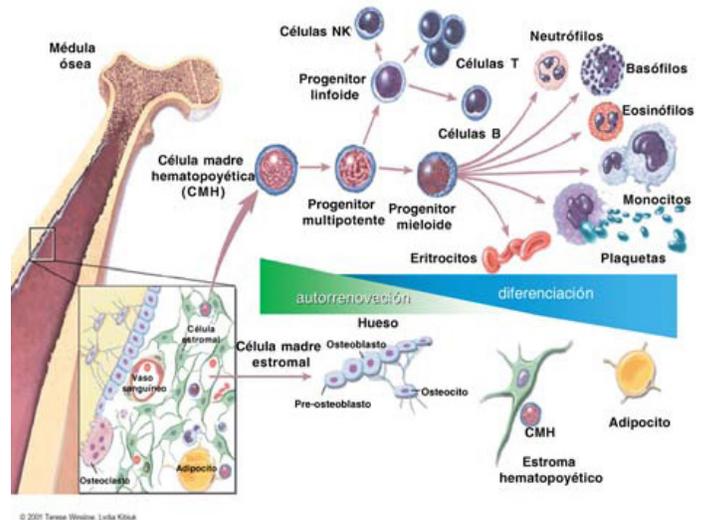


Figura 1. Esquema simplificado de la hematopoyesis. Una rara población de CPH's genera de manera continua y regulada una progenie de células maduras, que pasan a la circulación sanguínea. La multipotencialidad se va perdiendo a medida que las células se van diferenciando en los distintos linajes. La médula ósea también alberga otros tipos de progenitores, como los mesenquimales y los endoteliales. (Tomado de <http://stemcells.nih.gov> 6, modificado por la Dra. H. Eixarch).

Tabla I. Producción diaria estimada y valores normales de los principales tipos de células sanguíneas. Las cifras son aproximadas y están calculadas a partir de las medias para un adulto humano varón de 70 kilogramos de peso (5 L de sangre). No se

Tipo celular	Vida media	Valores normales	Cantidad total en L de sangre	Producción diaria
Hematíes	120 días	4.5 x 10 ⁶	22.5 x 10 ¹²	1,8 x 10 ¹¹
Granulocitos	8-10 horas	7.5 x 10 ³	37,5 x 10 ⁹	9 x 10 ¹⁰
Plaquetas	7-10 días	3 x 10 ⁵	15 x 10 ¹¹	2,1 x 10 ¹¹

incluye la producción de otros tipos celulares minoritarios como monocitos o linfocitos. La producción de los tres tipos celulares indicados supone generar aproximadamente 5 x 10¹¹ células cada día. Tampoco se tiene en cuenta posibles situaciones patológicas o de estrés, en las que esta producción basal puede estar aumentada⁶.

y cuando se analiza una preparación en fresco sólo están presentes entre 1 y 3 % de éstas células, y este 3% se encuentran en una fase activa del ciclo celular, se puede comprobar que la hematopoyesis es un proceso que se produce de una forma relativamente oligoclonal.

Por otra parte, la producción debe estar finamente regulada, ya que las necesidades de cada tipo celular pueden variar a cada momento. Al ocurrir alteraciones en algunos de los compartimientos celulares del sistema hematopoyético, sobre todo en los más primitivos, la producción de células sanguíneas puede verse modificada, de manera que los niveles de células circulantes sean abatidos drásticamente o incrementados muy por encima de lo normal; cualquiera de estas condiciones puede conducir a estados fisiológicos muy delicados, e incluso, a la muerte del individuo³.

Esta regulación depende de factores exógenos,

que incluyen mediadores solubles (factores de crecimiento hematopoyéticos, citocinas, factores inhibidores, etc.), que son liberados de forma endocrina, paracrina o por contacto directo entre célula-célula que tendrían lugar en el nicho hematopoyético, así como de sustancias neuroendocrinas liberadas por las terminaciones nerviosas que inervan la médula ósea, y también de factores intrínsecos de las propias CPH's, como la mayor o menor expresión de determinados factores de transcripción (PU-1, GATA-1, GATA-2 o SCL/TAL-1) o de modificaciones epigenéticas⁵.

Aspectos históricos relacionados con la creación de los cultivos clonogénicos

Los orígenes de esta metodología, tienen que ver con la importancia que se le ha otorgado a la sangre desde los tiempos antiguos, en la conservación de la salud, en la percepción de enfermedades y con la subsecuente necesidad de conocer su fisiología y mecanismos de producción. Varios sucesos convergieron en este sentido, en donde el bazo jugó un papel central⁷.

Las primeras descripciones celulares de la sangre, se realizaron entre los años 1658 y 1674⁸. Las transfusiones experimentales entre animales datan del año 1665⁹, entre humanos y animales de 1667¹⁰ y entre humanos de 1795 a 1818¹¹. A pesar del conocimiento que se generó a lo largo de estos años, los resultados provocaron su prohibición en Europa, lo que ocasiono un gran hueco histórico en el estudio de la sangre¹².

Los antecedentes del empleo del bazo para curar enfermedades hematológicas, se describen en los trabajos de Brown-Séquard a fines del siglo XIX; él planteó la posibilidad de reconstituir la producción de células sanguíneas en caso de anemias, administrando células del bazo crudo o cocido de animales¹³.

El punto histórico clave y relevante del papel que ocupó el estudio de órganos, como el bazo, en el desarrollo de técnicas en la investigación hematopoyética, parece surgir del uso de armas nucleares a fines de la segunda guerra mundial (1939-1945)¹⁴.

En la década de los 50's Jacobson y Leonard demostraron la sobrevivencia del 60% en ratones expuestos a dosis letales de radiaciones (rayos X) y la protección de estos por implantación de bazo en la cavidad intraperitoneal, o bien inyectando células hematopoyéticas de ratón sano inmediatamente después de la radiación. Lo evidente durante su disección, era la formación de nódulos en sus bazos, lo que más tarde explicarían otros autores^{15, 16, 17}.

A principios de los 60's, y retomando este modelo, dos investigadores canadienses James Till y Ernest McCulloch

describieron inicialmente estos nódulos como "áreas locales de regeneración"¹⁸. Interpretaciones posteriores de ellos mismos, especulaban que dichas áreas podían ser colonias generadas a partir de una sola célula; por lo cual podría considerarse a estos ensayos como un modelo *in vivo* para el estudio clonal de progenitores¹⁹. Andrew Becker en una publicación subsecuente demostró que la mayoría de las células de una colonia efectivamente parecían tener un ancestro común, mostrando este punto de vista de Till y McCulloch como razonable y estableciendo por tanto la validez del método, como ensayo para ver a una célula como el origen de una colonia¹⁹. De esta forma, surgió el primer ensayo de colonias *in vivo*.

Ensayos *in vivo* e *in vitro*

Después de surgir la primera evidencia de la existencia de progenitores hematopoyéticos de vida media larga en los años 60's, se desencadenaron otras series de evidencias que sustentaban la teoría de la expansión clonal *in vivo*. Tal es el caso de los estudios de Billingham y Medawar²⁰ quienes aunque no trabajaban con progenitoras hematopoyéticas descubrieron que al realizar prácticas de trasplante de injertos cutáneos entre hermanos idénticos y no idénticos, se sorprendieron al comprobar que en la mayoría de los casos los trasplantes entre no idénticos no eran rechazados. En su búsqueda de una explicación satisfactoria se encontraron con los estudios de Owen y demostraron, en una serie elegante de experimentos en modelo murino, que la creación de quimerismos hematopoyéticos mixtos en ratones neonatos inducía tolerancia específica frente a las células del donante^{21,22}, estos resultados fueron publicados en 1953 y le valieron a Peter Medawar el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1960.

Con todas las evidencias indirectas de esa época, a partir de los años 60's, se inició la búsqueda prospectiva de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH's); y en 1961, Till y McCulloch¹⁸, describieron un método para detectar y contar células progenitoras del sistema hematopoyético; este método se basó en la cualidad de las células progenitoras para multiplicarse y diferenciarse formando colonias. Así mismo también asignaron el nombre operacional denominado unidad formadora de colonias (UFC o CFU por sus siglas en inglés, units forming colonies), para evitar que se asignara una identidad a estas células todavía no caracterizadas; este término fue usado por otros investigadores para designar a diferentes tipos de progenitores descubiertos.

Becker, McCulloch y Till¹⁹ demostraron que las UFC eran en realidad clonales, es decir, que procedían de una única célula, y se producían colonias de tamaños y morfologías diversas, empezaron a utilizarse diferentes medios semisólidos. El paso siguiente fue, el traslado de este método *in vivo* a condiciones

in vitro lo cual no fue fácil ya que el sustrato pasaba a segundo término, si no se utilizaban los estimulantes apropiados.

El judío Leo Sachs, investigó desde 1961 agentes estimulantes del crecimiento de granulocitos y mastocitos en medio líquido sustentado por células de bazo^{22, 23}. Basándose en los hallazgos en bazo, publicó junto con Pluznik en 1965 un trabajo en el que demostraba que células hematopoyéticas normales de ratón pueden ser clonadas en agar suave y que la formación de estos clones requería de inductores secretados por las células de las capas de sostén, las cuales se habían dejado crecer bajo el agar (feeders)²⁴. Sus hallazgos mostraron la posibilidad de obtener clones celulares y el análisis de su diferenciación clonal normal en agar suave, y demostraron que su formación requiere de sustancias inductoras específicas producidas por tipos celulares diferentes cultivados bajo el agar. Con base en estos reportes, se comenzaron a realizarse estos procedimientos con células hematopoyéticas.

Cada uno de estos tipos de clones se llegó a identificar como un tipo de progenitor. Así, se describieron las UFC-GM (unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos), las UFC-E (unidades formadoras de colonias de eritrocitos), las UFC-Meg (unidades formadoras de colonias de megacariocitos) y las UFC-Mix (unidades formadoras de colonias mixtas). El último paso fue conocer si las células conservaban el mismo comportamiento en un nuevo soporte hecho a base de metilcelulosa²⁵, el cual es un derivado sintético de la celulosa vegetal que ya se había usado muchos años antes²⁶ y se le fue incorporando a este tipo de cultivos por sus mejores cualidades técnicas, por varios autores a mediados de los 60's^{27, 28}.

Hallazgos de Pike y Robinson²⁹ demostraron que el suministro de asparagina en el medio de cultivo era necesario. Un aminoácido no esencial considerado hasta ese momento en cultivos de células normales, se convirtió en un requerimiento para el desarrollo de colonias de precursores progenitores en cultivo. Otro hallazgo, fue la observación de mayor estímulo en sustratos de medio semisólido, tal medio condicionado fue reportado por Iscove en 1971, y se convirtió en estándar constituyente del cultivo de progenitores^{29, 30}.

Definición de cultivo clonogénico y jerarquía de progenitores hematopoyéticos

Hoy en día podemos definir esta metodología como un ensayo de cuantificación de funcionalidad *in vitro* de los progenitores hematopoyéticos (CD34+), empleando un medio de metilcelulosa que promueve la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas de estirpe granulo/monocítica y eritrocítica, más adelante se describirán las características fenotípicas de las células.

Las células hematopoyéticas son una demostración de

la existencia de una jerarquía de progenitores con diferentes potencialidades y de la naturaleza clonal de la hematopoyesis (Figura 2)³⁵.

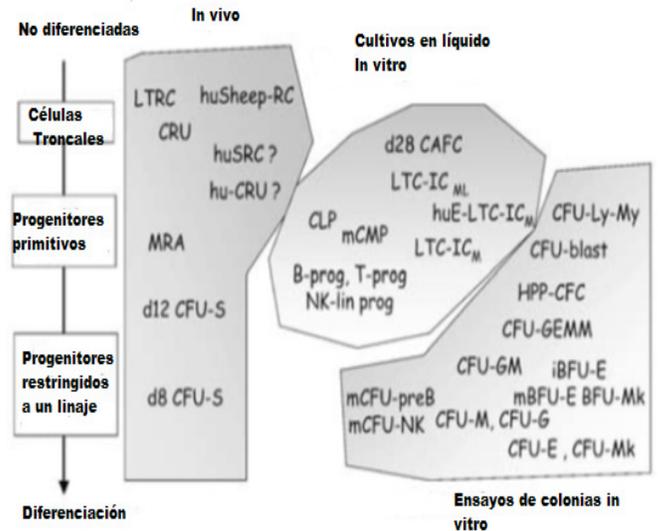


Figura 2. Varios tipos de células troncales y progenitoras hematopoyéticas se han identificado en los ensayos *in vitro* e *in vivo*. En el eje vertical se señala su estado de maduración, hu, denota células que no se ha demostrado el origen y m, significa que se ha descrito solo para murinos. Tomado y modificado de Coulombel L (2004). Para mayores referencias consultar³⁶.

Los ensayos clonogénicos, se utilizan en los bancos de células progenitoras y en investigación para evaluar la calidad de un producto celular (muestras de sangre de cordón umbilical o médula ósea congelada), proporcionan una información funcional de progenitores más diferenciados formando unidades.

Otros ensayos clonogénicos que permiten analizar progenitores más inmaduros que las UFC son el LTC-IC (*long-term culture initiating cell*)³² y los CAFC (*cobblestone area forming cell*)^{33,34}, o células formadoras de áreas en empedrado, por la disposición que adoptan las células de la colonia, que recuerda a la de los adoquines de las calles antiguas. En ambos ensayos se emplean cultivos a largo plazo, y requieren un soporte estromal.

Sin embargo, hasta el momento ningún ensayo *in vitro* permite evaluar rigurosamente la funcionalidad de las CPH's, los únicos que lo hacen son los que atienden a la propia definición de estas células, es decir, que demuestran su capacidad de repoblación *in vivo* y de diferenciación hacia los principales linajes hematopoyéticos, y a largo plazo (un mínimo de 4 meses en el ratón y varios años en un humano)³¹.

Por otra parte, los ensayos de repoblación *in vivo* también tienen sus limitaciones, pues una vez que se documenta que la repoblación se ha producido, las CPH's que la originaron desaparecen. Además, en los ensayos de repoblación *in vivo* hay que tener en cuenta que las células que se trasplantan, tienen que

llegar a alcanzar los tejidos hematopoyéticos y anidar (*homing*) en los nichos adecuados, este proceso de homing puede ser un factor crítico cuando se trasplantan números muy reducidos de células o una sola célula³². Una solución a estos problemas, son los ensayos de repoblación competitiva; en ellos, una población de células «problema» es trasplantada simultáneamente con otra población «control», de esta manera, una población puede ser cuantificada y diferenciada de la otra en las muestras de tejidos hematopoyéticos de los animales receptores mediante algún marcador fenotípico (CD34+, CD38 low, CD45 dim, CD90)³³. Así, se definieron las unidades de repoblación competitiva (CRU siglas en inglés), lo que equivale a una célula única que es capaz de producir linaje mieloide y linfóide a largo plazo cuando es trasplantada a un animal irradiado letalmente.

Con todo, estas exigencias de los ensayos de repoblación *in vivo* imponen enormes restricciones y dificultades para el estudio de las CPH's, y ello ha impulsado la búsqueda de métodos alternativos que permitan identificar a las CPH's de una manera prospectiva.

Caracterización fenotípica de las CPH's

Tras los primeros intentos de enriquecimiento basados en el tamaño y la densidad celular, la aparición de anticuerpos policlonales o monoclonales frente a distintos marcadores inmunofenotípicos, acoplados a nuevos y mejores fluorocromos y los avances en la citometría de flujo, que permiten análisis multiparamétricos a tiempo real y la separación de poblaciones celulares con fenotipos cada vez más complejos, han revolucionado el conocimiento sobre la hematopoyesis.

En 1984, Kurt Civin³⁴ descubrió el antígeno My10 en la línea leucémica humana KG-1a. Este marcador, que posteriormente se denominó CD34, se expresaba en la membrana del 1-4% de las células nucleadas de la médula ósea humana y se comprobó que dicha población contenía la capacidad de repoblación hematopoyética, lo que indicaba que, al menos de forma mayoritaria, las CPH's humanas expresaban dicho marcador. De hecho, se ha utilizado la selección positiva de células CD34+ como un método para depleccionar o purgar *ex vivo* de células tumorales contaminantes en productos hematopoyéticos (médula ósea, productos de aféresis) autólogos antes de ser trasplantados, bien sea como único método de purga o en combinación con la selección negativa (por ejemplo, de células B en algunos linfomas). Posteriormente, se descubrió que la mayoría de los progenitores con capacidad de repoblación, además de ser CD34+, eran CD38-, lo que permitió enriquecerlos al menos en una orden de magnitud más. El fenotipo que define mejor a las CPH's humanas es Lin-CD34+ CD38-/low CD45RA- CD90 y fue descrito recientemente en la sangre de cordón umbilical^{35, 36}.

En el ratón, que es la especie en la que los distintos progenitores hematopoyéticos están mejor caracterizados, y a pesar de que muchos de los marcadores que los identifican se han conservado bien a lo largo de la evolución, las cosas son algo distintas; por ejemplo, en el ratón las CPH son CD34. Una característica que define a los progenitores inmaduros, es que no expresan ninguno de los marcadores específicos de los distintos linajes maduros como: CD3, CD5, CD7, CD4 o CD8 para células T; CD13, CD14, CD15, CD11b o Gr1 para células mieloides; B220, CD19, CD20, CD21 para células B, o el Ter-119 para células de la serie roja; es decir son Lin-.

La denominada depleción Lin- utiliza una mezcla de anticuerpos frente a estos marcadores y permite eliminar la inmensa mayoría de células maduras y de precursores diferenciados, enriqueciendo unas 20 veces en capacidad de repoblación en comparación con la médula ósea no fraccionada. Los marcadores c-Kit y Sca-1 suponen un paso más allá en la purificación de las CPH's murinas. Las células Lin- Sca-1+ c-kit+ o simplemente KLS están enriquecidas unas 1000 veces en capacidad de repoblación a largo plazo, en comparación con las de médula ósea no fraccionada. Aun así, sólo una de cada 10 células KLS es una CPH³⁶.

Importancia actual del potencial de proliferación celular

El uso de esta metodología *in vitro* ha llevado a la clonación y aislamiento de progenitores y de factores de crecimiento para la mayoría de las células hematopoyéticas, incluyendo diferentes tipos de linfocitos. Y ha ayudado a entender los controles que regulan el crecimiento y la diferenciación en la hematopoyesis y cómo estos controles están acoplados en el desarrollo normal y sus anormalidades en leucemia y otras enfermedades como anemia aplásica³⁷.

Así mismo, esta técnica es importante en la clínica ya que ha servido para garantizar a los centros de trasplantes, la calidad de las unidades de CPH's provenientes de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical³⁸ que serán transfundidas a los pacientes, además de conservar su viabilidad y la capacidad proliferativa para producir el injerto aun después de la descongelación. Se asegura que la capacidad de diferenciación de la célula troncal, o progenitores primitivos no se ha visto afectada, después de la criopreservación y descongelación. Es importante hacer notar, que la pérdida celular después de la congelación se estima entre un 16 a 20 % de las unidades y que los linajes de células primitivas son los más afectados, por lo que es importante realizar una criopreservación cuidadosa³⁸.

Los ensayos de UFC se evalúan *in situ* después de un período de incubación de 14 a 16 días y se puede reportar por separado cada colonia (UFC-E, UFC-GM, UFC-Meg, UFC-Mix); o

bien una eficiencia de clonogenicidad, llamada E-clone, que se refiere a las células CD34+ / UFC totales, multiplicadas por 100. De esta forma un E-clone mayor al 10% refleja un potencial de proliferación aceptable, o dicho en otras palabras, las células CPH's han conservado su capacidad de diferenciación. Es muy importante mencionar que el E-clone se basa exclusivamente para células CD34+, ya que existen células hematopoyéticas primitivas que son CD34- y también podría haber células CD34+ que no son hematopoyéticas en la unidad.

La Tabla 2, enumera las frecuencias con las que se encuentran las UFC de los progenitores hematopoyéticos en condiciones normales³⁵. Sin embargo, como puede observarse hay diferencias en el número de unidades formadoras de colonias resultantes, aunque sean condiciones normales pero diferentes recursos de obtención de las células cuantificables. Estas mismas diferencias se han observado en productos de leucoféresis de algunos centros de trasplantes. Por ejemplo analizando, el cociente de las células UFC/CD34, da como resultado, para los injertos entre 1/6.2 a 1/6.6 para injertos con <2% células CD34+, vs. 1/10.2 para injertos que contienen ≥2% células CD34+. Por tal razón es de vital importancia reportar el cociente de UFC/CD34+, ya que existen variaciones dependiendo del tipo de patología: 1/9.3 para mieloma múltiple, 1/6.8 para enfermedad de Hodgkin's, 1/6.5 para linfoma no Hodgkin, y 1/4.5 para tumores sólidos³⁹.

Tabla II. Frecuencias de las UFC en los diferentes recursos terapéuticos.

*Las UFC fueron determinadas utilizando Methocult, Stem Cell Technologies. Los valores son expresados como la media ± 2 sd.³⁵

Recurso Terapéutico	Tipo de Células Progenitoras Hematopoyéticas			
	UFC- Eritrocitos	UFrojos	UF-Granulocitos/	UFC-Mix
Médula Ósea	31 (1-78)	115 (1-251)	100 (30-170)	5 (1-15)
Médula Ósea (células mononucleares)	188 (1-506)	175 (1-477)	408 (1-990)	10 (1-30)
Médula Ósea (CD34+)	30 (1-59)	34 (1-74)	54 (7-101)	2 (1-5)
Sangre de Cordón umbilical	9 (1-48)	104 (1-310)	115 (1-303)	25 (1-59)
Sangre Periférica (células mononucleares)	2 (1-10)	30 (1-62)	9 (1-18)	2 (1-5)
Sangre Periférica Mobilizada	8 (1-27)	121 (1-257)	111 (1-257)	23 (1-67)

Conclusiones

Podemos concluir que existe todo un desarrollo histórico para la creación de esta técnica pre-trasplante, por tal razón es importante su utilización como control de calidad en enfermedades onco-hematológicas y para la seguridad del

paciente trasplantado. Así mismo la estandarización de esta metodología, en las unidades de salud en México contribuirá a homogenizar los datos de la calidad de las unidades trasplantadas y asegurar el éxito de esta terapia.

Bibliografía

1. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *New Eng. J. Med.* 1989; 1174-8.
2. Lumley M. A, Burton A, Billingham LJ, McDonald DF, Czarnecka HM, Milligan DW. Quality assurance of CFU-GM assays: inter-laboratory variation despite standard reagents. *Eur J Haematol.* 1999 Jan;62(1):32-7.
3. Martínez-Jaramillo G, Vela-Ojeda J, Sánchez-Valle E, Montesinos JJ, Mayani H. In vitro functional alterations in the hematopoietic system of adult patients with acute lymphoblastic leukemia. 2007:83-9.
4. Verena Reimann, Ursula Creutzig, Gesine Kögler. Stem Cells Derived From Cord Blood in Transplantation and Regenerative Medicine. *Dtsch Arztebl Int.* 2009:831-836.
5. Bonifer C. Epigenetic plasticity of hematopoietic cells. *Cell Cycle.* 2005: 211-214.
6. <http://stemcells.nih.gov>
7. Boylan M. Galen: On blood, the pulse and the arteries. *J Hist Biol;* 2007:207-30.
8. Hajdu SI. A note from history: The first two laboratory scientists. *Ann Clin Lab Sci* 2003; (33) 438-40.
9. Keynes G. Blood transfusion. London: John Write and Sons. 2010:1-19.
10. Starr D. Blood: An epic history of medicine and commerce. New York: Perennial (HarperCollins), 2003: 31-52.
11. Doyle k. Blood component preservation a storage. In: Rudmann Sv. Ed Textbook of blood banking and transfusion medicine. Philadelphia. Elsevier Saunders, 2005:258-80.
12. Ficarra B J. The evolution of blood transfusion. *Ann Med Hist.* 1942:305-6.
13. Ernest Beutler M.D., Marshall A. Lichtman M.D., Barry S. Coller M.D., Thomas J. Kipps M.D. Ph.D., Uri Seligsohn M.D. (Editor) Structure of the marrow and the hematopoietic environment. McGraw-Hill Professional. Williams Hematology 6th edition. November 28, 2000.
14. Borell M. "Brown-Séquard's organotherapy and its appearance in America at the end of the nineteenth century". *Bull Hist Med.*1976: 309-320.
15. Martín Gilbert. Segunda Guerra Mundial 1939-1945, La V. i. Editorial Edaf. 2005. 696pp. ISBN: 8497342984
16. Leonard J. Cole, Maurice C. Fishler, and Victor P. Bond. Subcellular fractionation of mouse spleen radiation protection activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1953: 759-772.
17. Jacobson, L. O., Simmons, E. J., Marks, E. K., and Eldredge, J. H., Recovery from irradiation injure. *Science* 1951: 510-511.
18. Till E, McCulloch JA. Direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Research.*1961:213-222.
19. Becker A. J, McCulloch E A & Till J E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963:452-4.
20. Bellingham RE, Brent L, and Medawar PB. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature.* 1963; 172, 603-606.
21. Ono S J J. The birth of transplantation immunology: the Billingham-Medawar experiments at Birmingham University and University College London. 1951. *Exp Biol* 2004: 4013-4014.
22. Ginsburg H, Sachs L. The long term cultivation in tissue culture of leukemic cells from mouse leukemia induced by Moloney virus or by

- x rays. *J Nat. Cancer Inst.* 1961;53-71.
23. Ginsburg H, Sachs L. Formation of pure suspensions of mast cells in tissue culture by differentiation of lymphoid cells from the mouse thymus. *J Nat Cancer Inst.* 1963; 31:1-40
 24. Pluznik DH, Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol.* 1965; 66:319-24.
 25. Hotchin J. E. Use of methyl cellulose gel as a substitute for agar in tissue-culture overlays. *Nature* 175; 1955: 352
 26. Ichikawa Y, Pluznik DH, Sachs L. In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proc Nat Acad Sci US.* 1966; 56:488-95
 27. Pluznik D H & Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *Cell. Comp. Physiol* 1965; 66:319-24. [Citation Classic. *Current Contents/Life Sciences* 1983; 39:18.
 28. Iscove N, Senn J, Till J, McCulloch E. Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture: effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood* 1971; 37:1-5. Citation Classic. *Current Contents/Life Sciences.*1983; 23:151.
 29. Pike B L & Robinson W A. Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J. Cell. Physiol.* 1970; 76:77-84.
 30. Hoang T, Iscove N. N. & Odartchenko N. Agar extract induces release of Paran M, Sachs L, Barak Y, Resnitzky P. In vitro induction of granulocyte differentiation in hematopoietic cells from leukemic and non-leukemic patients. *Proc. Nat Acad Sci US.* 1970; 67:1542-9.
 31. Kinzfojl JM, Broxmeyer HE. Brief historical overview of hematology, cord blood, and links between the nervous and hematopoietic systems. In: Broxmeyer H. E, ed. *Cord Blood: Biology, Transplantation, Banking, and Regulation* Bethesda, MD Press, 2011; 1:1-16
 32. Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS *et al.* An *in vitro* limiting dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood.* 1989; 74, 2755-2763
 33. Majeti R, Park CY, and Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Stem Cell;* 2007; 1, 635-645.
 34. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. An hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984; (33):157-65.
 35. Human Colony-Forming Cell (CFC) Assays using Methocult®. Technical Manual. V. 3.1.0. 2009. Stem Cell Technologies®.
 36. Coulombel L. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene.* 2004; (23): 7210-22.
 37. Dobo I, Pineau D, Robillard N, Geneviève F, Piard N, Zandecki M, y Hermouet S. Standardization of the CFU-GM Assay: Advantages of Plating a Fixed Number of CD34⁺ Cells in Collagen Gels. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research.* 2003;12(5): 543-551.
 38. Kurita N, Frassoni F, Chiba S, Podestà M. Impact of length of cryopreservation and origin of cord blood units on hematologic recovery following cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Mar 23. doi: 10.1038/bmt.2015.56
 39. Jo-Anna Reems, Karen M. Hall, Luladay H. Gebru, Greta Taber, Ivan N. Rich. Development of a novel assay to evaluate the functional potential of umbilical cord blood progenitors. *Transfusion.* 2008; (48): 620-628.



Células Troncales, Nicho y Biomateriales

Citlalli Regalado Santiago, Elisa Tamariz.

Recibido: 26-01-2015 Aceptado: 06-04-2015

RESUMEN

Las células troncales (CT) se caracterizan por poseer un amplio potencial de diferenciación y de proliferación, y tienen un papel primordial en la homeostasis y regeneración tisular. Aunque son una prometedora fuente de células para terapias de sustitución celular y regeneración tras un daño o enfermedad; su uso es todavía restringido ya que hay que contemplar diversos factores como la supervivencia, la integración tisular, la diferenciación específica y la funcionalidad. Una parte determinante para llevarlas a la medicina regenerativa es comprender su biología y el nicho o microambiente en el que se encuentran in vivo. El nicho está constituido por células, proteínas y componentes de matriz extracelular que interactúan con las CT, y puede determinar el estado indiferenciado o la diferenciación hacia fenotipos específicos. En años recientes, el uso de modelos in vitro que simulan diversos componentes del nicho han permitido comenzar a comprender el papel de los factores que lo integran, e incluso diseñar modelos artificiales que recapitulen las condiciones de un microambiente. En ese sentido los biomateriales son una alternativa que permite incorporar diferentes características físicas y químicas que se ha observado modulan a las CT y favorecen su manipulación. En el presente trabajo se revisan algunas de las estrategias utilizadas para el diseño de biomateriales con el fin de mimetizar el microambiente de las CT y regular su biología, así como el impacto que a futuro pueden tener en terapias de regeneración tisular con CT.

Palabras claves: Células troncales, biomateriales, microambiente

ABSTRACT

Stem cells (SC) are characterized by their extensive potential of proliferation and differentiation, as well as their major role in homeostasis and tissue regeneration. In spite of SC are a promising source of cell replacement therapies and regeneration after injury or disease; its use is still limited because there are several issues that need to be taken into account, such as survival, tissue integration, specific differentiation and functionality. To consider them part of regenerative medicine it is imperative to understand their biology and niche or microenvironment found in vivo. The niche is constituted by cells, proteins and extracellular matrix which interact with the SC and may determine the undifferentiated or differentiation state into specific phenotypes. Furthermore, in recent years, the use of in vitro models that simulate various components of the niche have helped to begin to understand the role of factors that compose it, and even to design artificial models that recapitulate the conditions of a microenvironment. In that sense, biomaterials are an alternative to incorporate different physical and chemical properties that have been observed to modulate SC and to improve its manipulation. In this paper we review some of the strategies used for designing biomaterials in order to mimic the microenvironment of SC and to regulate their biology as well as the impact it may have in the future of tissue regeneration therapy with SC.

Keywords: stem cells, biomaterials, microenvironment.

Características de las células troncales

Las células troncales (CT) se caracterizan por poseer dos capacidades funcionales: 1) la auto-renovación de su población, que se refiere a la habilidad de las CT de dar lugar a una célula idéntica que mantiene las características troncales de la población, y 2) la potencialidad de generar diversos tipos celulares diferenciados y completamente funcionales, a partir de células hijas que pierden sus características troncales^{1,2,3}. Durante el desarrollo embrionario, y a medida que transcurre el tiempo de vida de un organismo adulto, la capacidad de auto-renovación y la potencialidad de diferenciación de las CT son diferentes. En ese sentido, si nos referimos a la ontogenia de la CT tenemos que el cigoto fertilizado es la CT totipotente que dará origen a un organismo completo y al trofoblasto (que derivará en la placenta)⁴; capacidad que se mantendrá solo hasta el estadio de división de 8 células de la mórula⁵. Subsecuentemente en el proceso de desarrollo se dará origen al blastocisto, conformado en su estructura interna por una población de células denominadas troncales embrionarias (CTE) con características pluripotentes, que generan las tres capas germinales embrionarias (mesodermo, ectodermo y endodermo), y por lo tanto son capaces de dar lugar a todas las células de un organismo completo, aunque a diferencia de la célula totipotencial no pueden formar el trofoblasto^{2,5,6,7}.

La transición de las CT pluripotentes hacia un estado multipotente se refleja en la subsecuente formación de las capas germinales del endodermo, mesodermo y ectodermo. De este modo, las CT multipotentes se caracterizan por generar tipos celulares procedentes de una única capa germinal embrionaria, es decir, el endodermo origina células que conforman órganos internos como el hígado, páncreas, pulmón e intestinos⁸; el mesodermo o capa germinal media es responsable en la generación del tejido hematopoyético, muscular y óseo, mientras que el ectodermo dará lugar a tejidos como el nervioso, la epidermis, la córnea y la glándula mamaria^{2,8}.

Posterior a la etapa de organogénesis y en la edad adulta, las CT multipotenciales se establecerán permanentemente en zonas específicas de los tejidos del organismo adulto, aunque en una proporción muy limitada (aproximadamente del 1 al 2% de la totalidad celular), y con una tasa de proliferación relativamente baja en condiciones fisiológicas, pero que en presencia de un estímulo pueden proliferar activamente⁹. Las CT pueden generar, por medio de la división asimétrica, células troncales multipotentes y células progenitoras o también conocidas como células de amplificación transitoria (CAT)^{2,3}. Esta última población se define por su capacidad para proliferar de manera controlada por un periodo limitado de tiempo antes de expresar un fenotipo diferenciado¹⁰. Entre las poblaciones troncales que se han descrito en el organismo

adulto, particularmente en médula ósea, se encuentran las CT hematopoyéticas que dan lugar a las células del linaje mieloide y linfóide, y las CT mesenquimales (CTM), cuya capacidad de diferenciación abarca múltiples linajes como el adipogénico, y el osteogénico, responsables de la diferenciación a células del tejido adiposo y del hueso respectivamente^{11}\Zhang, 2012 #2029}¹¹. Estudios recientes han encontrado que las CTM en condiciones *in vitro* tienen también la capacidad de diferenciarse hacia células que dan lugar al tejido hepático¹² e incluso al tejido neural¹³. Otra población de CT adultas que se han encontrado entre la lámina basal y el sarcolema de las fibras del músculo son las CT satélites, que en condiciones fisiológicas se mantienen como una población troncal quiescente, pero que en determinadas condiciones como el ejercicio físico, se activan dando lugar a los progenitores miogénicos que eventualmente se diferencian a nuevas fibras que integran el músculo^{14,15,16}. {11\, #2029}

Por otra parte, se ha descrito una población que tiene la propiedad de retener el marcaje con compuestos fluorescentes o radioactivos gracias a su baja frecuencia de división celular, y a la que se ha denominado LRC (labelling retaining cells), esta población se ha identificado como CT en diferentes tipos de epitelios^{9,17,18}. En el epitelio intestinal se ha descrito la presencia de LRC en la cripta intestinal¹⁹, en el epitelio corneal reside una población troncal en un área conocida como *limbus*, mientras que en la epidermis las CT residen en la zona interfolicular, en la base del folículo piloso y en las glándulas sebáceas; esto epitelios comparten la característica de tener una alta tasa de recambio celular^{17,20,21}. Otro de los órganos importantes donde radica una población de CT es el cerebro. En el sistema nervioso adulto, los precursores neurales, término que engloba a una población de CT y CAT, o también llamadas precursores neurales, están presentes en la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo, dos regiones importantes donde se lleva a cabo la formación de nuevas neuronas en un proceso conocido como neurogénesis²².

El balance entre el mantenimiento del estado indiferenciado y relativamente quiescente, y la activación de la proliferación y la diferenciación de las CT, son influenciados por diversos factores o estímulos presentes en regiones específicas que integran lo que ahora se reconoce como el microambiente o nicho de las CT, y que está presente tanto en el embrión como en el organismo adulto.

La importancia del nicho en la biología de las células troncales

La localización de las CT en los diferentes tejidos ha sido una tarea ardua, actualmente se reconoce que la zona donde se localizan conforma un microambiente con características celulares, químicas y físicas definidas, y que compone lo que se ha llamado nicho. El término "nicho" fue originalmente

acuñado por Schofield en 1978²³, para explicar cómo las células adyacentes a las CT hematopoyéticas podrían estar manteniendo la troncalidad, y una vez que éstas células abandonan el nicho entran en diferenciación a menos que se les provea de un ambiente similar. El término nicho ha sido en la actualidad expandido para incluir diferentes aspectos que rodean a las CT tales como componentes de matriz extracelular, factores de crecimiento, células inflamatorias, factores físicos como rigidez y topografía, o concentraciones de oxígeno²⁴. Tales componentes actúan como señales inductoras de mantenimiento del estado quiescente, de auto renovación, o de formación de células diferenciadas. Los nichos son altamente especializados para cada tejido, con una localización anatómica definida. La desregulación de las condiciones del nicho puede llevar a la desregulación de la homeostasis tisular y al desarrollo de estados patológicos como tumorigénesis o degeneración^{25,26}. El nicho contiene no solamente a las CT, sino a una gran variedad de células con funciones específicas, y son numerosas las evidencias que demuestran que la interacción entre las células del nicho y las CT modulan tanto la diferenciación como la troncalidad. Las características celulares de cada nicho varían según el tejido, en algunos casos está conformado por la progenie de las CT en vías de diferenciación como en las células epiteliales, y las células troncales neurales^{24,27}. En otros casos el nicho puede estar constituido por diversos tipos celulares como en la médula espinal, en donde se han identificado células de endotelio vascular, células perivasculares, osteoblastos, macrófagos y nervios simpáticos²⁸. El nicho de las CT puede a su vez estar dividido en regiones que se especializan en formar tipos celulares con características particulares²⁵, tal es el caso de la zona subventricular en el cerebro adulto, en donde ahora se sabe existe una regionalización que generan tipos neuronales específicos, que a su vez se incorporan a zonas particulares del bulbo olfatorio dependiendo de la zona subventricular de la que provengan; sin embargo aún está por descifrarse cuales características específicas determinan cada región dentro del nicho²².

La interacción con células del nicho puede ser por contacto directo célula-célula, o por estimulación paracrina mediante la secreción de factores que median la comunicación celular. Ejemplo de lo anterior es la interacción mediada por la molécula de adhesión E-selectin presente en células endoteliales en la médula espinal y que media la proliferación de las CT hematopoyéticas; se ha observado que el uso de agonistas de E-selectin inducen la quiescencia de las CT²⁹. Por otra parte existen una gran cantidad de factores secretados implicados en el mantenimiento y diferenciación de CT, entre los más caracterizados se encuentran las proteínas altamente conservadas Wnt y Sonic Hedgehog (Shh), involucradas en la

regulación de CT en diversos tejidos. Shh tiene un importante papel regulatorio en los nichos presentes en los folículos pilosos o las criptas del epitelio intestinal, donde es clara su distribución espacial y temporal restringida, regulando la presencia de CT en estos tejidos³⁰. Por otra parte se sabe que un gradiente de concentración de proteínas Wnt ejerce efectos diferenciales sobre CT hematopoyéticas, altas concentraciones inhiben su capacidad de autorenovación, y bajas concentraciones mantienen su fenotipo indiferenciado y de auto renovación³¹. En el caso del sistema nervioso central las proteínas Wnt desempeñan un importante papel en la regulación de la neurogénesis y la formación de nuevas neuronas a través de la activación transcripcional de genes como Neuro D1 en células progenitoras del hipocampo adulto³². Shh es un factor determinante en la formación del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario, y en la formación de neuronas tanto del cerebro anterior, neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, entre otras, mientras que en el adulto Shh también estimula la formación de nuevas neuronas en sitios neurogénicos como el hipocampo³². La matriz extracelular (ME) es también un factor determinante en el nicho de las CT, provee no solamente señalización bioquímica, sino también estructural y física. La interacción directa célula-ME mediada por receptores como las integrinas, participa en la señalización que regula auto renovación, proliferación, diferenciación y migración; por ejemplo en la piel en donde la expresión diferencial de las integrinas determina la presencia de las CT o de las CAT³³. En el caso del sistema nervioso central, se ha reportado que existen dominios denominados fractones en los que la ME forma un continuo con la membrana basal de los vasos sanguíneos, en estos nichos se expresa de manera abundante las proteínas de ME lamininas, sin embargo solamente las CAT o precursoras neurales, y no las CT quiescentes expresan las integrinas $\alpha 6 \beta 1$ que funcionan como receptores para lamininas; en procesos de neuroregeneración sin embargo, la expresión de $\beta 1$ es aumentada en las CT indicando una regulación fina de los receptores a componentes de ME dependiendo de las condiciones de quiescencia o proliferación³⁴.

Las macromoléculas que componen la ME también proveen de organización tridimensional al nicho, en el que factores de crecimiento y células tiene una distribución característica permitiendo la formación de gradientes de concentración de proteínas y la interacción entre poblaciones celulares específicas.

Un creciente cuerpo de evidencias ha mostrado por otra parte que las propiedades físicas de la ME tiene también efectos determinantes en la biología de las CT. En años recientes, estudios *in vitro* han encontrado que las propiedades físicas como la rigidez, la elasticidad y la nanotopografía ejercen un profundo efecto sobre la regulación de la biología de las

CT³⁵. Las propiedades físicas de la ME que conforma el nicho es "interpretada" por la maquinaria mecanosensora de las CT, repercutiendo en la regulación del citoesqueleto y los sitios de adhesión, y convergiendo en la regulación de la morfogénesis, proliferación, diferenciación, supervivencia³⁶, e incluso en la expresión génica³⁷.

Recapitulación del microambiente a través de biomateriales

Las evidencias experimentales que demuestran la influencia del microambiente sobre las CT han sido determinantes para enfatizar la necesidad de incorporar los factores que componen un nicho en el estudio y desarrollo de estrategias de regeneración mediante CT. Por lo anterior, uno de los campos con mayor interés es el de los biomateriales, ya que a través de ellos es posible incorporar uno o más factores que mimeticen el nicho.

Los biomateriales son componentes de origen natural o sintético que pueden adquirir diversas características que los hacen compatibles con las células y los tejidos, de manera que pueden funcionar como proveedores de sustrato, células o proteínas. Adicionalmente, los biomateriales pueden proveer señales químicas mediante el acoplamiento de proteínas bioactivas, o péptidos que facilitan la interacción celular; pero también se pueden manipular sus propiedades físicas como la rigidez y la topografía para estimular el mantenimiento del estado indiferenciado, la supervivencia o a la diferenciación de las CT. A continuación mencionaremos algunas de las estrategias y evidencias obtenidas referentes al uso de biomateriales para manipular y favorecer los procesos biológicos de las CT.

Biomateriales para la exposición a factores bioactivos

En la ME existen diversos componentes como los glucosaminoglicanos que tiene la capacidad de unirse a factores de crecimiento vía interacciones electroestáticas, esta característica les permite exponer los factores de crecimiento a las células y modular su concentración y actividad sobre las mismas³⁸.

Inspirados en la distribución de factores de crecimiento presentes en la ME, es posible diseñar materiales a los cuales se pueden acoplar moléculas bioactivas que se encuentren expuestas de manera específica dependiendo de las necesidades. Las proteínas bioactivas puede funcionar como un soporte trófico que mantiene la viabilidad celular, y que en el caso de células trasplantadas por ejemplo, favorece el número de células viables que a su vez se integran al tejido, o pueden también ser usadas para dirigir de manera específica la diferenciación *in situ* de CT³⁹.

El uso de biomateriales para favorecer la interacción de CT con proteínas o péptidos bioactivos tiene varias aproximaciones; generalmente los biomateriales son inertes

desde el punto de vista de las interacciones químicas que pueden establecer con las células; ya que esto les confiere una mayor compatibilidad⁴⁰, sin embargo los biomateriales pueden ser usados como vehículos de liberación de proteínas, o pueden ser utilizados como andamio para el crecimiento de las células, las cuales interactúan con las proteínas de interés conjugadas al biomaterial, ya sea en cultivos tridimensionales (3D), o en una conformación bidimensional (2D)⁴¹.

Un aspecto importante es considerar si las proteínas bioactivas son simplemente liberadas a partir del biomaterial que las contiene, o están covalentemente unidas a los materiales. Se ha encontrado que la interacción específica de CT neurales con el factor de crecimiento epidermal (EGF), unido de manera covalente a un sustrato, induce una mayor expansión selectiva de esta población, a diferencia de la interacción con el factor soluble en el medio de cultivo, además de contribuir a mantener el estado indiferenciado de la población⁴². La inmovilización del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en hidrogeles de agarosa por ejemplo, se ha probado que induce la diferenciación específica de células precursoras neurales a oligodendrocitos⁴³.

Una estrategia interesante es la reportada por Egawa y col. (2011) quienes usando una proteína quimérica realizada mediante la fusión por ingeniería genética del factor de crecimiento epidermal (EGF) y la proteína colágena, elaboraron hidrogeles de colágena conteniendo el factor de crecimiento activo, lo que favoreció una mayor la proliferación y supervivencia de CT neurales⁴⁴. Por otra parte, el implante de geles de ácido hialurónico funcionalizados con las proteínas Efrina B2 y Shh, que se encuentran presentes en sitios neurogénicos, pero ausentes en zonas quiescentes del cerebro como la corteza y el estriado, fueron capaces de inducir la generación de nuevas neuronas en sitios no neurogénicos, e inducir la generación de mayor número de neuronas en ratas envejecidas las cuales tiene disminuida su capacidad de neurogénesis hipocámpal⁴⁵.

El uso de factores de crecimiento, morfógenos, o proteínas con efectos tróficos y trópicos, tanto *in vitro*, como *in vivo*, ha mostrado efectos muy importantes en la expansión, proliferación o diferenciación de las CT; sin embargo la incorporación de estos factores en biomateriales puede aportar ventajas importantes tales como la liberación controlada y restringida espacialmente, que evite efectos pleiotrópicos, favorezca la exposición a poblaciones específicas, y que además potencie sus efectos. La exposición sobre demanda, a partir de biomateriales "inteligentes", que actúan liberando su contenido mediante la degradación controlada por procesos como degradación enzimática, cambios iónicos, luz, campos eléctricos etc. son una alternativa reciente que está siendo ampliamente explorada, y que permitirá modular de manera más fina la

exposición a moléculas bioactivas ⁴¹.

Propiedades físicas de los biomateriales y su influencia en la biología de las células troncales

La rigidez, que se define como la medida de la resistencia que ofrece un material a la deformación, es una de las propiedades mecánicas de la ME y que ahora se tiene evidencia que puede influir la biología de las CT. Considerando la rigidez de los tejidos sólidos, se sabe que el cerebro es uno de los tejidos más blandos (0.1-1 kPa), en el rango intermedio se encuentra el músculo estriado con alrededor de 100 kPa, mientras que el hueso es considerado como el tejido de mayor rigidez con 10⁶ kPa ^{46,47}. Estudios *in vitro* han demostrado que el grado de rigidez del sustrato regula el comportamiento de las CT. Particularmente se ha reportado que la diferenciación de las CTM hacia un determinado linaje es altamente influenciado por el grado de rigidez del sustrato, independientemente de la presencia o ausencia de factores de crecimiento; así se ha observado que un sustrato blando estimula la diferenciación de CTM hacia un linaje neurogénico, en comparación a sustratos de rigidez intermedia que conducen a un linaje miogénico, mientras que sustratos rígidos estimulan la diferenciación hacia un linaje osteogénico ⁴⁷. Estos efectos se han observado también en CT con mayor potencialidad como las pluripotentes embrionarias de origen murino; donde se ha reportado que al ser cultivadas en presencia de sustratos rígidos, se favorece la diferenciación a cardiomiocitos ⁴⁸, mientras que en sustratos blandos se mantiene la expresión de proteínas características del estado pluripotente, además de aumentar su capacidad proliferativa ⁴⁹. Sin embargo, este efecto no parece observarse en las CT pluripotentes derivadas del epiblasto de origen humano, que aún y en condiciones de rigidez similar al evaluado en CT embrionarias procedentes de roedor, inician un programa de diferenciación hacia el ectodermo neural ⁵⁰.

En precursores neurales procedentes de animales adultos, la capacidad de migración y diferenciación hacia un fenotipo glial se ve favorecida al ser cultivados *in vitro* sobre sustratos rígidos; mientras que la diferenciación neuronal se favorece en presencia de sustratos blandos ⁵¹. Otros estudios que evalúan el mismo efecto empleando precursores neurales pero procedentes de la etapa embrionaria, han reportado que los sustratos blandos son capaces de promover la diferenciación tanto del fenotipo neuronal como glial, incluso en ausencia de factores de crecimiento ⁵². Las diferencias encontradas en estos reportes sugieren que aun cuando la rigidez del sustrato es un factor relevante en la diferenciación de los precursores neurales, las características intrínsecas de las CT con las que se han realizado cada uno de los estudios también podrían determinar la respuesta al sustrato.

Más recientemente se ha demostrado que el cultivo prolongado de una población de CTM sobre un sustrato rígido induce la activación de un programa de diferenciación hacia el linaje osteogénico ⁵³. Este programa de diferenciación es incapaz de revertirse en presencia de sustratos blandos, los cuales estimula la diferenciación hacia un linaje neurogénico. Contrario a este efecto, CTM expuestas por periodos cortos de tiempo a sustratos rígidos, sí son capaces de revertir la expresión de factores pro-osteogénicos en presencia de sustratos blandos. Lo cual significa que el tiempo de exposición a un sustrato puede definir la reversibilidad de la expresión génica, de manera que determina si las células "recuerdan" el ambiente mecánico inicial al cual son expuestas ³⁷. Este resultado podría tener profundas implicaciones en cuanto a la manera que se realiza el cultivo y mantenimiento de la expansión de las CT, y en el diseño a futuro de biomateriales con propiedades mecánicas específicas que permitan manipular la expresión génica.

La topografía del sustrato a escala micro y nanométrica es otra de las propiedades físicas que regula características celulares como la morfología y conformación del citoesqueleto, la capacidad de migración, y eventualmente la diferenciación celular ⁵⁴. En ese sentido se han diseñado biomateriales con superficies nanoestructuradas que estimulan la proliferación y el mantenimiento de la multipotencialidad. Se ha observado que CTM cultivadas en soportes diseñados a base de nanofibras de diámetro de 230 nm, promueven la diferenciación hacia un fenotipo neural en ausencia de factores de crecimiento o factores de reprogramación celular ⁵⁵, mientras que sustratos diseñados a base de nanofibras alineadas promueve el compromiso de las CTM hacia un linaje miogénico ⁵⁶. Por otra parte, se sugiere que la forma que adquieren las CTM determina su compromiso hacia un linaje osteogénico o adipogénico, ya que se ha observado que existe relación entre la forma que adquiere la célula y la activación de proteínas que promueven el linaje miogénico ⁵⁷. Además del efecto que la nanotopografía de los materiales ejerce sobre la diferenciación de la CTM, también se ha observado regulación de la morfología, elongación y proliferación de las CT ⁵⁸.

Conclusiones

El estudio de los factores que conforman el nicho de las CT está contribuyendo a comprender la importancia del microambiente que las rodea, y de cómo es posible manipular su biología mediante la modulación de los factores extrínsecos. Este conocimiento está siendo aprovechado para diseñar biomateriales que permitan mimetizar el nicho; sin embargo la complejidad del mismo hace de esta aproximación un gran reto que actualmente está siendo abordado mediante muy diversas estrategias. Los resultados obtenidos hasta el momento

muestran un panorama prometedor en el que los biomateriales sean una alternativa para complementar terapias de sustitución celular y medicina regenerativa; aunque no es una panorama inmediato, será necesaria la investigación multidisciplinaria para conocer más a profundidad temas como los referentes al balance entre los factores extrínsecos e intrínsecos en la biología de las CT, y los diversos aspectos que conllevan el diseño y aplicación de los biomateriales tales como la estructura, estabilidad, y compatibilidad que permitan su uso a nivel clínico.

Bibliografía

1. P. Gadue, T.L. Huber, M.C. Nostro, S. Kattman, et al., Germ layer induction from embryonic stem cells, *Exp Hematol* 33 (2005) 955-964.
2. M.Z. Ratajczak, B. Machalinski, W. Wojakowski, J. Ratajczak, et al., A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues, *Leukemia* 21 (2007) 860-867.
3. I. Roeder, K. Braesel, R. Lorenz, M. Loeffler, Stem cell fate analysis revisited: interpretation of individual clone dynamics in the light of a new paradigm of stem cell organization, *J Biomed Biotechnol* 2007 (2007) 84656.
4. A.M. Wobus, K.R. Boheler, Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy, *Physiol Rev* 85 (2005) 635-678.
5. A. Trounson, The production and directed differentiation of human embryonic stem cells, *Endocr Rev* 27 (2006) 208-219.
6. A. Trounson, Human embryonic stem cell derivation and directed differentiation, *Ernst Schering Res Found Workshop* (2005) 27-44.
7. M. Votteler, P.J. Kluger, H. Walles, K. Schenke-Layland, Stem cell microenvironments—unveiling the secret of how stem cell fate is defined, *Macromol Biosci* 10 (2010) 1302-1315.
8. L.B. Hazeltine, C.S. Simmons, M.R. Salick, X. Lian, et al., Effects of substrate mechanics on contractility of cardiomyocytes generated from human pluripotent stem cells, *Int J Cell Biol* 2012 (2012) 508294.
9. Y.C. Hsu, E. Fuchs, A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (2012) 103-114.
10. J.F. Engelhardt, Stem cell niches in the mouse airway, *Am J Respir Cell Mol Biol* 24 (2001) 649-652.
11. Y. Zhang, R.L. Xie, J. Gordon, K. LeBlanc, et al., Control of mesenchymal lineage progression by microRNAs targeting skeletal gene regulators *Trps1* and *Runx2*, *J Biol Chem* 287 (2012) 21926-21935.
12. K. Rehman, M.J. Iqbal, N. Zahra, M.S. Akash, Liver stem cells: from preface to advancements, *Curr Stem Cell Res Ther* 9 (2014) 10-21.
13. L. Fu, L. Zhu, Y. Huang, T.D. Lee, et al., Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population, *Stem Cells Dev* 17 (2008) 1109-1121.
14. J. Kim, T. Braun, Skeletal muscle stem cells for muscle regeneration, *Methods Mol Biol* 1213 (2014) 245-253.
15. N. Motohashi, A. Asakura, Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal, *Front Cell Dev Biol* 2 (2014).
16. J. Segales, E. Perdiguero, P. Munoz-Canoves, Epigenetic control of adult skeletal muscle stem cell functions, *FEBS J* (2014).
17. C. Blanpain, V. Horsley, E. Fuchs, Epithelial stem cells: turning over new leaves, *Cell* 128 (2007) 445-458.
18. M. Ito, Y. Liu, Z. Yang, J. Nguyen, et al., Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis, *Nat Med* 11 (2005) 1351-1354.
19. T.A. Markel, P.R. Crisostomo, T. Lahm, N.M. Novotny, et al., Stem cells as a potential future treatment of pediatric intestinal disorders, *J Pediatr Surg* 43 (2008) 1953-1963.
20. V.W. Wong, B. Levi, J. Rajadas, M.T. Longaker, et al., Stem cell niches for skin regeneration, *Int J Biomater* 2012 (2012) 926059.
21. C. Ramachandran, S. Basu, V.S. Sangwan, D. Balasubramanian, Concise Review: The Coming of Age of Stem Cell Treatment for Corneal Surface Damage, *Stem Cells Transl Med* (2014).
22. A. Alvarez-Buylla, M. Kohwi, T.M. Nguyen, F.T. Merkle, The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73 (2008) 357-365.
23. R. Schofield, The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell, *Blood Cells* 4 (1978) 7-25.
24. S.W. Lane, D.A. Williams, F.M. Watt, Modulating the stem cell niche for tissue regeneration, *Nat Biotechnol* 32 (2014) 795-803.
25. V. Greco, S. Guo, Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches?, *Development* 137 (2010) 1586-1594.
26. A.J. Wagers, The stem cell niche in regenerative medicine, *Cell Stem Cell* 10 (2012) 362-369.
27. A. Alvarez-Buylla, J.M. Garcia-Verdugo, Neurogenesis in adult subventricular zone, *J Neurosci* 22 (2002) 629-634.
28. A. Mendelson, P.S. Frenette, Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration, *Nat Med* 20 (2014) 833-846.
29. I.G. Winkler, V. Barbier, B. Nowlan, R.N. Jacobsen, et al., Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance, *Nat Med* 18 (2012) 1651-1657.
30. D.T. Scadden, The stem-cell niche as an entity of action, *Nature* 441 (2006) 1075-1079.
31. T.C. Luis, B.A. Naber, P.P. Roozen, M.H. Brugman, et al., Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion, *Cell Stem Cell* 9 (2011) 345-356.
32. R. Faigle, H. Song, Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis, *Biochim Biophys Acta* 1830 (2013) 2435-2448.
33. P.H. Jones, S. Harper, F.M. Watt, Stem cell patterning and fate in human epidermis, *Cell* 80 (1995) 83-93.
34. I. Kazanis, J.D. Lathia, T.J. Vadakkan, E. Raborn, et al., Quiescence and activation of stem and precursor cell populations in the subependymal zone of the mammalian brain are associated with distinct cellular and extracellular matrix signals, *J Neurosci* 30 (2010) 9771-9781.
35. L.B. Hazeltine, J.A. Selekmán, S.P. Palecek, Engineering the human pluripotent stem cell microenvironment to direct cell fate, *Biotechnol Adv* 31 (2013) 1002-1019.
36. P.M. Gilbert, K.L. Havenstrite, K.E. Magnusson, A. Sacco, et al., Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture, *Science* 329 (2010) 1078-1081.
37. C. Yang, M.W. Tibbitt, L. Basta, K.S. Anseth, Mechanical memory and dosing influence stem cell fate, *Nat Mater* 13 (2014) 645-652.
38. L. Macri, D. Silverstein, R.A. Clark, Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering, *Adv Drug Deliv Rev* 59 (2007) 1366-1381.
39. S.P. Zusiak, Y. Wei, J.B. Leach, Protein-hydrogel interactions in tissue engineering: mechanisms and applications, *Tissue Eng Part B Rev* 19 (2013) 160-171.
40. J.D. Bryers, C.M. Giachelli, B.D. Ratner, Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts, *Biotechnol Bioeng* 109 (2012) 1898-1911.
41. K. Lee, E.A. Silva, D.J. Mooney, Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments, *J R Soc Interface* 8 (2011) 153-170.
42. S. Konagaya, K. Kato, T. Nakaji-Hirabayashi, H. Iwata, Selective and rapid expansion of human neural progenitor cells on substrates with terminally anchored growth factors, *Biomaterials* 34 (2013) 6008-6014.

43. Y. Aizawa, N. Leipzig, T. Zahir, M. Shoichet, The effect of immobilized platelet derived growth factor AA on neural stem/progenitor cell differentiation on cell-adhesive hydrogels, *Biomaterials* 29 (2008) 4676-4683.
44. E.Y. Egawa, K. Kato, M. Hiraoka, T. Nakaji-Hirabayashi, et al., Enhanced proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor, *Biomaterials* 32 (2011) 4737-4743.
45. A. Conway, D.V. Schaffer, Biomaterial microenvironments to support the generation of new neurons in the adult brain, *Stem Cells* 32 (2014) 1220-1229.
46. D.E. Discher, P. Janmey, Y.L. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science* 310 (2005) 1139-1143.
47. A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell* 126 (2006) 677-689.
48. A. Arshi, Y. Nakashima, H. Nakano, S. Eaimkhong, et al., Rigid microenvironments promote cardiac differentiation of mouse and human embryonic stem cells, *Sci Technol Adv Mater* 14 (2013).
49. F. Chowdhury, Y. Li, Y.C. Poh, T. Yokohama-Tamaki, et al., Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions, *PLoS One* 5 (2010) e15655.
50. A.J. Keung, P. Asuri, S. Kumar, D.V. Schaffer, Soft microenvironments promote the early neurogenic differentiation but not self-renewal of human pluripotent stem cells, *Integr Biol (Camb)* 4 (2012) 1049-1058.
51. N.D. Leipzig, M.S. Shoichet, The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior, *Biomaterials* 30 (2009) 6867-6878.
52. A.I. Teixeira, S. Ilkhanizadeh, J.A. Wigenius, J.K. Duckworth, et al., The promotion of neuronal maturation on soft substrates, *Biomaterials* 30 (2009) 4567-4572.
53. J.C. Chen, C.R. Jacobs, Mechanically induced osteogenic lineage commitment of stem cells, *Stem Cell Res Ther* 4 (2013) 107.
54. M. Nikkhah, F. Edalat, S. Manoucheri, A. Khademhosseini, Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface, *Biomaterials* 33 (2012) 5230-5246.
55. R.J. McMurray, N. Gadegaard, P.M. Tsimbouri, K.V. Burgess, et al., Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency, *Nat Mater* 10 (2011) 637-644.
56. J.M. Dang, K.W. Leong, Myogenic Induction of Aligned Mesenchymal Stem Cell Sheets by Culture on Thermally Responsive Electrospun Nanofibers, *Adv Mater* 19 (2007) 2775-2779.
57. R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, et al., Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment, *Dev Cell* 6 (2004) 483-495.
58. S. Gerecht, C.J. Bettinger, Z. Zhang, J.T. Borenstein, et al., The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells, *Biomaterials* 28 (2007) 4068-4077.



El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje

Hippocampus: neurogenesis and learning

Juan David Olivares Hernández¹,
Enrique Juárez Aguilar²,
Fabio García García².

Recibido: 26-01-2015 Aceptado: 23-04-2015

RESUMEN

El aprendizaje y la memoria son dos procesos cognitivos trascendentales para la adaptación y la supervivencia de los organismos. Ambas conductas son procesadas en el sistema nervioso central y su regulación requiere de la participación de diversas estructuras cerebrales. Una de estas estructuras es el hipocampo, el cual está asociado en parte con la memoria declarativa. De manera interesante, el hipocampo es una de las dos regiones del cerebro adulto donde se producen nuevas neuronas. Estas nuevas neuronas tienen la capacidad de integrarse a las redes neuronales del hipocampo. Resultados recientes sugieren que las nuevas neuronas participan en la regulación de funciones cognitivas asociadas a esta estructura cerebral. Por lo tanto, el objetivo de la presente revisión es describir brevemente las evidencias que muestran el papel funcional de las nuevas neuronas en el contexto del aprendizaje y la memoria.

Palabras Clave: Factores de crecimiento; proliferación celular; neuronas; cerebro.

ABSTRACT

Learning and memory are two important cognitive processes for the adaptation and survival of organisms. Both behaviors are processed in the central nervous system and their regulation requires the participation of several brain structures. One of these structures is the hippocampus, which is associated in part with declarative memory. Interestingly, the hippocampus is one of two regions of the adult brain where new neurons are being produced. These new neurons have the ability to integrate into the hippocampal neural networks. Recent data suggest that new neurons participate in the regulation of cognitive functions associated with the hippocampus. Therefore, the aim of this review is to briefly describe evidences that show the functional role of new neurons in the context of learning and memory.

Keywords: Growth factors; cellular proliferation; neurons; brain.

¹Doctorado en Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana.

²Departamento de Biomedicina, Instituto de Ciencias de la Salud. Universidad Veracruzana.

Correspondencia:

Dr. Fabio García García
Instituto de Ciencias de la Salud
Avenida Luis Castelazo Ayala s/n. Industrial Animas.
Xalapa. Veracruz.
Teléfono 01 228 8418925. Fax 01 228 8418926
Email: fgarcia@uv.mx

Introducción

La generación de nuevas neuronas en el cerebro de los mamíferos, incluyendo el cerebro humano, es un fenómeno descrito desde hace ya varios años. Dicho fenómeno se conoce como neurogénesis y ocurre únicamente en dos regiones del cerebro adulto; la pared de los ventrículos laterales y el giro dentado del hipocampo. La presencia de neurogénesis se ha asociado a múltiples factores entre los que destaca el aprendizaje y su respectiva consolidación denominada memoria. Un número considerable de trabajos realizados en roedores han mostrado que cuando se aprende una tarea, el número de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo se incrementa de forma abundante. Lo cual sugiere que el aprendizaje es un factor que estimula la proliferación de nuevas neuronas, muchas de las cuales no sobreviven y pocas se integran al circuito cerebral para ser funcionales. En este sentido, el objetivo de la presente revisión es describir los principales hallazgos experimentales que asocian la generación de nuevas neuronas con adquisición de nueva información, así como los mecanismos celulares implicados en la regulación de dicho fenómeno.

Aprendizaje y memoria

Adaptativamente, el aprendizaje y la memoria son procesos cognitivos vitales para los organismos que forman parte del reino animal. El ambiente es un entorno cambiante, por lo que animales que viven en ambientes que cambian continuamente necesitan de una plasticidad conductual. La plasticidad es una propiedad de los sistemas biológicos que les permite adaptarse a los cambios del medio para sobrevivir, la cual depende de los cambios fisiológicos que ocurran al interior. En este sentido, el sistema nervioso posee una plasticidad altamente desarrollada y evidente en las primeras etapas del desarrollo, sobre todo en los mamíferos. A nivel neuronal los cambios plásticos pueden ser visualizados a través de un incremento del árbol dendrítico y del número de espinas dendríticas, que mejoran los contactos sinápticos y en consecuencia la comunicación entre las neuronas. Desde hace tiempo se sabe que el aprendizaje y la memoria son eventos que favorecen la plasticidad, y entre más plástico es el sistema nervioso mayor es la capacidad de aprendizaje de los organismos. El aprendizaje puede considerarse como una modificación estructural y funcional del sistema nervioso que da como resultado un cambio en la conducta relativamente permanente. La información aprendida es retenida o almacenada en los circuitos neuronales que forman el cerebro y constituye lo que denominamos memoria. La memoria es la consecuencia usual del aprendizaje y difícilmente nos referimos a alguno de estos términos de manera independiente.

En los mamíferos se han descrito diferentes tipos de memoria y cada uno de estos tipos involucra la participación

de áreas cerebrales y neurotransmisores específicos. De acuerdo a las características conductuales y las estructuras cerebrales implicadas, se han caracterizado tres tipos de memoria: la de trabajo, la implícita y la explícita ¹. La memoria de trabajo también llamada cognición ejecutiva, consiste en la representación consciente y manipulación temporal de la información necesaria para realizar operaciones cognitivas complejas, como el aprendizaje, la comprensión del lenguaje o el razonamiento ^{2,3}. La corteza prefrontal podría ser el lugar sede de esta memoria, además se sugiere que esta estructura cerebral podría funcionar como un lugar "on line" durante cortos periodos de tiempo de representaciones de estímulos ausentes ⁴. Por otra parte, la memoria implícita, procedimental o no declarativa es la memoria de las cosas que hacemos rutinariamente. Se le considera automática, inconsciente y difícil de verbalizar. Su adquisición es gradual y se perfecciona con la práctica. Este tipo de memoria deriva de tipos de aprendizaje básico, como la habituación y la sensibilización, el aprendizaje perceptivo y motor o el condicionamiento clásico e instrumental ⁵. Anatómicamente, la memoria implícita requiere de diferentes estructuras cerebrales que han sido involucradas con el aprendizaje procedimental, por ejemplo, los ganglios basales con el aprendizaje de hábitos y habilidades ⁶, el cerebelo con los condicionamientos de respuestas motoras ⁷ y la amígdala con los condicionamientos emocionales ⁸. Aunque el sitio principal de almacenamiento de esta memoria radica en estructuras subcorticales y en algunos casos depende directamente del neocórtex ⁹. Finalmente, el sistema de memoria explícita, también conocida como memoria declarativa, relacional o cognitiva es el almacenamiento cerebral de hechos (memoria semántica) y eventos (memoria episódica) ^{10,11,12}. Este tipo de memoria se adquiere en pocos ensayos a diferencia de la memoria implícita y se distingue por expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original, por lo que es considerada como una memoria de expresión flexible. Un tipo de memoria declarativa es la memoria espacial que consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales ^{13,14,15}. El hipocampo parece ser la estructura cerebral que está críticamente relacionado en este tipo de memoria declarativa ^{16,17}.

Sustrato anatómico de la memoria declarativa: el hipocampo

El hipocampo deriva de la región medial del telencéfalo, forma parte del sistema límbico y tiene un papel importante en la adquisición del aprendizaje espacial y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo. Anatómicamente, está organizado en el cuerno de Amón (hipocampo propio) y el giro dentado (separados por la fisura hipocampal); el complejo subicular,

formado por el *presubiculum*, el *subiculum* y el *parasubiculum*; y la corteza entorrinal^{18, 19, 20}. El cuerno de Amón está dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3 (figura 1).

La mayor entrada de fibras en el hipocampo proviene de la corteza parahipocámpal que es la principal vía de entrada de aferencias neocorticales de procesamiento provenientes de distintas áreas dorsales, como la corteza parietal posterior, la corteza retrosplenial, la corteza prefrontal dorsolateral o de la parte dorsal del surco temporal superior estructuras estrechamente asociadas en la codificación de la localización espacial de los estímulos^{21, 22}. Estas aferencias son distribuidas hacia la corteza entorrinal. Las células de las capas II y III de esta corteza envían sus axones hasta el giro dentado y el hipocampo a través de la vía perforante, atravesando la capa de células piramidales del *subiculum*^{23, 24}. Por otra parte, las neuronas piramidales de la región CA3 proyectan sus axones hacia las dendritas de las neuronas piramidales de las CA1 mediante los colaterales de Schaffer. Así mismo, los axones provenientes de la región CA3 proyectan hacia todo el hipocampo mediante proyecciones comisurales, entre hemisferios y/o asociativas, en el mismo hemisferio^{25, 26, 27}. Mientras que las neuronas granulares del giro dentado proyectan sus axones o fibras musgosas hacia las dendritas proximales de las neuronas piramidales de la región CA3, atravesando el hilus^{28, 29}.

El circuito del procesamiento de la información de la memoria declarativa es el llamado circuito trisináptico³⁰. Este circuito inicia en la vía perforante de la corteza entorrinal. Primeramente, las neuronas de la corteza entorrinal envía sus proyecciones hacia las células granulares del giro dentado. En seguida, estas células proyectan sus axones hacia las neuronas piramidales de la región CA3, las cuales finalmente envían sus axones hasta las neuronas piramidales de la región CA1 mediante los colaterales de Schaffer (figura 1). La información procesada mediante este circuito trisináptico permite relacionar diferentes aferencias sensoriales pertenecientes a diversos estímulos gracias a que las células piramidales del hipocampo tienen un alto grado de interconexión, facilitando las relaciones entre las diferentes entradas de información³¹.

Hipocampo y memoria declarativa

Actualmente existe amplia evidencia del papel crítico que juega el hipocampo en la memoria declarativa. Las lesiones en el hipocampo y sus conexiones subcorticales en pacientes con

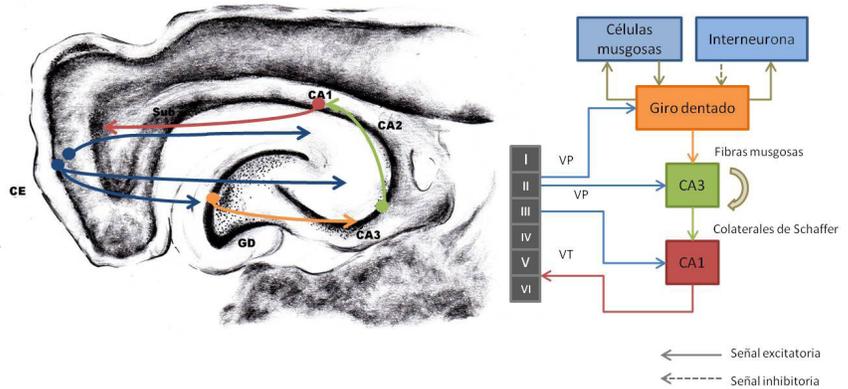


Figura 1. Esquema de los circuitos en el hipocampo adulto. La tradicional vía excitatoria trisináptica (Corteza entorrinal (CE)-giro dentado (GD)-CA3-CA1-CE) es descrita por las flechas de colores (flecha azul: vía perforante; flecha naranja: vía de fibras musgosas; flecha verde: colaterales de Schaffer; flecha roja; proyecciones de CA1 ha la CE). Los axones de las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal (CE) proyectan hacia el giro dentado a través de la vía perforante (VP), incluyendo la vía perforante lateral (VPL). El giro dentado envía proyecciones a las células piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas. Las neuronas piramidales de CA3 descargan la información a las neuronas piramidales de CA1 a través de los colaterales de Schaffer. A su vez, las neuronas piramidales de CA1 envían las proyecciones dentro de la capa de neuronas de la corteza entorrinal. CA3 también recibe proyecciones directas de la capa II de la corteza entorrinal a través de la vía perforante, mientras que CA1 recibe entradas directas de la capa III de la corteza entorrinal a través de la vía temporoammonica (VP). Las células del giro dentado también proyectan a las células musgosas del hilus e interneuronas hilares que envían proyecciones excitatorias e inhibitorias respectivamente, hacia las neuronas granulares. Abreviaturas: CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; Sub:subiculum.

amnesia producen déficits selectivos en la memoria declarativa, sin embargo la capacidad de distinguir nuevos objetos con base en su familiaridad permanece intacta^{32, 33}. Además se observó que en estos pacientes el hipocampo tiene la función de mantener la habilidad de asociar objetos en la memoria y recordar asociaciones contextuales en comparación con el recuerdo de objetos únicos con base en su familiaridad^{34, 35}. Otros estudios clínicos han mostrado que la corteza parahipocámpal se activa durante la presentación de escenas espaciales o durante la memorización de objetos relacionados fuertemente con lugares específicos^{36, 37}. El hipocampo es, por tanto, una estructura crítica para procesar y recordar información espacial y contextual.

La participación del hipocampo en la memoria explícita ha sido estudiada por medio de la memoria espacial. La memoria espacial consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales^{13, 14, 15}. Esta memoria puede ser evaluada en humanos y en modelos animales, en los cuales la solución de la tarea depende de la información disponible. Experimentos con ratas han mostrado que las lesiones hipocámpales afectan negativamente la adquisición y retención del aprendizaje espacial cuándo las ratas son entrenadas en la búsqueda de una plataforma oculta pocos centímetros por debajo del agua (laberinto acuático de Morris)^{38, 39, 40, 41}. De manera interesante, pacientes con lesiones en el

hipocampo tienen graves dificultades en un test virtual semejante al laberinto acuático de Morris ^{42, 43}. Las afectaciones en el aprendizaje espacial son proporcionales con el volumen de tejido dañado y dependen de la región anatómica del hipocampo lesionado, ya que las lesiones en el hipocampo dorsal producen un mayor deterioro en el aprendizaje que las lesiones en el hipocampo ventral ⁴⁴. Las lesiones hipocámpales parecen deteriorar específicamente el aprendizaje y la memoria espacial, ya que las ratas con el hipocampo dañado muestran dificultades para aprender tareas espaciales como la localización de una plataforma escondida pero no para adquirir una tarea de discriminación no espacial ^{44, 45}. Entonces, parece claro que el hipocampo juega un papel crítico para procesar y recordar información espacial.

Por otro lado, registros de actividad unitaria (registro de potenciales de acción) han reportado la presencia de neuronas denominadas de "lugar" en el hipocampo de la rata, estas células se denominan así porque disparan sus potenciales de acción cuando la rata reconoce un lugar en el que previamente se le había colocado ^{46, 47}. En conjunto estas evidencias sugieren que el hipocampo es una estructura cerebral implicada en aspectos cognitivos que involucran el reconocimiento de la ubicación espacial, para lo cual los sujetos se ayudan de la estimación de la distancia entre un objeto y los estímulos relacionados que lo llevaron a encontrarlo ⁴⁸. Aunque, es claro que el hipocampo juega un papel crítico en el aprendizaje espacial, el mecanismo es complejo y requiere de la acción coordinada del hipocampo con otras estructuras cerebrales.

Hipocampo y neurogénesis

El giro dentado del hipocampo junto con la zona subventricular de los ventrículos laterales del cerebro de mamífero son los dos sitios de generación de nuevas neuronas durante la etapa adulta, y se sabe que dichas neuronas tienen un papel importante en varias funciones del sistema nervioso central ^{49, 50, 51}. El fenómeno de producción de nuevas células es conocido con el término de neurogénesis y generalmente se refiere al proceso de proliferación, migración, supervivencia y diferenciación de nuevas células ^{52, 53, 54} (figura 2). La neurogénesis ocurre continuamente en el giro dentado del hipocampo adulto y comparte algunas características con la neurogénesis que tiene lugar durante el desarrollo embrionario. Durante el proceso de neurogénesis concurren células troncales y progenitores

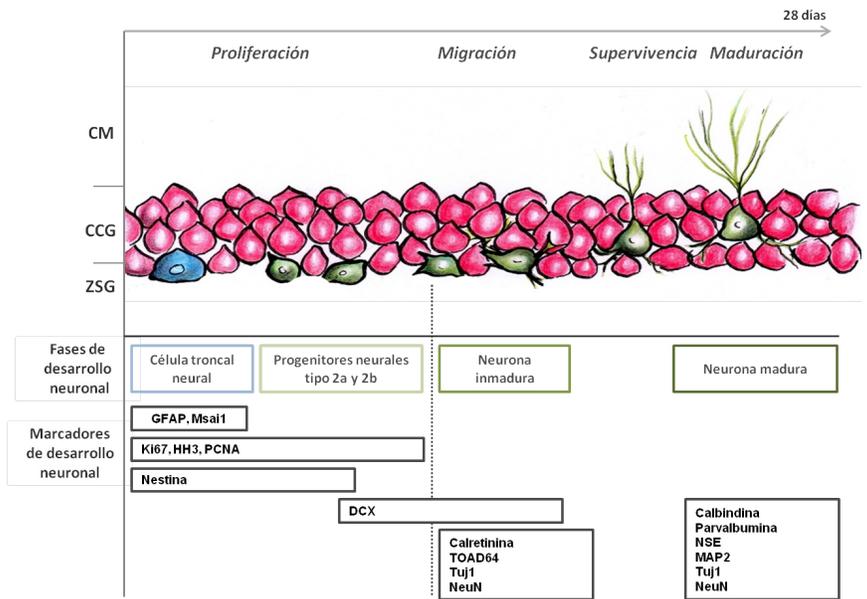


Figura 2. Representación de las etapas del proceso de la neurogénesis y de los marcadores celulares que identifican a cada proceso. La neurogénesis inicia con la proliferación de una célula troncal neural (célula de color azul) localizada en la zona subgranular del giro dentado, que dará origen a progenitores neurales (células de color verde) de los cuales se originarán las nuevas neuronas. Los progenitores neurales inician la migración hacia la capa de células granulares del giro dentado, sitio donde alcanzarán su madurez. Una etapa crítica de la neurogénesis es el mantenimiento de la supervivencia de las nuevas neuronas, ya que esto permitirá su integración a los circuitos neuronales del hipocampo. Durante la neurogénesis los progenitores neurales expresan proteínas específicas a lo largo de su maduración. Estas proteínas pueden ser detectadas por técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos. Por ejemplo, una célula inmadura puede identificarse por la detección de la proteína nestina, mientras que una neurona madura por la presencia de la proteína NeuN (para detalles vea el texto). Abreviaturas: zona subgranular (ZSG), capa de células granulares (CCG), capa molecular (CM).

neurales, en conjunto conocidos como precursores neurales, originados a partir de la división asimétrica de las primeras, las cuales darán lugar a los tres tipos principales de células en el sistema nervioso central: neuronas, glía y oligodendrocitos ^{55, 56, 57}.

La neurogénesis en el giro dentado del hipocampo se demostró hace cuarenta años en autoradiografías tomadas de una zona, la cual en contraste con la zona subventricular, no se localiza cerca de las paredes de los ventrículos laterales; sino que se encuentra localizada por debajo del borde medial del hipocampo y en su profundidad. Actualmente, esta zona es conocida como zona subgranular ⁵⁸. En este sitio se localiza una población de células troncales con características de la glía radial ^{59,60}, que tienen filamentos intermedios como la nestina y la proteína ácida fibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés). Los progenitores que se originan a partir de esta población, se comprometen a un linaje neural particular entre tres y siete días después de su nacimiento ⁶¹. Posteriormente, las nuevas células que logran diferenciarse se clasifican como tipo celular 2a, 2b y 3 dependiendo de los marcadores celulares que expresen. Específicamente, los tipos celulares 2b y 3, expresan la proteína

doblecortina, una proteína que se une a los microtúbulos y que es un marcador de neuronas inmaduras^{62, 63}, entre uno y catorce días después de su generación. Estas células muestran características de células progenitoras ya que algunas de ellas co-expresan Ki-67 (un marcador de proliferación celular) y por lo tanto son capaces de dividirse^{64,65}. El tipo 2b expresa el marcador neuronal NeuN 72 horas después de su generación. Por otra parte, este mismo tipo puede dividirse una vez más y dar origen al tipo celular 3, el cual expresa doblecortina y NeuN. Los tres tipos celulares expresan la proteína polisializada de NCAM (PSA-NCAM)⁶⁶.

La mayoría de la progenie de las células precursoras neurales dará origen a neuronas granulosas dentadas. Durante su proceso de madurez estas células reciben estímulos gabaérgicos ocho días después de su nacimiento y estímulos glutamatérgicos por un periodo de 18 días, además tienen un bajo umbral para la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés) y una mejor plasticidad sináptica^{67, 68, 69, 70}. Estas nuevas células migran, se diferencian y se integran a la capa subgranular del giro dentado del hipocampo entre una y cuatro semanas después de su generación. Posteriormente, desarrollan un axón y generan procesos neuríticos que les permite integrarse sinápticamente entre dos y cuatro semanas después de su nacimiento⁷¹. Las nuevas neuronas envían sus proyecciones axonales hacia CA3 y arborizaciones dendríticas hacia la capa granular, lo que sugiere que hacen sinapsis antes de ser completamente maduras⁷². De las nuevas células generadas, un bajo porcentaje se diferencia en astrocitos (positivos a los marcadores GFAP/S100B). Experimentos en monos, han demostrado que un alto porcentaje de las nuevas células generadas se comprometen a ser neuronas, expresando marcadores neuronales como: TuJ1, TOAD-64, NeuN, y calbindina y raramente marcadores de astrocitos (GFAP) u oligodendrocitos (CNP)^{73, 74}.

Neurogénesis hipocampal y aprendizaje espacial

Una de las preguntas frecuentes en la investigación de la neurogénesis hipocampal es si la producción de nuevas neuronas en el giro dentado podría ser relevante en el aprendizaje espacial asociado al hipocampo. La posible implicación de la neurogénesis hipocampal en el aprendizaje espacial, podría explicarse considerando que la neurogénesis es estimulada por el aprendizaje y este a su vez por la neurogénesis^{75, 76}. Estudios previos han demostrado que algunas experiencias como el aprendizaje espacial, el ambiente enriquecido y el ejercicio físico voluntario incrementan las tasas de neurogénesis en el giro dentado^{77, 78, 79, 80}. De manera interesante, estas experiencias están asociadas con un aumento en el rendimiento cognitivo, probablemente a través de la incorporación de las nuevas

neuronas a las redes neurales del hipocampo.

El aprendizaje espacial dependiente de hipocampo es uno de los principales reguladores de la neurogénesis hipocampal. Específicamente, la neurogénesis en el giro dentado se incrementa por el aprendizaje de tareas dependientes de hipocampo como son: el condicionamiento de traza de la respuesta de parpadeo, aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris y la preferencia de comida condicionada^{81, 82}. Por el contrario, el aprendizaje no dependiente del hipocampo, como el condicionamiento demorado de la respuesta de parpadeo y la evitación activa no favorecen la neurogénesis en el giro dentado. Se ha reportado que el aprendizaje *per se*, y no el entrenamiento, es el factor que induce la activación y la regulación de la neurogénesis hipocampal⁸³. Por ejemplo, el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris produce efectos diferenciales sobre el desarrollo de los precursores neurales del giro dentado^{84, 85}. En este sentido, se ha reportado que el aprendizaje induce apoptosis de las nuevas células durante la fase inicial del aprendizaje, aquellas células nacidas tres días antes de iniciar el entrenamiento, y la supervivencia de aquellas neuronas maduras, nacidas siete días antes de comenzar el entrenamiento^{86, 87, 88, 89, 90}. La muerte celular inducida por el aprendizaje es específica para la zona subgranular del giro dentado, ya que no se observó en CA1 y CA3. En contraste, la inhibición de la apoptosis en ratas que comienzan a aprender una tarea muestra un deterioro del recuerdo de la posición de la plataforma oculta, así como una disminución de la proliferación celular, característica de la fase inicial del aprendizaje. En conjunto, estas evidencias sugieren que el aprendizaje espacial activa un mecanismo similar al proceso de *estabilización selectiva* que se observa durante el desarrollo embrionario del cerebro, donde la neurogénesis se regula por la selección activa de algunas nuevas neuronas y la eliminación de otras^{91, 92, 93}. Por tanto, es razonable proponer que tanto la supervivencia y la apoptosis de las nuevas células son eventos de selección que dependen directamente del periodo de aprendizaje.

Otro factor que regula la neurogénesis y que a su vez promueve el aprendizaje espacial es el ambiente enriquecido. Un ambiente enriquecido consiste en colocar un grupo de roedores ($n \geq 8$) en una caja más grande que la caja estándar, esta caja contiene objetos de diferentes formas, texturas y tamaños, lo cual permite una estimulación sensorial y motora que impacta fuertemente el desarrollo del cerebro^{94, 96}. En este contexto, colocar a roedores por una semana en un ambiente enriquecido favorece la supervivencia de las nuevas células en el giro dentado, tres semanas posteriores a su nacimiento⁹⁵. Adicionalmente, el ambiente enriquecido incrementa la neurogénesis en el hipocampo y favorece el desempeño de los roedores en pruebas de aprendizaje y memoria espacial

dependientes de hipocampo⁹⁶.

Por otra parte, existe reportes de que el ejercicio aeróbico además de contribuir positivamente a la salud integral de los individuos, también tiene efectos positivos sobre la neurogénesis y el aprendizaje^{97, 98, 99,100}. En roedores, el ejercicio voluntario (correr en un rueda) incrementa la proliferación de nuevas neuronas en el giro dentado⁹³. El ejercicio además favorece la eficacia sináptica en neuronas del giro dentado y mejora el aprendizaje espacial de los roedores en el laberinto acuático de Morris^{101,102}. Estos resultados sugieren que la mejora en el aprendizaje debido al ejercicio se debe en parte a la inducción de neurogénesis en el hipocampo. El ejercicio favorece la síntesis y liberación de neurotransmisores, hormonas y péptidos que seguramente inducen la proliferación de nuevas neuronas (figura 3). Particularmente, se ha mostrado que los niveles de RNAm del factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF por su siglas en inglés) se incrementa en el hipocampo del ratón después de ejercicio¹⁰³.

En resumen, el ambiente enriquecido y el ejercicio como factores inductores de neurogénesis pueden tener mediadores químicos comunes que facilitan la proliferación de nuevas neuronas y entre los que se destacan los factores de crecimiento, las hormonas y neurotransmisores (figura 3).

Conclusiones

La relación entre la neurogénesis hipocampal y el aprendizaje y la memoria es evidente, las nuevas neuronas generadas en el hipocampo proporcionan el substrato anatómico que procesa y codifica la nueva información adquirida, sin embargo no se sabe si dichas neuronas replazan a las viejas por ser estas ya no funcionales o bien si las neuronas viejas se mantienen porque conservan información relevante aprendida anteriormente, ambos esquemas tienen que ser investigados para entender si el recambio de neuronas en el hipocampo es un proceso continuo y si todo aquello que aprendemos es condición para inducir neurogenesis. En este sentido la inducción de neurogénesis asociada al aprendizaje depende de varios factores: i) del tipo de tarea de aprendizaje, ii) de las demandas específicas que requiera la ejecución de la tarea y iii) del momento en que se ejecuta la tarea. En este contexto, la neurogénesis asociada a la adquisición de tareas nuevas, que tiempo después se traducen en memoria, es un proceso complejo, multifactorial y con interrogantes que aún deben ser resueltos.

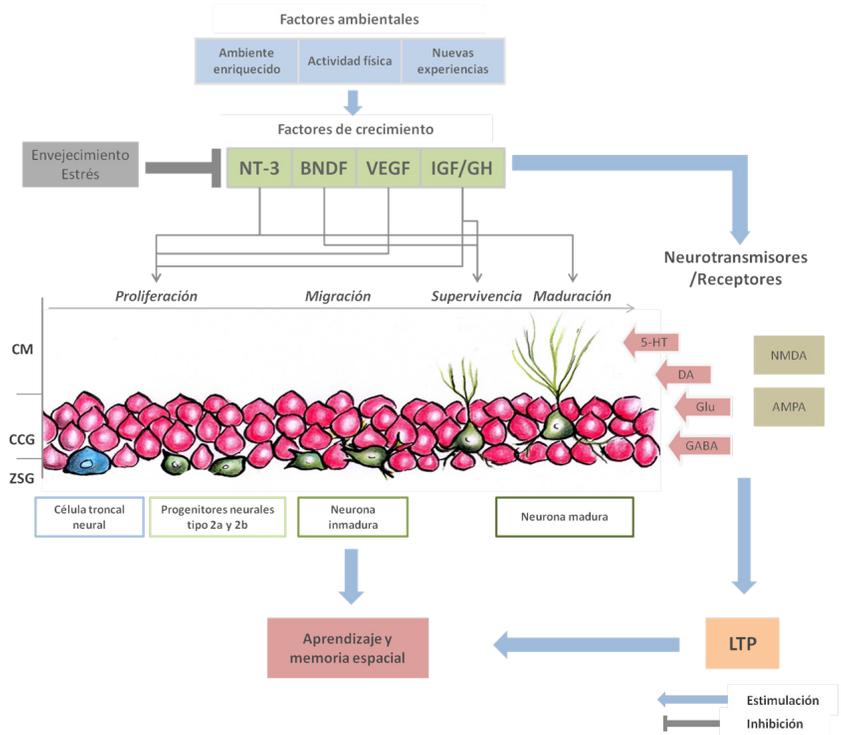


Figura 3. Mecanismos sugeridos que regulan la neurogénesis y su efecto sobre el aprendizaje y la memoria espacial. El ambiente enriquecido, el ejercicio físico y nuevas experiencias son factores externos que inducen la liberación de factores de crecimiento como la Neurotrofina-3 (NT3), el factor cerebral derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento parecido a la insulina 1 (IGF-1) o la hormona de crecimiento (GH), dichas moléculas producen efectos diferenciales sobre las distintas etapas de la neurogénesis. La estimulación en la neurogénesis favorece el aprendizaje y la memoria espacial. De forma paralela los factores de crecimiento regulan la liberación de neurotransmisores y la expresión de sus receptores, los cuales a su vez participan en la regulación de la neurogénesis. Algunos de estos neurotransmisores facilitan la potenciación a largo plazo (LTP), fenómeno involucrado directamente con la adquisición de nueva información. En contraste, el estrés y el envejecimiento tienen un efecto negativo sobre la producción de factores de crecimiento, inhibiendo por lo tanto la respuesta en la neurogénesis y en consecuencia en el aprendizaje y la memoria. Zona subgranular (ZSG), capa molecular (CM), 5-hidroxitriptamina (5-HT), dopamina (DA), glutamato (Glu), ácido gamma-aminobutírico (GABA), N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA).

Bibliografía

1. Roediger HL, McDermott KB. Two types of event memory. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110: 20856-857.
2. Kandel, ER, Dudai Y, Mayford MR. The molecular and systems biology of memory. *Cell* 2014; 157:163-186.
3. Griffin AL. Role of the thalamic nucleus reuniens in mediating interactions between the hippocampus and medial prefrontal cortex during spatial working memory. *Front Syst Neurosci* 2015 10; 9:29.
4. Zanto TP, Rubens MT, Thangavel A, Gazzaley A. Causal role of the prefrontal cortex in top-down modulation of visual processing and working memory. *Nat Neurosci* 2011; 14: 656-61.
5. Squire LR, Zola-Morgan M. The memory system of the rat. *Behav Brain Sci* 1991; 14: 415-491.
6. Ashby FG1, Turner BO, Horvitz JC. Cortical and basal ganglia contributions to habit learning and automaticity. *Trends Cogn Sci* 2010; 14:208-15.
7. Timmann D, y col. The human cerebellum contributes to motor,

- emotional and cognitive associative learning. A review. *Cortex* 2010; 46: 845-57
8. Duvarci S, Pare D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 2014; 482: 966-80.
 9. Sharon T, Moscovitch M, Gilboa A. Rapid neocortical acquisition of long-term arbitrary associations independent of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 1146-51.
 10. Squire LR, Zola-Morgan J. The cognitive neuroscience of human memory since HM. *Annu Rev Neurosci* 2011; 34: 259-88.
 11. Eichenbaum H. *The cognitive neuroscience of memory: an introduction*. Oxford University Press. 2011
 12. Ullman MT. Contributions of memory circuits to language: The declarative/procedural model. *Cognition* 2004; 92: 231-70.
 13. Keefe JO, Nadel L. *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press. 1978.
 14. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 2002; 35:625-41.
 15. Buzsáki G, Moser EI. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci* 2013; 16:130-38.
 16. Morris RGM, y col. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 2006; 50, 479-89
 17. Quiroga RQ. Concept cells: the building blocks of declarative memory functions. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 587-97.
 18. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci* 1989; 31:571-91.
 19. Lavenex P, Banta LP, Amaral DG: Postnatal development of the primate hippocampal formation. *Dev Neurosci* 2007; 29:179-19.
 20. Kivisaari SL, Probst A, Taylor KI. The Perirhinal, Entorhinal, and Parahippocampal Cortices and Hippocampus: An Overview of Functional Anatomy and Protocol for Their Segmentation in MR Images In fMRI. Springer Berlin Heidelberg 2013. p. 239-67.
 21. Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T: Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann NY Acad Sci* 2000 Jun; 911:1-24.
 22. Lavenex P, Suzuki WA, Amaral DG. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: Intrinsic projections and interconnections. *J Comp Neurol*. 2004; 472:371-94.
 23. Witter MP, Amaral DG. Entorhinal cortex of the monkey: V projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol* 1991; 307:437-59.
 24. Khalaf-Nazzal R, Francis F. Hippocampal development - old and new findings. *Neurosci* 2013; 248:225-42.
 25. Laurberg S, Sorensen KE. Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentate and subfield CA3. *Brain Res* 1981; 212:287-00.
 26. Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 1990; 295:580-23.
 27. Frotscher M, Seress L, Schwedtfeger WK, Buhl E. The mossy cells of the fascia dentate: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *J Comp Neurol* 1991; 312:145-63.
 28. Chicurel ME, Harris KM Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 1999; 325: 169-82.
 29. Suzuki W, Amaral DG: Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cytoarchitectonic and chemoarchitectonic organization. *J Comp Neurol* 2003; 463:67-91
 30. Kim SM, Ganguli S, Frank LM. Spatial information outflow from the hippocampal circuit: distributed spatial coding and phase precession in the subiculum. *J Neurosci* 2012; 32: 11539-58.
 31. Zhang SJ, y col. Functional connectivity of the entorhinal-hippocampal space circuit. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013 Dec 23; 369(1635):20120516.
 32. Eichenbaum H, Cohen NJ. Can we reconcile the declarative memory and spatial navigation views on hippocampal function? *Neuron* 2014; 83: 764-70.
 33. Giovanello KS, Verfaillie M, Keane MM. Disproportionate deficit in associative recognition relative to item recognition in global amnesia. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2003; 3: 186-94.
 34. Addis DR, y col. Characterizing spatial and temporal features of autobiographical memory retrieval networks: a partial least squares approach. *Neuroimage* 2004; 23: 1460-71.
 35. Bartsch T, Schönfeld R, Müller FJ, Alfke K, Leplow B, Aldenhoff J, Koch JM. Focal lesions of human hippocampal CA1 neurons in transient global amnesia impair place memory. *Science* 2010; 328: 1412-15.
 36. Churchwell JC, Morris AM, Musso ND, Kesner RP. Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 2010; 93: 415-21.
 37. Stone SS, y col. Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *J Neurosci* 2011; 31: 13469-84.
 38. Morris RG. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11: 47-60.
 39. Moser E, Moser MB, Andersen P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 1993; 13: 3916-25.
 40. Laursen B, y col. Impaired hippocampal acetylcholine release parallels spatial memory deficits in Tg2576 mice subjected to basal forebrain cholinergic degeneration. *Brain Res* 2014; 1543: 253-62.
 41. Hales JB, Ocampo AC, Broadbent NJ, Clark RE. Hippocampal Infusion of Zeta Inhibitory Peptide Impairs Recent, but Not Remote, Recognition Memory in Rats. *Neural Plasticity* 2015; 501, 847136.
 42. Astur RS, Taylor LB, Mamelak AN, Philpott L, Sutherland RJ. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behav Brain Res* 2005; 132: 77-84.
 43. Cornwell BR, Johnson LL, Holroyd T, Carver FW, Grillon C. Human hippocampal and parahippocampal theta during goal-directed spatial navigation predicts performance on a virtual Morris water maze. *J Neurosci* 2008; 28:5983-90.
 44. Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Rev Neurosci* 2014; 15: 655-69.
 45. Hales JB, y col. Medial entorhinal cortex lesions only partially disrupt hippocampal place cells and hippocampus-dependent place memory. *Cell Rep* 2014; 9: 893-01.
 46. O'Keefe JA, Dostrovski J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 1971 34: 171-5.
 47. Hartley T, Lever C, Burgess N, O'Keefe J. Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369: 20120510.
 48. Moser MB, Rowland DC, Moser EI. Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 7: a021808.
 49. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neurosci* 1999; 2: 260-5.
 50. Clemenson GD, Deng W, Gage FH. Environmental enrichment and neurogenesis: from mice to humans. *Curr Opin Beh Sci* 2015; 4: 56-62.
 51. Cameron HA, Glover LR. Adult Neurogenesis: Beyond Learning and Memory. *Annu Rev Psychol* 2015; 66: 53-81.
 52. Cameron HA, Mckay RD. Adult neurogenesis produces a large pool

- of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2001; 435: 406-17.
53. Fernandes C, y col. Detrimental role of prolonged sleep deprivation on adult neurogenesis. *Front Cell Neurosci*, 2015; 9:140.
 54. Aimone JB, Deng W, Gage FH. Adult neurogenesis in the dentate gyrus. In *Space, Time and Memory in the Hippocampal Formation*. Springer Vienna 2015; pp. 409-429.
 55. Eriksson PS, y col. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 1998; 4: 1313-1317.
 56. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287: 1433-38.
 57. Drew LJ, Fusi S, Hen R. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: Why the dentate gyrus? *Learn Mem* 2013; 20: 710-29.
 58. De La Rosa Prieto C, De Moya Pinilla M, Saiz-Sanchez D, Ubada-banon I, Arzate DM, Flores-Cuadrado A, Martinez-Marcos A. Olfactory and cortical projections to bulbar and hippocampal adult-born neurons. *Front Neuroanat*. 2015; 9:4.
 59. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 2004; 27:447-52.
 60. Duan L, Peng CY, Pan L, Kessler JA. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Radial Glia Recapitulate Developmental Events and Provide Real-Time Access to Cortical Neurons and Astrocytes. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Apr 1. pii: sctm.2014-0137.
 61. Kirby ED, Kuwahara AA, Messer RL, Wyss-Coray T. Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 4128-33.
 62. Toriyama M, y col. Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. *J Biol Chem*. 2012; 287:12691-702.
 63. Vukovic J1, Borlikova GG, Ruitenber MJ, Robinson GJ, Sullivan RK, Walker TL, Bartlett PF. Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *J Neurosci*. 2013; 33: 6603-13.
 64. Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 2005; 25:10074-86.
 65. Cimadamore F, Amador-Arjona A, Chen C, Huang CT, Terskikh AV. SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E3017-E26.
 66. Kim HS, y col. PSA-NCAM+ Neural Precursor Cells from Human Embryonic Stem Cells Promote Neural Tissue Integrity and Behavioral Performance in a Rat Stroke Model. *Stem Cell Rev* 2014; 10: 761-771.
 67. Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 2004; 429:184-87.
 68. Ge S, y col. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 2006; 439:589-93.
 69. Lledo MP, Alononso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:179-93.
 70. Kim WR, Christian K, Ming GL, Song H. Time-dependent involvement of adult-born dentate granule cells in behavior. *Behav Brain Res* 2012; 227: 470-79.
 71. Benarroch EE. Adult neurogenesis in the dentate gyrus general concepts and potential implications. *Neurology* 2013; 81: 1443-52.
 72. Song J, M Christian K, Ming GL, Song H. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Dev Neurobiol* 2012; 72: 1032-43.
 73. Imayoshi I, Kageyama R. The role of Notch signaling in adult neurogenesis. *Mol Neurobiol* 2011; 44: 7-12.
 74. Mu L, y col. SoxC transcription factors are required for neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 2012; 32: 3067-80.
 75. Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10910-17.
 76. Fabel K, y col. Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Front Neurosci* 2009; 3:50.
 77. Kempermann G. Activity-Based Maintenance of Adult Hippocampal Neurogenesis: Maintaining a Potential for Lifelong Plasticity. In *Neural Stem Cells in Development, Adulthood and Disease* 2015 (pp. 119-123). Springer New York.
 78. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008;132: 645-60
 79. Clelland D, y col. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 2009; 325: 210-13.
 80. Speisman RB, y col. Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 263-74.
 81. Merritt JR, Rhodes JS. Mouse genetic differences in voluntary wheel running, adult hippocampal neurogenesis and learning on the multi-strain-adapted plus water maze. *Behav Brain Res* 2015; 280: 62-71.
 82. Deng W, Gage FH. The effect of immature adult-born dentate granule cells on hyponeophagial behavior is related to their roles in learning and memory. *Front Syst Neurosci* 2015; 9.
 83. Opendak M, Gould E. Adult neurogenesis: a substrate for experience-dependent change. *Trends Cogn Sci* 2015; 19: 151-61.
 84. Trinchero MF, y col. Effects of spaced learning in the water maze on development of dentate granule cells generated in adult mice. *Hippocampus* 2015. doi: 10.1002/hipo.22438.
 85. Jamal AL, y col. Transplanted dentate progenitor cells show increased survival in an enriched environment, but do not exert a neurotrophic effect on spatial memory within 2 weeks of engraftment. *Cell Transplan* 2015. <http://dx.doi.org/10.3727/096368915X687011>
 86. Peters M, Muñoz-López M, Morris RG. Spatial memory and hippocampal enhancement. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.03.005>
 87. Dobrossy MD, y col. Differential effects of learning on neurogenesis: Learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry* 2003; 8: 974-82.
 88. Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D, Gould E, Shors TJ. Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci* 2004; 24: 7477-81.
 89. Dupret D, y col. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology* 2007; 5: e214.
 90. Dupret D, y col. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS one* 2008; 3: e1959.
 91. Epp JR, Haack AK., Galea LA. Activation and survival of immature neurons in the dentate gyrus with spatial memory is dependent on time of exposure to spatial learning and age of cells at examination. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 95: 316-25.
 92. Lacefield CO, y col. Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus* 2012; 22: 106-16.
 93. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience* 1999; 2: 266-70.
 94. Birch AM, McGarry NB, Kelly ÁM. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus* 2013; 23: 437-50.
 95. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997; 386: 493-95.
 96. Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 1999; 39: 569-78.

97. Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nature Rev Neurosci* 2008; 9:58–65.
98. Erickson KI, y col. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 3017-22.
99. Muotri AR, Zhao C, Marchetto MC, Gage FH. Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus. *Hippocampus* 2009; 19:1002–07.
100. Kempermann, G. New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Rev Neurosci*. 2012; 13:727-36.
101. Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res*. 2011;218:308-14.
102. O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res*. 2007; 176:362-6.
103. Leraci A, Mallei A, Musazzi L, Popoli M. Physical exercise and acute restraint stress differentially modulate hippocampal brain-derived neurotrophic factor transcripts and epigenetic mechanisms in mice. *Hippocampus*. 2015 Mar 26. doi: 10.1002/hipo.22458.



Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función

Marilú Domínguez Pantoja¹,
Héctor Romero-Ramírez²,
Juan Carlos Rodríguez Alba^{1,3}.

Recibido: 30-11-2014 Aceptado: 07-04-2015

RESUMEN

El tejido hematopoyético proviene del mesodermo y está conformado por células que se encargan del buen funcionamiento del organismo a través de la oxigenación, eliminación de desechos biológicos, transporte de células y componentes del sistema inmunológico. La sobrevivencia en este tejido depende de cada población y varía desde 100-120 días en el eritrocito, hasta probablemente toda la vida en una célula de memoria del sistema inmune. Ante la muerte celular, se requiere una producción periódica de células de los diversos linajes hematopoyéticos, tal pérdida es compensada por células inmaduras conocidas como Células Madre Hematopoyéticas (CMH) encargadas del proceso de hematopoyesis. Esta población se activa en el inicio de la vida fetal y genera cerca de 2×10^{11} eritrocitos y 10^{10} células blancas cada día. Poseen capacidades de auto-renovación y diferenciación a múltiples linajes, aunque esta capacidad disminuye hacia las etapas maduras del organismo. Las CMH se producen en distintos nichos, poseen proteínas membranales y expresan factores de transcripción que permiten identificarlas. En conjunto, la expresión o activación de estos factores y proteínas específicas para la diferenciación de cada linaje nos permiten entender los procesos celulares que rigen los mecanismos de auto-renovación, diferenciación y proliferación de las CMH. Esta revisión agrupa el conocimiento actual del origen, funcionamiento y factores que regulan el desarrollo y diferenciación de las células madre hematopoyéticas, pretende proporcionar una perspectiva que incluya las interacciones celulares durante su desarrollo, programación de linajes y reprogramación por factores de transcripción y las diferencias de cada etapa de la hematopoyesis.

Palabras clave: Célula Madre Hematopoyética, factores de transcripción, autorenovación, CD.

¹Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana.

²Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., Apartado postal 14-740, C.P. 07360, México D.F., México.

³Departamento de Biomedicina, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana., Av. Dr. Luis Castelazo Ayala S/N, C.P. 91190, Xalapa Veracruz., México.

Correspondencia:

Juan Carlos Rodríguez Alba
Phone: +52 228 8 418900
ext 13757

Fax: +52 228 8418926

e-mail address: carlorodriguez@uv.mx, jcra19@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

A lo largo de su vida, los seres humanos requieren una renovación constante de los tipos celulares que conforman al organismo, de tal forma, las células encargadas de esta renovación son denominadas “Células madre” y son caracterizadas por su alta capacidad de autorenovación ⁽¹⁾, además, tienen la característica de responder a señales y/o estímulos generados en el ambiente donde se encuentren, de esta forma, dichas señales comprometen o guían a la célula a su diferenciación hacia diferentes tipos celulares con características y funciones especializadas de cada órgano ⁽²⁾. Las células madre pueden ser clasificadas de la siguiente forma: I) De acuerdo al tejido de origen: **Células madres embrionarias o adultas**. II) Según su potencial de diferenciación: **Células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales o unipotenciales**. De acuerdo a esta clasificación, las células totipotenciales son capaces de dar origen desde un tejido extraembrionario hasta un organismo completo; las células madre pluripotentes originan células que se derivan de cualquier capa embrionaria: **ectodermo, endodermo o mesodermo**; estas mismas células son capaces de generar todos los tipos celulares que derivan de una sola capa embrionaria ⁽³⁾. Así, en este tipo celular podemos identificar a las **células madre neuronales, mesenquimales y hematopoyéticas**. Finalmente, las células madre que poseen una menor capacidad para diferenciarse se denominan unipotenciales como es el caso de las **células madre epidérmicas** ⁽⁴⁾. En esta revisión se abordan los aspectos más relevantes que se han estudiado a la fecha con respecto a las células madre hematopoyéticas (CMH), su clasificación, su origen, su función, las estrategias para identificarlas molecularmente, los mecanismos implicados en sus procesos de auto-renovación y finalmente su diferenciación a los distintos linajes celulares hematopoyéticos.

CELULAS MADRE HEMATOPOYETICAS Y SU CLASIFICACIÓN

El sistema hematopoyético tiene como función eliminar de la circulación las células defectuosas o aquellas que han cumplido con su ciclo de vida y reemplazarlas por células nuevas del mismo tipo. Este sistema está integrado por células de diferentes regiones en el organismo como son: **la médula ósea, la sangre y el sistema linfoide**, de tal forma, a partir de una CMH se pueden originar todos los linajes sanguíneos. Las CMH presentan funciones determinadas que las hacen diferentes a cualquier otra células como son: i) son multipotentes, es decir, poseen la capacidad de generar a los linajes sanguíneos divididos en tres grandes grupos: **La línea blanca** que produce *células linfoides*: linfocitos B y T, y *células mieloides*: basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, monocitos y macrófagos, **la línea roja** que produce a los eritrocitos y finalmente, **la línea trombocítica** que da origen a megacariocitos y plaquetas. ii) Poseen un

potencial proliferativo elevado, debido a que son capaces de dividirse y dar origen a un gran número de células maduras a lo largo de la vida. iii) Presenta la capacidad de generar células madre nuevas idénticas a sus predecesoras, manteniendo así simetría en sus procesos de división, es precisamente por esta última capacidad que se dice que la CMH es auto-renovable. En conjunto, estas cualidades hacen que las CMH sean muy importantes en el adecuado funcionamiento del sistema hematopoyético ^(5,6).

Las CMH son heterogéneas en sus capacidades para ser células auto-renovables, de tal forma, existen diversas clasificaciones que nos permiten elucidar entre un tipo y otro, así, existen células madre hematopoyéticas de largo plazo (CMH-LP) y células madre hematopoyéticas de corto plazo (CMH-CP) ⁽⁶⁾. Por un lado, las CMH-LP originan a todos los tipos celulares maduros en circulación, por otro lado producen células progenitoras que son capaces de reconstituir el sistema hematopoyético por completo tras un trasplante con estas poblaciones. La proporción de CMH-LP es mucho menor a la de otros tipos celulares en médula ósea y apenas alcanza el 0.1-0.2 % de la población total de CMH ⁽⁷⁾. Por otro lado, Las CMH-CP producen células progenitoras comprometidas con linaje linfóide y mielóide ⁽⁷⁾. Al mismo tiempo, se ha sugerido que existe un compromiso de estas células para dar lugar a progenitores multipotentes (PMP) tras diversas etapas de diferenciación con cambios funcionales irreversibles en su maduración celular ^(8,9). En este sentido, se ha propuesto que en función de la maduración de las CMH, estas se comportan mitóticamente más activas, sin embargo, pierden su capacidad de auto-renovación, es decir, poseen una actividad mitótica más elevada que en los compartimentos de células progenitoras pero con una menor capacidad de auto-renovación ^(5,10). Hoy en día, se han incrementado substancialmente los estudios realizados sobre CMH, debido a que poseen la capacidad de mantener su características originales en modelos “*in vitro*”, manteniendo sus habilidades para proliferar y diferenciarse hacia todos los linajes hematopoyéticos. Es precisamente por esta razón que su uso se ha expandido con éxito en el tratamiento de pacientes con riesgo de enfermedades hematológicas, problemas metabólicos, trastornos a nivel de médula ósea y casos de inmunodeficiencia. Las CMH pueden ser recuperadas de la médula ósea y la sangre de cordón umbilical, desafortunadamente, la cantidad de CMH es muy limitada, por tal motivo, se realizan cada vez más ensayos para poder expandirlas en cultivos “*in vitro*” y tener números adecuados para su uso terapéutico y en trasplantes. Es importante mencionar que el éxito de los cultivos celulares depende en gran medida de la investigación biomédica a través del conocimiento en modelos animales o de líneas celulares y cultivos primarios que permitan entender a detalle

los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis que rigen el desarrollo de las CMH y por lo tanto, obtener un mejor rendimiento de CMH, al mismo tiempo de entender la capacidad de estas células para desarrollar a los diferentes tipos celulares hematopoyéticos para su uso con fines preventivos y/o terapéuticos y con esto mejorar la calidad y expectativa de vida de los seres humanos ⁽¹⁰⁾.

CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS Y SU ORIGEN

Los nichos de las CMH se encuentran presentes en diversos tejidos a lo largo del desarrollo del individuo, de tal forma, la diferenciación de las células hematopoyéticas inicia en la fase embrionaria y deriva del mesénquima primitivo en el saco vitelino y de la región aorta-gonadal-mesonefros (AGM) seguido por la placenta, hígado fetal, médula ósea y bazo ⁽¹¹⁾. En la fase posnatal, es la médula ósea el sitio primario del mantenimiento de la hematopoyesis, sin embargo, ante una respuesta de estrés hematopoyético, se pueden formar nichos en sitios extra-medulares ⁽¹¹⁾. La médula ósea es un tejido graso y suave que se encuentra en el interior del hueso trabecular, éste en conjunto con la trabécula y el medio estroma de la médula ósea dan sostén física y fisiológicamente al tejido hematopoyético ⁽¹²⁾. En los primeros años de vida, la médula ósea denominada médula roja se localiza en todo el organismo a nivel de los huesos y conforme se prolonga la vida del organismo es gradualmente reemplazada por tejido medular que va perdiendo actividad denominado médula amarilla o grasa ⁽¹³⁾. El tejido hematopoyético en la médula ósea contiene células estromales que provienen de células mesenquimales como: los fibroblastos, los adipocitos, las células endoteliales y los osteoblastos, al mismo tiempo existe tejido hematopoyético de origen no-mesenquimal como es el caso las células dendríticas o de los macrófagos. En conjunto estos tipos celulares estromales son los responsables de dar mantenimiento a las células hematopoyéticas produciendo citocinas, factores de crecimiento y diferenciación en la matriz extracelular ⁽¹³⁾, en conjunto, la producción diferencial de estos factores, activa diversos genes que determinan el linaje hematopoyético de cada tipo celular, de tal forma, la comunicación e interacción constante entre las células del estroma y células progenitoras es vital para que se pueda realizar un desarrollo hematopoyético óptimo ⁽¹⁴⁾. En este sentido, el control de la auto-renovación y diferenciación de las CMH es regulado por mecanismos reguladores extrínsecos e intrínsecos en los nichos hematopoyéticos y se establecen a través de interacciones entre células ⁽¹⁵⁾.

Existen zonas claramente marcadas en los nichos hematopoyéticos que facilitan su estudio y se conocen como **zona osteoblástica** rica en osteoblastos cuya función principal es ser formadores de hueso induciendo la diferenciación de las

CMHs en osteocitos, **zona vascular** de donde emergen las células maduras a la circulación y **zona medular** donde se encuentran las CMHs proliferantes y quiescentes ⁽¹⁶⁾. Al mismo tiempo, en estas zonas la células de los distintos linajes poseen diversas moléculas de adhesión celular que favorecen la interacción celular con las CMHs, un ejemplo es la *N-caderina* expresada por osteoblastos y CMHs quiescentes, la *β -1 integrina* que une fibronectina y ayuda a la adhesión celular en el estroma ⁽¹⁶⁾. Un segundo tipo de nicho celular constituido de células progenitoras hematopoyéticas es conocido como **nicho o zona medular**, estas células producen factores que inhiben la proliferación de las células madre adyacentes, sin embargo, ante la necesidad de la periferia por células hematopoyéticas, estas células pueden iniciar procesos proliferativos, de maduración y diferenciación para la producción de CMHs quiescentes según lo requiera el organismo ⁽¹⁶⁾.

CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS Y SU FUNCIÓN

Los primeros estudios formales y publicados acerca de la función de las CMH fueron realizados a inicios de la segunda mitad del siglo pasado, siendo James Till y Ernest McCulloch en 1961 los primeros investigadores en reportar en un elegante diseño experimental que tras la irradiación no letal (30 rads) de ratones que posteriormente recibieron un trasplante autólogo por vía intravenosa de CMHs de un ratón sano, los ratones irradiados eran capaces de formar células hematopoyéticas en el bazo y torrente sanguíneo. Además, las CMH de estos ratones era capaces de repoblar células hematopoyéticas en nuevos ratones irradiados ⁽¹⁷⁾. En conjunto, estos ensayos demostraron de manera contundente la capacidad de reproducción de estas nuevas poblaciones celulares que fueron denominadas **unidades formadoras de colonia de bazo (UFC-B)** y permitieron el inicio de toda una nueva línea de investigación en búsqueda de los factores que determinan linaje. Posteriormente, otros estudios determinaron que para poder considerar a una célula como una CMH, ésta debe poseer la capacidad de generar y mantener durante periodos superiores a 6 meses, el correcto funcionamiento del sistema linfo-hematopoyético después de su trasplante en un receptor irradiado ⁽¹⁸⁾.

Por otra parte, otros investigadores iniciaron el estudio de las CMHs "in vitro" en la década de los 70's del siglo pasado, mostrando que estas células podían ser crecidas en un cultivo celular ⁽¹⁹⁾. En este sentido, las células del estroma forman una capa alimentadora en la cual tanto las CMHs como las células progenitoras proliferan o se diferencian por largos periodos que pueden alcanzar varias semanas e incluso meses en ausencia de factores exógenos ⁽²⁰⁾. Hoy en día se sabe que menos del 0.1% de las CMH de la médula ósea tienen la capacidad de proliferar por periodos largos, incluso esos mismo números tiene la capacidad

de auto-renovarse ^(18, 21).

CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS Y SU IDENTIFICACIÓN

Durante el proceso de maduración las CMH expresan genes que codifican para la producción de distintas proteínas ancladas a la membrana celular y son denominados receptores celulares que cumplen con una función específica en las vías de señalización intracelular tras el encuentro con la molécula que liga o activa dicho receptor, estas funciones son la activación celular, la proliferación, la diferenciación, la adhesión, la migración o la apoptosis celular. La expresión de estas moléculas en la superficie ha sido una herramienta muy útil en la biología celular, pues estos receptores pueden ser usados como blancos en diversos linajes celulares, así, tras la producción de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente cada blanco, podemos identificar y caracterizar cada tipo celular ⁽²²⁾. En este sentido, estos receptores celulares son conocidos como “marcadores” y se han formado grupos de diferenciación o CD (acrónimo del inglés Cluster of differentiation). Las células hematopoyéticas primitivas no expresan marcadores de linaje (lin) específicos, no obstante, es precisamente esta ausencia la permite distinguir las células inmaduras del resto de células diferenciadas ⁽²²⁾. Dependiendo del linaje celular, podemos observar diferentes combinaciones de CD's que permiten aislar selectivamente una población o enriquecerla según las necesidades ⁽²²⁾.

Para identificar, aislar y cuantificar la población de CMH el marcador de elección es CD34, que posee un papel importante tanto en la adhesión intercelular como en la comunicación con la matriz extracelular, induciendo la polimerización de actina ⁽²³⁾. Así mismo, se ha demostrado que la regulación de la expresión del antígeno CD34 está implicada en el mantenimiento de la actividad hematopoyética normal, gracias a la inhibición de la proliferación de células progenitoras mediada por contacto y agregación celular ⁽²³⁾. La expresión del CD34 es elevada en células progenitoras tempranas y disminuye progresivamente en función de la maduración de la célula hasta que desaparece en etapas diferenciadas a un linaje determinado ^(24, 25) finalmente, estas poblaciones purificadas presentan un alto potencial de implantación en trasplantes autólogos y alogénicos ⁽²⁶⁻²⁸⁾.

CD38 es otro marcador importante en la caracterización de las células hematopoyéticas, las células CD34⁺CD38⁺ son más abundantes que las CD34⁺CD38⁻, pero se ha comprobado que estas últimas pueden reconstituir y mantener la hematopoyesis multilinaje en ratones inmunodeficientes después de realizar el trasplante haciéndolas más efectivas ⁽²⁹⁾. Las células con fenotipo CD34⁻ también se caracterizan por la ausencia de CD38, de marcadores específicos de linaje y de CD133 ^(22, 30-33), sin embargo, las células CD34⁻ son incapaces de alcanzar la médula ósea después de haber sido trasplantadas por vía intravenosa en

comparación con células CD34⁺ ^(34, 35).

CD133 es conocido también como AC133 ^(36, 37) y se ha sugerido que es un marcador de CMHs progenitoras de monocitos/granulocitos y eritroides ⁽²²⁾. Su función se ha relacionado con el mantenimiento de los estados primitivos de diferenciación ^(38, 39). A pesar que el CD133 representa una molécula importante para la identificación de CMHs y células progenitoras humanas, el uso del CD34 es más usado debido a que no existen aún pruebas que demuestren la mayor eficacia de CD133 para el aislamiento o la expansión celular de las CMHs y las células progenitoras hematopoyéticas ^(40, 41).

Finalmente, otros marcadores de linaje como el C-KIT (conocido también como CD117), el cual promueve la proliferación y diferenciación de células progenitoras primitivas hematopoyéticas a células progenitoras comprometidas ⁽⁴²⁾, se expresa en las dos terceras partes de las células CD34⁺, incluyendo las células progenitoras más comprometidas con linaje, desaparece en las células sanguíneas maduras circulantes. Este marcador se usa con gran frecuencia en técnicas de aislamiento de células hematopoyéticas ⁽²²⁾. Por último el marcador CD133, es una proteína descrita recientemente y sus patrones de expresión son semejantes a los de CD133 ⁽⁴³⁾, de tal forma, al igual que el CD34 y el CD133, el CD133 es importante en la purificación de CMHs y células progenitoras provenientes de muestras de médula ósea y cordón umbilical, aunque no puede separar a estos tipos celulares entre sí ⁽²²⁾. La Figura 1 resume los CD's mencionados en este apartado, durante las etapas tempranas de la hematopoyesis.

CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS Y SU AUTORENOVACIÓN

Las CMH tienen la capacidad y atributo de generar todos los tipos celulares sanguíneos a lo largo de la vida del organismo, es por ello que la multipotencialidad y capacidad de auto-renovación de estas células ha sido ampliamente estudiado. Se ha sugerido que las CMH poseen un mecanismo de sucesión clonal, en el cual solo algunas clonas se diferencian y generan células sanguíneas maduras solamente cuando son requeridas, por otro lado, una gran cantidad de CMH permanecen en estado de quiescencia (sin contribuir a la hematopoyesis), hasta que desaparece la capacidad proliferativa de las células que se han activado ⁽⁴⁴⁾. Así, las células madre hematopoyéticas presentan una proporción de recambio baja, en comparación con las células progenitoras en el sistema hematopoyético, donde estas últimas proliferan con mayor proporción ante el estímulo de diversos factores del estroma mencionados anteriormente, produciendo cada día billones de células sanguíneas, manteniendo así la homeostasis hematopoyética en cada organismo ^(45, 46). En este sentido, esta homeostasis es regulada por el proceso de auto-renovación que es crucial para que las células madre persistan a lo largo de la

vida del organismo. Este proceso se produce de un progenitor único en cada división celular y la obtención de células con características funcionales y morfológicas idénticas dependerá de su eficiencia en la diferenciación.

Como se mencionó anteriormente, a lo largo de la maduración de los diferentes tipos celulares sanguíneos, se expresan diversos genes que determinan los receptores deben expresarse en la superficie celular, si bien es cierto que en el cultivo celular estos receptores son “aprovechados” como marcadores celulares, la razón biológica de la célula es que estos receptores activen las vías de señalización o transducción de señales para inducir diferentes respuestas celulares con diversas funciones, en este sentido, se han descrito diversos mecanismos moleculares de señalización que participan como reguladores de la proliferación, diferenciación y auto-renovación de las CMH. De manera general, las vías de señalización más estudiadas a la fecha incluyen proteínas de señalización, andamiaje y segundos mensajeros que constituyen las vías de señalización de Notch, Hedgehog (Hh) y Wntless (Wnt).

CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS Y SU DIFERENCIACIÓN A DISTINTOS LINAJES

La hematopoyesis es representada como una jerarquía, en la cual las CMH originan a los progenitores y posteriormente a las células que serán precursores de múltiples linajes hematopoyéticos. Como se mencionó en capítulos anteriores, la identificación de los diversos tipos celulares se realiza de acuerdo a la expresión de marcadores de superficie. En este sentido, se ha caracterizado la expresión de diversos factores de transcripción que regulan el desarrollo y función de las CMH, así como la diferenciación de un linaje específico⁽⁴⁷⁾. Algunos de los factores de transcripción que se han descrito recientemente son: El factor **SCL/tal-1**, que es clave en la programación del mesodermo hacia un destino hematopoyético, este factor y sus proteínas asociadas son esenciales para el desarrollo de la hematopoyesis primitiva (saco vitelino) y definitiva (en el adulto), debido a que en su ausencia, no se generan células sanguíneas⁽⁴⁸⁾. El factor de unión central **Runx1** y su cofactor de unión **CBF-β**, también son necesarios para la hematopoyesis definitiva, en este caso, ensayos con modelos transgénicos que carecen de la función, han demostrado que Runx1 es necesario para la transición de las CMH, pues en su ausencia, no existe hematopoyesis^(49,50). Por otro lado, se ha demostrado recientemente una interacción del dominio C-terminal del factor **Mll1** relacionado a Trithorax (una histona H3 lisina 3 -H3K4- metiltransferasa), con el dominio Runt de **Runx1**, el cual recluta a Mll1 originando una superposición funcional de ambos reguladores transcripcionales, sugiriendo que su interacción es necesaria para la hematopoyesis⁽⁵¹⁾. Otro factor esencial es **GATA2**, el cual se expresa antes de la aparición

de la CMH y se ha propuesto como un marcador específico de células hematopoyéticas, además, su disminución afecta el compromiso de la CMH hacia los distintos linajes sanguíneos^(52,53). Se ha sugerido que el factor **GATA2** interactúa con el **Runx1** durante la hematopoyesis, debido a que los ratones deficientes en la expresión de **GATA2**^{+/-} y **Runx1**^{+/-} no son viables y muestran daño severo en el proceso hematopoyético durante la gestación⁽⁵⁴⁾.

La familia de factores de transcripción pertenecientes a **Notch**, son los componentes principales de una vía de señalización altamente conservada, su dominio Notch-IC se trasloca al núcleo donde participa en la formación de complejos de unión a Ácido Desoxirribonucleico (ADN) y regula la transcripción de diversos genes⁽⁵⁵⁾. El Factor **Notch1** es necesario para la generación de la hematopoyesis, ya que embriones deficientes de esta proteína son capaces de producir progenitores hematopoyéticos pero no CMH de largo plazo. Otro factor importante es **Meis1**, esta es una proteína cofactor que modula la unión y afinidad al ADN, se ha demostrado que embriones deficientes en **Meis1**, mueren por hemorragia e hipoplasia de hígado debido a la incompleta hematopoyesis durante el desarrollo^(56,57).

La expansión de las CMH tempranas es crítica para mantener una gran población durante la hematopoyesis necesaria para la vida del organismo, y la programación de esta expansión en diferentes etapas de la vida está relacionada con la expresión de diversas moléculas⁽⁴⁷⁾. **Sox17**, es un factor de transcripción de alta movilidad relacionado a **Sry** expresado en CMH fetales y neonatales pero no en adultas, su deficiencia perjudica la hematopoyesis fetal y las CMH neonatales pierden su capacidad de reconstitución y la generación de CMH definitivas⁽⁵⁸⁾. Por otra parte, los factores de transcripción necesarios para la especificación y formación de las CMH pueden no ser necesarios continuamente durante la supervivencia posterior o auto-renovación de las CMH. En este sentido, aunque **SCL/tal1** es un factor crucial para la especificación del destino hematopoyético durante el desarrollo, su inactivación en CMH adultas, no afecta el mantenimiento y auto-renovación⁽⁵⁹⁾.

Los procesos intrínsecos celulares, en particular los factores de transcripción son esenciales para definir el linaje de cada CMH. Por ejemplo **GATA1** promueve la diferenciación hacia un linaje megacariocítico/eritroide y PU.1 induce diferenciación mieloide⁽⁶⁰⁾, estas proteínas interactúan de tal forma que cada uno inhibe la transcripción del otro y este antagonismo favorece la elección del linaje de la CMH^(61,62). Por otra parte, asociaciones entre **GATA** y el cofactor **FOG** (Friend of **GATA**), han demostrado ser importantes para el desarrollo del linaje megacariocítico y eritroide⁽⁴⁸⁾. La elección del linaje mieloide y eritroide, también es controlada por un antagonismo entre **c-MafB**, un factor altamente expresado en monocitos y **Ets1**. La asociación de estos

factores a través de sus respectivos dominios de unión a DNA inhiben la transactivación mediada por Ets1 y en consecuencia, se bloquea la maduración eritroide ⁽⁶³⁾.

La proteína alfa de unión al potenciador CCAAT (**C/EBPα**), es requerida para el desarrollo de granulocitos, pero también promueve la diferenciación de CMH. Células Madres Hematopoyéticas deficientes de C/EBPα, tienen un incremento en la habilidad de repoblación y auto renovación lo cual bloquea la diferenciación hacia el linaje mieloide ^(64, 65). **C/EBP y FOG** participan en la diferenciación hacia eosinófilos y la interacción Gfi1/PU.1 favorece la diferenciación hacia neutrófilos y monocitos, ya que en ausencia de Gfi1 los precursores de neutrófilos no maduran y se silencia la expresión de genes de monocitos/macrófagos ⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾.

En el caso del linaje linfoide, un factor fundamental en el desarrollo del linfocito B es **Pax5**, ya que en su ausencia las células progenitoras linfoides se diferencian en otros linajes hematopoyéticos como son: los linfocitos T, células asesinas naturales o las células dendríticas ^(69, 70). Así, el compromiso del linfocito B es dirigido por Pax5 y su supresión implica la elección alternativa del linaje. En este sentido, Pax5 compromete los progenitores a un destino de linfocito B, mientras que otros factores de transcripción como E2A y EBP activan el programa de genes específicos de linfocitos B ⁽⁷¹⁾. Por otra parte, se ha descrito que la elevada expresión de PU.1 bloquea el desarrollo del linfocito B, esto se debe a que PU.1 y Pax5 interactúan físicamente y esto tiene un efecto negativo sobre la expresión de Pax5 ⁽⁷²⁾.

En cuanto al desarrollo de los linfocitos T, la señalización de **Notch 1** funciona como un factor de compromiso, además, se ha demostrado que **GATA3**, un factor de transcripción específico de células T, solo funciona bajo la señalización de Notch ⁽⁷³⁾. GATA3 es necesario para la producción de células TH2, y puede cambiar el fenotipo TH1 a TH2 ⁽⁷⁴⁾. De manera contraria, la activación del factor

de transcripción **T-bet**, normalmente expresado en células TH1, puede inducir diferenciación de células TH2 en TH1 ⁽⁷⁵⁾. Otro regulador importante en el desarrollo de los linfocitos es **Ikaros**, una proteína de dedos de zinc con sitios de unión a DNA y su eliminación elimina a los linfocitos B y T fetales. En este sentido, ratones deficientes de Ikaros desarrollan linfocitos T después del nacimiento, mientras que los linfocitos B permanecen ausentes durante toda la vida ^(76, 77). En la Tabla 1 se agrupan las principales características de los factores de transcripción anteriormente descritos, mientras que la Figura 1 señala etapas claves de la expresión de estos factores durante la hematopoyesis.

DISCUSION

Esta revisión ha agrupado el conocimiento actual, relativo al origen, funcionamiento y factores que regulan el desarrollo y diferenciación de las células madre hematopoyéticas, ha pretendido proporcionar una perspectiva que incluya las interacciones celulares durante el desarrollo, la programación del linaje y reprogramación por factores de transcripción, así como las diferencias de cada etapa de la hematopoyesis. Como se ha mencionado, Las CMH se producen en distintos nichos y poseen proteínas en la superficie celular que nos permiten identificarlas. De la misma forma, las CMH expresan diferentes factores de transcripción necesarios para su maduración, por

FACTOR	TIPO	CÉLULAS QUE LO EXPRESAN	EFFECTO DE LA SOBREENEXPRESIÓN	EFFECTO DE LA AUSENCIA	REFERENCIAS
GATA 1	Dedos de Zn	Progenitores Eritroide Megacariocitos Mastocitos Eosinófilos	Eritroide Megacariocitos Eosinófilos Mieloide	Bloqueo eritroide y megacariocitos	48, 60, 62
GATA 2	Dedos de Zn	Progenitores MegacariocitosMastocitos	Maduración de eritrocitos	Progenitores	52-54
GATA 3	Dedos de Zn	Progenitores Células T, Th2	Th2 Th1	No células T	73-74
PU.1	Ets	Progenitores Mieloides Células B	Mieloide	No células B, T y mieloides	60-61, 68, 72
C/EBPα	B-zipper	Mieloide, eosinófilos	Eosinófilos	No neutrófilos Eosinófilos	64-66
FOG-1	Multi-type-Zn fingers	MegacariocitosMastocitos, Eritroide	Eosinófilos	Bloqueo eritroide, no megacariocitos	48, 66
MafB	B-zipper	Monocitos	Monocitos		63
Runx1	Runt	Hematopoyético		No hematopoyesis definitiva	50-51, 54
T-bet	T-box	Células Th1	Th1 Th2		75
Pax 5	Paired box	Células B	Otros linajes	No células B	69-71
Ikaros	Dedos de Zinc	Progenitores Células T		No células linfoides	76-77

Tabla 1. Descripción de los principales factores de transcripción mencionados en esta revisión. Las flechas (↑↓) indican aumento o disminución de los diferentes linajes hematopoyéticos. Además se menciona el fenotipo celular desarrollado durante la sobreexpresión o ausencia de los diferentes factores de transcripción.

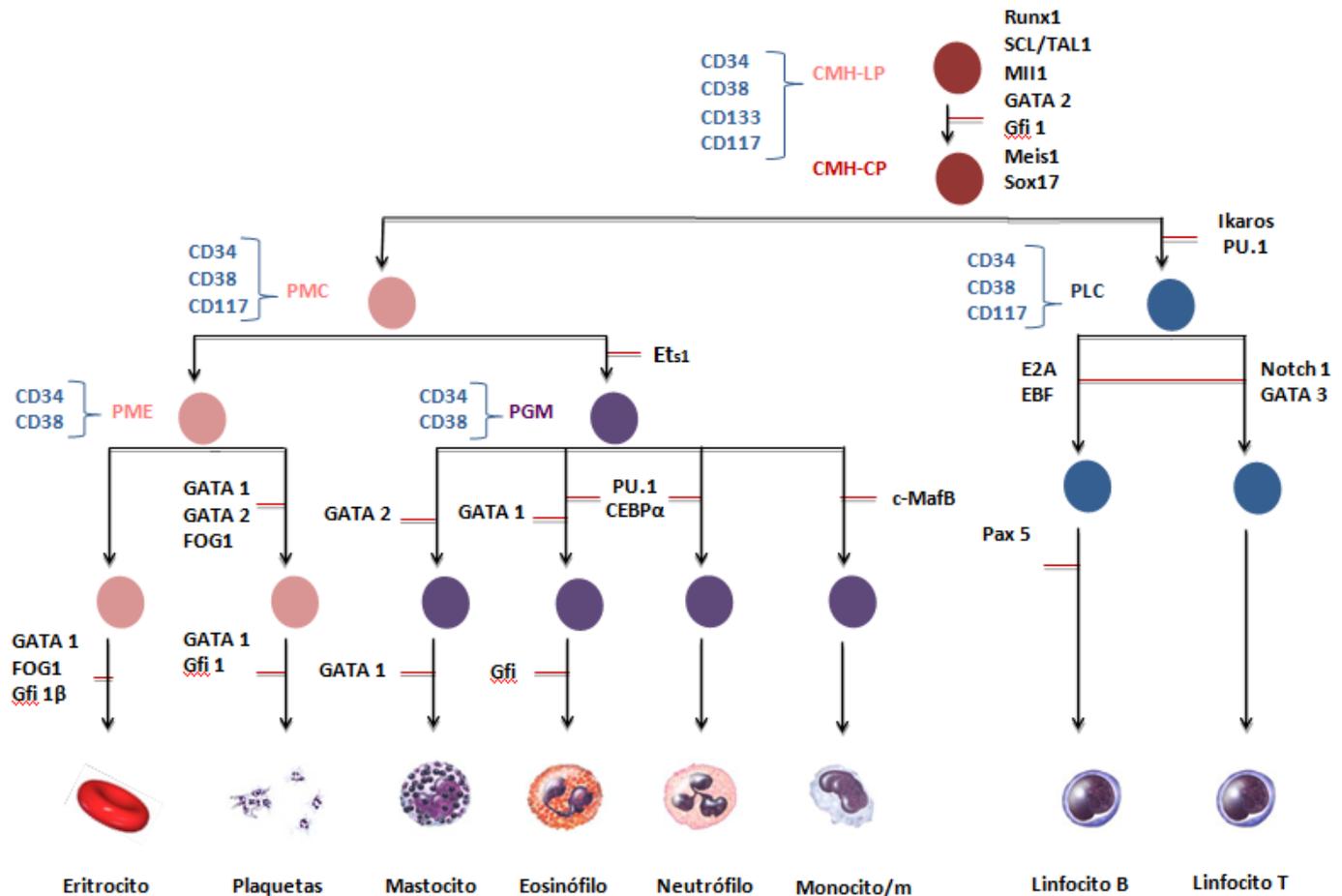


Figura 1. Factores de transcripción y CD's expresados durante la hematopoyesis. La figura indica las etapas clave en la diferenciación de las CMH, señalando los principales factores de transcripción expresados durante cada etapa de maduración, así como los principales marcadores de superficie (CD's) aprovechados para la identificación de los precursores hematopoyéticos. Abreviaturas: CMH-LP, células madre hematopoyética de largo plazo; CMH-CP, célula madre hematopoyética de corto plazo; PMC, precursor mielóide común; PLC, precursor linfóide común; PME, precursor megacariocítico/eritroide; PGM, precursor granulocítico/macrófagos.

tal motivo, al conocer los perfiles de expresión de cada factor, podemos determinar en qué etapa de desarrollo se encuentra cada tipo celular, además, en conjunto, la expresión o activación de estos factores de transcripción y vías de señalización específicas para la diferenciación de cada linaje nos permiten entender los procesos celulares que rigen los mecanismos de auto-renovación, diferenciación y proliferación de las CMH.

Finalmente, aunque en los últimos años, los factores de transcripción han sido identificados como los principales reguladores de las etapas de la hematopoyesis, es claro que estos factores no son los únicos responsables de la diferenciación de estas células, pues es evidente que requieren de otros factores epigenéticos o en las vías de señalización que controlan la elección y diferenciación de cada linaje, en ese sentido, el reto científico conduce a realizar estudios más amplios que identifiquen otros factores involucrados en la programación celular ⁽⁷⁸⁾.

Bibliografía

1. Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. The international journal of biochemistry & cell biology. 2004;36(4):607-20.
2. Horwitz EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. Archives of medical research. 2003;34(6):600-6.
3. Marone M, De Ritis D, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Scambia G, et al. Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. Leukemia & lymphoma. 2002;43(3):493-501.
4. Niesler CU. Old dogmas and new hearts: a role for adult stem cells in cardiac repair? Cardiovascular journal of South Africa : official journal for Southern Africa Cardiac Society [and] South African Society of Cardiac Practitioners. 2004;15(4):184-9; discussion 9.
5. Hoffman R BE, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. Stem cell model of hematopoiesis. En: Hematology: Basic principles and practice. Philadelphia, EE.UU.: Churchill Livingstone2000. 126-38 p.
6. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. Science. 2002;298(5593):601-4.
7. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. Archives of medical research. 2003;34(6):476-88.
8. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell. 2000;100(1):157-68.

9. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997;124(10):1929-39.
10. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
11. Mikkola HK, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*. 2006;133(19):3733-44.
12. Panoskatsis N, Mantalaris A, Wu JH. Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005;100(1):28-35.
13. Quesenberry PJ, Crittenden RB, Lowry P, Kittler EW, Rao S, Peters S, et al. In vitro and in vivo studies of stromal niches. *Blood cells*. 1994;20(1):97-104.
14. Hoffman R BE, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. Anatomy and physiology of hematopoiesis, En *Hematology: Basic principles and practice*. Churchill Livingstone. Philadelphia, EE.UU.2000. 139-54. p.
15. Hoffman R. Benz EJ SS, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. . Chronic Myelogenous Leukemia. En: *Hematology: Basic principles and practice*. Philadelphia, EE.UU.: Churchill Livingstone2000. 1155-71 p.
16. Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends in immunology*. 2005;26(8):426-33.
17. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*. 1961;14:213-22.
18. Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research*. 2003;34(6):446-60.
19. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *Journal of cellular physiology*. 1977;91(3):335-44.
20. Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood*. 1983;62(2):291-7.
21. Benboubker L, Binet C, Cartron G, Bernard MC, Clement N, Delain M, et al. Frequency and differentiation capacity of circulating LTC-IC mobilized by G-CSF or GM-CSF following chemotherapy: a comparison with steady-state bone marrow and peripheral blood. *Experimental hematology*. 2002;30(1):74-81.
22. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research*. 2003;34(6):461-75.
23. Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2001;15(1):1-13.
24. Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(2):115-29. Epub 1992/01/01.
25. Young PE, Baumhueter S, Lasky LA. The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood*. 1995;85(1):96-105.
26. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nature medicine*. 1996;2(12):1329-37.
27. Civin CI, Trischmann T, Kadan NS, Davis J, Noga S, Cohen K, et al. Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(8):2224-33.
28. Vogel W, Scheduling S, Kanz L, Brugger W. Clinical applications of CD34 (+) peripheral blood progenitor cells (PBPC). *Stem Cells*. 2000;18(2):87-92.
29. Verstegen MM, van Hennik PB, Terpstra W, van den Bos C, Wielenga JJ, van Rooijen N, et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells in macrophage-depleted SCID mice: evidence for accessory cell involvement in expansion of immature CD34+CD38- cells. *Blood*. 1998;91(6):1966-76.
30. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature medicine*. 1998;4(9):1038-45.
31. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Experimental hematology*. 1998;26(4):353-60.
32. Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, et al. Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells. *Blood*. 1999;94(12):4053-9.
33. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells. *Experimental hematology*. 2003;31(5):406-12.
34. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+) Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 2000;95(9):2813-20.
35. Wang J, Kimura T, Asada R, Harada S, Yokota S, Kawamoto Y, et al. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34- cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood*. 2003;101(8):2924-31.
36. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90(12):5002-12.
37. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*. 1997;90(12):5013-21.
38. Pasino M, Lanza T, Marotta F, Scarso L, De Biasio P, Amato S, et al. Flow cytometric and functional characterization of AC133+ cells from human umbilical cord blood. *British journal of haematology*. 2000;108(4):793-800.
39. Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N, Horie Y, Yamada T, Tani Y, et al. In vitro proliferation potential of AC133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells*. 2000;18(3):196-203.
40. Hess DA, Levac KD, Karanu FN, Rosu-Myles M, White MJ, Gallacher L, et al. Functional analysis of human hematopoietic repopulating cells mobilized with granulocyte colony-stimulating factor alone versus granulocyte colony-stimulating factor in combination with stem cell factor. *Blood*. 2002;100(3):869-78.
41. Bhatia M. AC133 expression in human stem cells. *Leukemia*. 2001;15(11):1685-8.
42. Hoffman R BE, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. G, Livingstone C. Growth factors, Cytokines, and the Control of Hematopoiesis. En: *Hematology: Basic principles and practice* Philadelphia, EE.UU.2000. 139-54 p.
43. Conze T, Lammers R, Kuci S, Scherl-Mostageer M, Schweifer N, Kanz L, et al. CDCP1 is a novel marker for hematopoietic stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;996:222-6.
44. Bell DR, Van Zant G. Stem cells, aging, and cancer: inevitabilities and outcomes. *Oncogene*. 2004;23(43):7290-6.
45. Attar EC, Scadden DT. Regulation of hematopoietic stem cell growth. *Leukemia*. 2004;18(11):1760-8.
46. Ezo S, Matsumura I, Satoh Y, Tanaka H, Kanakura Y. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle*. 2004;3(3):314-8.
47. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature reviews Genetics*. 2000;1(1):57-64.
48. Kim SI, Bresnick EH. Transcriptional control of erythropoiesis:

- emerging mechanisms and principles. *Oncogene*. 2007;26(47):6777-94.
49. Sasaki K, Yagi H, Bronson RT, Tominaga K, Matsunashi T, Deguchi K, et al. Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(22):12359-63.
 50. Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature*. 2009;457(7231):887-91.
 51. Huang G, Zhao X, Wang L, Elf S, Xu H, Sashida G, et al. The ability of MLL to bind RUNX1 and methylate H3K4 at PU.1 regulatory regions is impaired by MDS/AML-associated RUNX1/AML1 mutations. *Blood*. 2011;118(25):6544-52.
 52. Minegishi N, Ohta J, Yamagiwa H, Suzuki N, Kawauchi S, Zhou Y, et al. The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood*. 1999;93(12):4196-207.
 53. Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, Pan X, Fujimoto T, Takahashi S, et al. Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood*. 2003;102(3):896-905.
 54. Wilson NK, Foster SD, Wang X, Knezevic K, Schutte J, Kaimakis P, et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell stem cell*. 2010;7(4):532-44.
 55. Pajcini KV, Speck NA, Pear WS. Notch signaling in mammalian hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2011;25(10):1525-32.
 56. Azcoitia V, Aracil M, Martinez AC, Torres M. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Developmental biology*. 2005;280(2):307-20.
 57. Hisa T, Spence SE, Rachel RA, Fujita M, Nakamura T, Ward JM, et al. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *The EMBO journal*. 2004;23(2):450-9.
 58. Kim I, Saunders TL, Morrison SJ. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell*. 2007;130(3):470-83.
 59. Mikkola HK, Klintman J, Yang H, Hock H, Schlaeger TM, Fujiwara Y, et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature*. 2003;421(6922):547-51.
 60. Kulesa H, Frampton J, Graf T. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboplasts, and erythroblasts. *Genes & development*. 1995;9(10):1250-62.
 61. Nerlov C, Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes & development*. 1998;12(15):2403-12.
 62. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *The EMBO journal*. 1997;16(13):3965-73.
 63. Sieweke MH, Tekotte H, Frampton J, Graf T. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell*. 1996;85(1):49-60.
 64. Friedman AD, Keefer JR, Kummalu T, Liu H, Wang QF, Cleaves R. Regulation of granulocyte and monocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Blood cells, molecules & diseases*. 2003;31(3):338-41.
 65. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity*. 2004;21(6):853-63.
 66. Querfurth E, Schuster M, Kulesa H, Crispino JD, Döderlein G, Orkin SH, et al. Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Genes & development*. 2000;14(19):2515-25.
 67. Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S, et al. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity*. 2003;18(1):109-20.
 68. Dahl R, Iyer SR, Owens KS, Cuylear DD, Simon MC. The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(9):6473-83.
 69. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*. 1999;401(6753):556-62.
 70. Rolink AG, Nutt SL, Melchers F, Busslinger M. Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature*. 1999;401(6753):603-6.
 71. Busslinger M, Nutt SL, Rolink AG. Lineage commitment in lymphopoiesis. *Current opinion in immunology*. 2000;12(2):151-8.
 72. DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 2000;288(5470):1439-41.
 73. Rothenberg EV. Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity*. 2007;26(6):690-702.
 74. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997;89(4):587-96.
 75. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000;100(6):655-69.
 76. Merckenschlager M. Ikaros in immune receptor signaling, lymphocyte differentiation, and function. *FEBS letters*. 2010;584(24):4910-4.
 77. Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*. 1996;5(6):537-49.
 78. Rossant J. Stem cells: the magic brew. *Nature*. 2007;448(7151):260-2.



Células troncales mesenquimales: biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas

Mesenchymal stem cells: biology and use in hematopoietic stem cells transplantation

Marta Elena Castro Manreza¹,
Juan José Montesinos Montesinos¹.

Recibido: 26-01-2015 Aceptado: 08-04-2015

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés Mesenchymal Stem Cells), se consideran células troncales somáticas que se pueden encontrar en diferentes tejidos de un organismo adulto y también en fuentes neonatales. Estas células, originalmente se identificaron en la médula ósea y poseen un amplio potencial de diferenciación, capacidad de soporte hematopoyético y capacidad inmunoreguladora. Debido a estas propiedades, existe gran expectativa, sobre su uso futuro en protocolos de terapia celular para la regeneración de tejidos. En particular, su empleo en protocolos clínicos para favorecer el trasplante de células troncales hematopoyéticas (TCH) y tratar la enfermedad injerto contra hospedero, ya es una realidad. Sin embargo, aunque varios estudios han evidenciado el efecto benéfico de las MSC en TCH y medicina regenerativa, uno de los principales retos es incrementar el conocimiento de la biología de estas células. Por tanto, es necesario realizar más estudios para lograr un uso óptimo de las MSC en protocolos de terapia celular. En esta revisión analizaremos el estado actual de lo que se conoce de la biología de las MSC y su aplicación en el trasplante de células hematopoyéticas.

Palabras clave: Células Troncales Mesenquimales, Inmunoregulación, Células troncales hematopoyéticas, Trasplante, Enfermedad Injerto Contra Hospedero, Terapia celular.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells are present in different tissues of an adult organism and also in neonatal sources and they can be considered as somatic stem cells. MSC were identified in bone marrow and have broad differentiation potential, capacity to support hematopoiesis and immunoregulatory properties. Because of these properties, there is a great expectation about their applications in cell therapy protocols for tissue regeneration. In particular, the application of MSC in clinical protocols to facilitate hematopoietic stem cells transplantation and to treat graft versus host disease is already a reality. However, although several studies have evidenced the beneficial effect of MSC in such clinical protocols, one of the main challenges is to increase knowledge in the biology of these cells. Therefore, further studies are necessary for optimal use of MSCs in cell therapy protocols. In this review we discuss the state of the art regarding biology of MSC and their use in hematopoietic cell transplantation.

¹ Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Correspondencia:

Doctor Juan José Montesinos Montesinos
Cocheras No. 204, Colonia Metropolitana 1ra Sección, Ciudad. Nezahualcóyotl
Estado de México C. P. 57730, México
Tel: 5526191119
E-mail: montesinosster@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un individuo inicia con la fecundación. La unión del óvulo y el espermatozoide, genera un huevo o cigoto que es capaz de formar todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios necesarios para la formación y crecimiento de un bebe. Después del nacimiento, continúa el desarrollo del organismo el cual culmina con la muerte. Durante toda la vida de un individuo, hay cambios constantes en los tejidos y órganos del cuerpo. En los niños, por ejemplo, el crecimiento es el proceso principal; mientras que en los adultos, la regeneración de diferentes tejidos, es fundamental para mantener el buen funcionamiento del organismo. En algunos tejidos, por ejemplo la piel y la sangre, el proceso de regeneración, es muy rápido y se lleva a cabo diariamente; mientras que en otros, este proceso es muy lento, como sucede con las neuronas del cerebro. Las células encargadas de llevar a cabo los procesos anteriormente descritos, son las células troncales, cuyo concepto y tipos, trataremos de explicar en este artículo. Además, revisaremos diferentes aspectos de las células troncales mesenquimales, un tipo de célula troncal, que en los últimos años se ha considerado entre las de mayor expectativa para su aplicación en medicina regenerativa.

Actualmente el estudio de las células troncales es relevante a nivel mundial, debido a que es prometedor su uso en terapia celular y medicina regenerativa. Así, temas propuestos en películas de ciencia y ficción, en el futuro podrían ser realidad; la idea de sustituir tejidos y órganos dañados por tejidos sanos provenientes de células troncales, es un tema de investigación en diversos laboratorios del mundo. En el futuro, a partir de células troncales se podría generar hueso, cartílago, músculo, células productoras de insulina, células de hígado, neuronas, etc. las cuales serían trasplantadas a los pacientes para tratar diferentes patologías. Incluso se estudia la posibilidad de generar órganos funcionales que puedan ser trasplantados. Sin embargo, la realidad es que aún desconocemos mucho sobre la biología de las células troncales y por lo tanto su manipulación para usarlas adecuadamente en protocolos clínicos, aún requiere de años de investigación.

BIOLOGÍA DE LAS MSC

Concepto y tipos de células troncales

La definición de "célula troncal," se hace con base en sus características funcionales. Son células con capacidad de autorenovación, no diferenciadas y son capaces de generar células que pueden diferenciarse al menos a un linaje particular.¹ El término "no diferenciadas" se refiere a que son células que no tienen una función determinada en algún tejido u órgano, por ejemplo, una neurona es una célula altamente especializada del cerebro, un hepatocito es una célula del hígado, un

cardiomiocito es una célula del corazón, mientras que, una célula troncal aunque se localice en un tejido particular, aun no adquiere las características propias de ese tejido que le permitan llevar a cabo una función determinada, por ejemplo, una célula troncal que se localice en el páncreas, no tiene la capacidad de producir insulina. El término "autorenovación", se refiere a la capacidad que tienen las células troncales de producir células idénticas a la inicial, lo cual permite el mantenimiento de su población. De esta manera, cuando una célula troncal se divide, puede dar lugar a dos células troncales, o se puede generar una célula troncal y una progenitora, esta última con la capacidad de diferenciarse a otros linajes celulares. Durante el desarrollo de los mamíferos se pueden generar diferentes tipos de células troncales, con distintos potenciales de diferenciación; con base en esta característica se han clasificado en: Totipotentes, Pluripotentes y Multipotentes.^{1,2}

El huevo o cigoto es una célula troncal totipotente, ya que es capaz de generar todas las estructuras embrionarias y extraembrionarias. Estas células las podemos encontrar hasta el estadio de mórula, en el cual, las ocho células que conforman esta estructura son totipotenciales. Continuando con el desarrollo embrionario, en el estadio de blastocisto, las células de la masa interior de la blástula se conocen como células troncales pluripotentes o células troncales embrionarias. Las células troncales pluripotentes son capaces de formar todos los tipos celulares de un organismo adulto, pero ya no pueden generar las estructuras extraembrionarias. A partir de estas células se diferencian las tres capas germinales, de las cuales se generan los diferentes tejidos y órganos de un individuo: ectodermo (que origina piel y linajes neurales), mesodermo (que da origen a la sangre, tejido adiposo, músculo, hueso y cartílago) y endodermo (que origina tejidos del tracto respiratorio y digestivo). Finalmente, en la etapa adulta, en la mayoría de los tejidos existen células troncales denominadas células troncales multipotentes o somáticas, las cuales tienen capacidad de autorenovación y diferenciación limitada. Son capaces de formar todos los tipos celulares diferenciados del tejido al cual pertenecen; si provienen de un tejido formado por un solo tipo celular, entonces se denominan unipotentes, ya que solo darán origen a un tipo celular.³⁻⁶ De manera interesante, algunas células troncales somáticas cuando son cultivadas *in vitro* con medios específicos, tienen la capacidad de generar células con características de otros tejidos, a esta propiedad biológica se le denomina plasticidad celular.^{3,4,6}

Actualmente es posible obtener células troncales somáticas de varios tejidos y órganos, sin embargo, las células troncales derivadas de médula ósea (BM, por sus siglas en inglés *Bone Marrow*) son las más atractivas en términos de terapia celular (Figura 1). En este órgano podemos encontrar dos tipos

de células troncales: las células troncales hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés *Hematopoietic Stem Cells*) y las MSC. A partir de las HSC, se generan diariamente, todas las células sanguíneas (hematopoyesis). Mientras que de las MSC se forman algunas células del estroma de la BM, los cuales en conjunto con otros componentes celulares, generan un microambiente apropiado para que se lleve a cabo la hematopoyesis.²

Células troncales mesenquimales

Friedenstein y col, originalmente aislaron a las MSC de la BM (BM-MSC), como células adherentes con morfología fibroblastoide (Figura 1), que desarrollan unidades formadoras de colonias y con alta capacidad de autorenovación y proliferación.⁷ Sin embargo, hasta el momento, no se ha definido un marcador único para las MSC, por ello la Sociedad Internacional de Terapia Celular ha establecido que estas poblaciones celulares obtenidas *in vitro*, deben cumplir ciertas características para que puedan ser consideradas como MSC. Es necesario que sean positivas para los marcadores CD105, CD73, CD90, además de expresar bajo niveles de HLA-I y ser negativas para HLA-II, CD11b, CD14, CD34, CD45 y CD31; aunado a lo anterior, deben tener capacidad de diferenciación a diferentes linajes mesenquimales entre ellos hueso, cartílago y tejido adiposo (Figura 2).^{8,9} Además de la BM las MSC se han encontrado en otros tejidos del organismo, como: tejido adiposo, páncreas, piel, cérvix, tejido muscular esquelético, tejidos dentales, etc.^{6,10} Estas poblaciones son heterogéneas y en la mayoría de los casos no presentan todas las características establecidas para las MSC derivadas de BM.

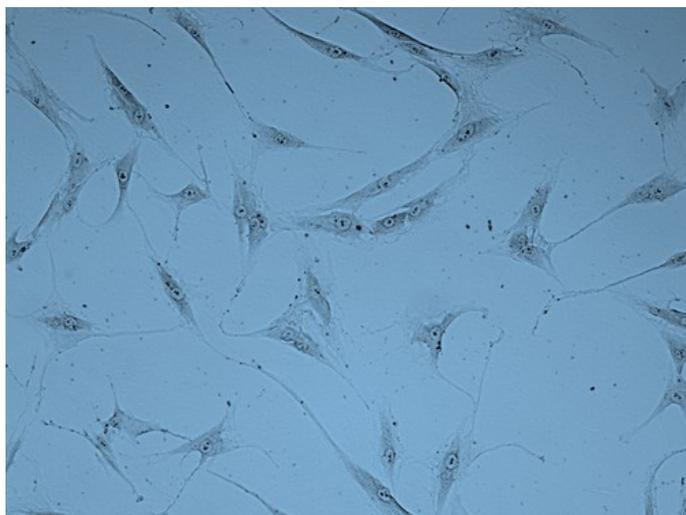
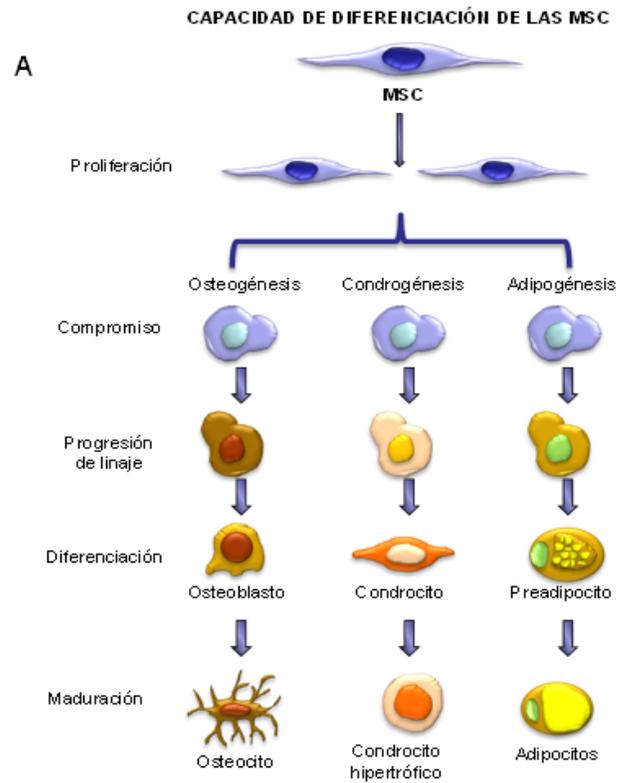


Figura 1. Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea, con la morfología fibroblastoide característica.

Las poblaciones de BM-MSC obtenidas *in vitro*, poseen diferentes propiedades biológicas importantes y adecuadas para



B

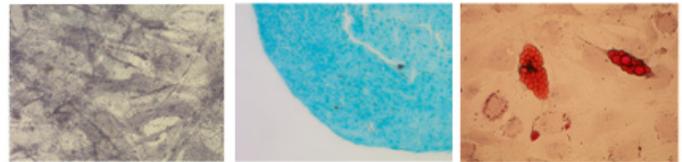


Figura 2. Capacidad de diferenciación de las células troncales mesenquimales. A) Las MSC tienen capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica (Modificado de Montesinos JJ y Castro ME, 2011). B) De izquierda a derecha, se muestran la diferenciación osteogénica (Tinción de fosfatasa alcalina), condrogénica (Tinción de glicosaminoglicanos con azul alciano) y adipogénica (Tinción de vacuolas lipídicas con rojo oleoso).

emplearlas en la medicina regenerativa: a) amplio potencial de diferenciación (plasticidad), b) secretan factores tróficos que favorecen la remodelación de tejidos, c) capacidad de soporte hematopoyético y d) tienen capacidad inmunosupresora.² Debido a estas propiedades actualmente las MSC se aplican en algunos protocolos de terapia celular y en el futuro podrían emplearse en el tratamiento o prevención de otras patologías. En particular, debido a su capacidad de soporte hematopoyético e inmunosupresión, las MSC ya se usan para mejorar el trasplante de HSC. Lo anterior se debe a que las MSC, favorecen la recuperación rápida de células hematopoyéticas, además son capaces de prevenir y tratar la enfermedad injerto contra hospedero (EICH), una de las principales complicaciones de los trasplantes de HSC.²

TERAPIA CELULAR CON CELULAS TRONCALES MESENQUIMALES EN TRANSPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS.

Células troncales mesenquimales y capacidad de soporte hematopoyético

La sangre está constituida por diferentes tipos celulares y el proceso por cual se forman diariamente todas estas células, se denomina hematopoyesis. Después del nacimiento, la hematopoyesis se lleva a cabo en la BM, en donde hay un microambiente apropiado que permite este proceso. El estroma de la BM está conformado por diferentes tipos de células que proporcionan las moléculas y señales necesarias para que se lleve a cabo la hematopoyesis. Se ha demostrado, que a partir de la MSC se forman algunos de los componentes del estroma de la BM, entre ellos los adipocitos, las células reticulares y los osteoblastos. Es decir, las MSC tienen la capacidad para generar a la mayoría de las células que constituyen el tejido de sostén sobre el cual las HSC proliferan y se diferencian.¹¹ El cuerpo humano, es una máquina extraordinaria, que regula finamente cada uno de los procesos que se llevan a cabo en él, alteraciones en los mismos resulta en el desarrollo de enfermedades. La alteración de la hematopoyesis provoca enfermedades de la sangre, algunas de ellas se caracterizan por la disminución en la producción de células sanguíneas, mientras que otras se caracterizan por la sobreproducción de las mismas (neoplasias hematológicas). Para estas patologías existen diferentes tratamientos, sin embargo el único con fines curativos es el trasplante de HSC.¹

En un trasplante de HSC se pretende sustituir a las células sanguíneas anormales por células sanas. Para lograr esto, previamente el paciente es sometido a un régimen de condicionamiento con quimio y/o radioterapia, el cual pretende eliminar a las células malignas. Posteriormente las HSC se administran por vía intravenosa, estas células pueden provenir de la BM, sangre periférica movilizada o sangre de cordón umbilical. Posterior al trasplante de HSC, se pueden presentar varias complicaciones: a) rechazo del injerto, b) recuperación hematopoyética lenta y c) desarrollo de EICH. Se ha demostrado que las MSC son capaces de favorecer la aceptación del injerto, una recuperación hematopoyética rápida y prevenir la EICH.⁶

Varios estudios demostraron que la inyección simultánea de MSC y HSC en ratones letalmente irradiados, acelera la recuperación de la hematopoyesis.¹² Estos resultados alentaron la posibilidad de usar las MSC para favorecer la hematopoyesis en pacientes sometidos a un trasplante de HSC; aunado a lo anterior, diferentes grupos de investigación han identificado los mecanismos involucrados en la capacidad de soporte hematopoyético por las MSC.¹³

En estudios *in vitro*, se ha visto que mediante mecanismos dependientes e independientes del contacto, las

MSC son capaces de regular la producción de células sanguíneas. Entre las citocinas secretadas por las MSC encontramos a la interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 e IL-15, todas involucradas en la proliferación y diferenciación de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas. Bajo ciertas circunstancias, las MSC también tienen la capacidad de secretar factores de crecimiento como el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés *Granulocyte and Macrophage-Colony Stimulating Factor*) y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), los cuales participan en la maduración de monocitos y granulocitos. Las MSC expresan diferentes moléculas de adhesión como ICAM-1, ICAM-2, VACAM-1, L-selectina, CD44 (receptor de hialuronato) e integrinas $-\beta 1$ (CD29),¹⁴⁻¹⁶ que permiten la interacción célula-célula entre las MSC y las HSCs. Además, secretan componentes de la matriz extracelular entre ellos Colágena tipo I, III, IV y VI, fibronectina, laminina, osteopontina y proteoglicanos, los cuales son importantes en la regulación de la hematopoyesis y mantenimiento de las HSC más primitivas.¹⁶

Debido a la capacidad de soporte hematopoyético de las MSC, se han realizado ensayos clínicos para mejorar el trasplante de HSC. Para ello, es necesario hacer cultivos de expansión a gran escala de las MSC para obtener el número de células necesaria y co-administrarlas a los pacientes que van a recibir el trasplante de HSC. Este procedimiento ya es una realidad y se ha visto que la administración de MSC en pacientes pediátricos o adultos es segura y no se observan efectos adversos o tóxicos, además hay una recuperación más rápida de neutrófilos y plaquetas.⁶

Propiedades inmunosupresoras de las MSC y tratamiento de la EICH.

En párrafos previos se mencionó que durante el trasplante de HSC se pueden presentar varias complicaciones y una de ellas es el desarrollo de la EICH. Cuando se realiza un trasplante de HSC, la suspensión de células que se administran al paciente, no es una población pura de células troncales o progenitores hematopoyéticos, es una mezcla de diferentes tipos celulares, entre ellos los linfocitos T, los cuales se encargan de la respuesta inmune adquirida contra patógenos y antígenos extraños. La EICH se presenta cuando los linfocitos T del donador, que se administran junto con las HSC, reconocen como extrañas a los antígenos expresados por las células del receptor (aloantígenos) y montan una respuesta inmune en contra de ellas (respuesta inmune alogénica). Los linfocitos T del donador, atacan y dañan a los tejidos y órganos del paciente, el daño provocado puede culminar con la muerte.^{17, 18}

Dependiendo del tiempo de aparición, la EICH se clasifica en dos tipos. La EICH aguda (EICH-a) que ocurre en

los primeros 100 días después del trasplante y la EICH crónica (EICH-c) que se presenta después de este tiempo. Para entender la participación de las MSC en el control de esta enfermedad, es necesario describir los mecanismos inmunológicos involucrados en el desarrollo de la EICH, dado que la fisiopatología mejor descrita, corresponde a la EICH-a, nos enfocaremos a esta entidad clínica.^{17, 18}

Se ha descrito que el desarrollo de la EICH-a, involucra tres fases:

- 1) Activación de las células presentadoras de antígenos (CPAs) del hospedero.
- 2) Activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T.
- 3) Fase efectora celular e inflamatoria.

Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que las MSC tienen capacidad inmunoreguladora, ya que son capaces de modular la función de diferentes componentes del sistema inmune innato (células NK) y adaptativo (células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B). El efecto inmunosupresor de las MSC, puede darse a través de contacto celular y/o mediante la secreción de diversos factores. Entre los primeros se ha involucrado a PD-L1, HLA-G1, ICAM-I y VCAM-I. Mientras que, entre los factores secretados se han identificado TGF β , HGF, IL-10, PGE2 y HLA-G5, así como los productos de la actividad enzimática de IDO.¹⁷ Conociendo los mecanismos empleados por las MSC *in vitro* y la fisiopatología de la EICH-a, sería posible explicar de qué manera las MSC pueden prevenir y/o tratar la EICH. Sin embargo, es importante mencionar, que aun con el conocimiento acumulado por los estudios *in vitro*, no se conoce exactamente cómo es que las MSC llevan a cabo su función después de ser administradas a los pacientes.

La primera etapa en el desarrollo de la EICH-a, involucra la activación y maduración de las células dendríticas (CD), debido al régimen de condicionamiento con quimio y/o radioterapia al cual es sometido el paciente y que provoca daño e inflamación en los tejidos. Las CD, son las células presentadoras de antígenos más importantes del cuerpo y se encargan del procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T. Una CD debe madurar para ser capaz de activar completamente a un linfocito T. Se sabe que una CD inmadura, además de no activar a los linfocitos T, es capaz de inducir tolerancia. En este sentido, las MSC podrían inhibir esta etapa en el desarrollo de la EICH-a. Esta hipótesis es apoyada por estudios *in vitro*, que han demostrado la capacidad de las MSC para afectar la función de las CD en tres niveles: a) Inhiben la diferenciación de monocitos hacia CD; b) Mantienen el estado inmaduro de las CD y c) son capaces de revertir a una CD madura hacia un estado inmaduro. En conjunto, estos mecanismos, disminuyen la capacidad de las CD para activar a los linfocitos T.¹⁷ Como hemos mencionado, aún falta por demostrar si los mecanismos anteriormente descritos ocurren *in vivo* después de administrar a las MSC a los pacientes.

Sin embargo, un estudio en ratón, indica que al menos en este modelo, la administración de MSC si afecta la capacidad de las CD para activar a los linfocitos T *in vivo*.¹⁹

La segunda etapa en la fisiopatología de la EICH-a, involucra la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T del donador, en respuesta a los antígenos histoincompatibles presentados por las CPAs del receptor. Cuando un linfocito T virgen o de memoria reconoce a su antígeno en la superficie de una CD en el contexto MHC-I o MHC-II, se induce su activación, proliferación y diferenciación, lo cual culmina con la función efectora del linfocito T. Estudios *in vitro*, han demostrado que las MSC afectan la proliferación y regulan la diferenciación de linfocitos T activados con aloantígenos o mitógenos (Figura 3). Las MSC son capaces de generar un ambiente anti-inflamatorio, debido a que disminuyen la diferenciación de poblaciones de linfocito T pro-inflamatorias tipo Th1 y Th17 y favorecen la diferenciación de poblaciones tipo Th2 y T reguladores. Los linfocitos T reguladores, se encargan de modular la respuesta inmune para evitar el daño en los tejidos causado por una inflamación exacerbada.¹⁸⁻²¹ Aunado a los resultados obtenidos *in vitro*, en algunos estudios en pacientes que han recibido MSC para el tratamiento de la EICH, se ha observado incremento en la poblaciones de T reguladores CD4+CD25+Foxp3+ o tipo Tr1, así como disminución en la población Th17.²²

Otras células involucradas en el daño a los tejidos durante la EICH-a son las células NK, estas células participan en la defensa del cuerpo contra infecciones y cáncer, dado que tienen efecto citotóxico sobre las células infectadas o tumorales. Estudios *in vitro*, han demostrado que las MSC son capaces de afectar la proliferación y actividad citotóxica de las células NK activadas.²³ Saber si esto ocurre en el contexto fisiológico de pacientes con EICH-a a los que se les ha administrado MSC, es un tema de investigación.

Debido a los resultados obtenidos *in vitro* y en modelos animales, respecto a la capacidad inmunoreguladora de las MSC, ya se han realizado varios ensayos clínicos para tratar y prevenir la EICH utilizando este tipo de células. Así, la aplicación de MSC ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la EICH grado III-IV refractaria a esteroides, tanto en niños como en adultos. En todos estos casos se ha observado reducción en la incidencia y severidad de la EICH, incremento significativo de la supervivencia y ausencia de efectos tóxicos después de la administración de las MSC.²⁴⁻²⁸ Sin embargo, también existen reportes, que observan poca eficacia de las MSC en el tratamiento de esta patología.²⁹⁻³¹ No obstante, se ha detectado incremento en poblaciones de linfocitos T y B reguladores en la sangre de pacientes que han recibido MSC, así como disminución de poblaciones Th17 y aumento en la concentración plasmática de IL-10³⁰⁻³³, eventos que en conjunto podrían contribuir en la resolución de la EICH.

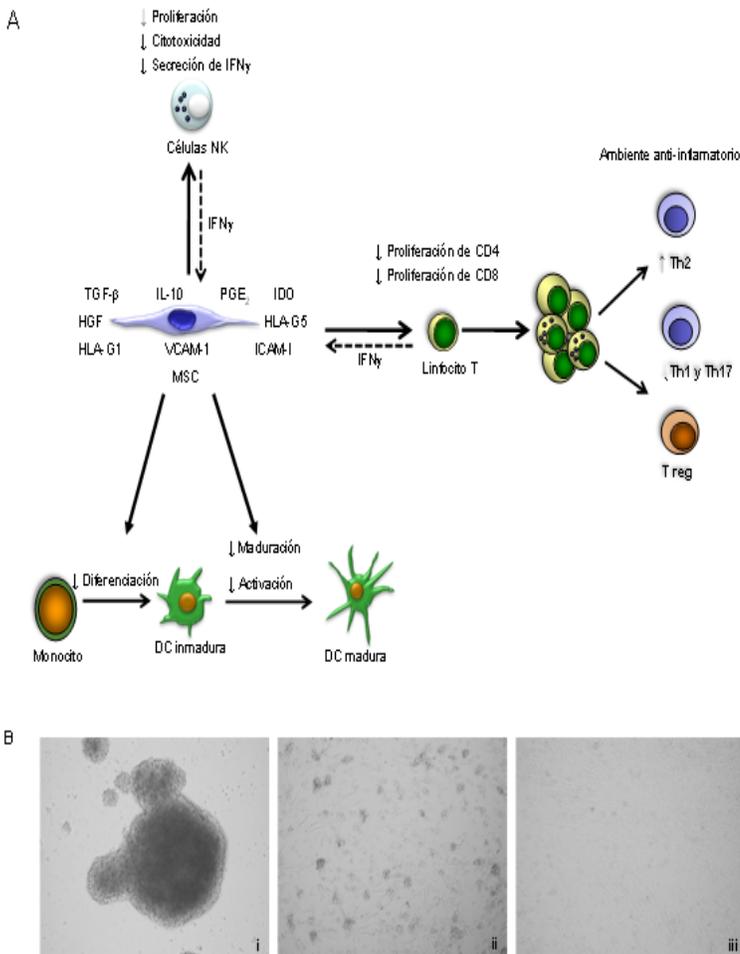


Figura 3. Capacidad inmunoreguladora de las células troncales mesenquimales. A) Las MSC regulan la función de las células NK, células dendríticas y linfocitos T. El efecto inmunosupresor de las MSC, puede darse a través de contacto celular y/o mediante la secreción de diversos factores. Entre los primeros se ha involucrado a PD-L1, HLA-G1, ICAM-1 y VCAM-1. Mientras que, entre los factores secretados se han identificado TGF β , HGF, IL-10, PGE $_2$ y HLA-G5, así como los productos de la actividad enzimática de IDO. Por otra parte, las citocinas pro-inflamatorias (ejemplo: IFN γ) secretadas por las células NK y los linfocitos T activados, favorecen la actividad inmunoreguladora de las MSC (líneas punteadas), ya que incrementan o inducen la secreción de moléculas que regulan la función de los diferentes componentes celulares del sistema inmune (Modificado de Montesinos JJ y Castro ME, 2011). B) Las MSC disminuyen la proliferación de linfocitos T activados in vitro: i) Grupos de proliferación de linfocitos T activados con fitohemaglutinina, ii) linfocitos T activados en presencia de MSC, se observa como disminuye la proliferación de los linfocitos T, iii) el efecto es más pronunciado con mayor número de MSC.

Sin embargo, algunos autores han sugerido que estos cambios inmunes generados en los pacientes puede favorecer el riesgo de infecciones con bacterias y/o hongos.^{34, 35} Lo anterior, sugiere que es necesario continuar con el estudio de las MSC, para tener mayor conocimiento sobre los mecanismos empleados *in vitro* e *in vivo* en la inmunoregulación y de esta manera, lograr el uso adecuado de estas células en los protocolos clínicos.

CONCLUSIONES

Las MSC presentan varias propiedades biológicas que sugieren su uso en procesos de terapia celular relacionados con la regeneración de células de diferentes tejidos. Además su uso en protocolos clínicos para favorecer el trasplante de HSC y disminuir la EICH, ya es una realidad. Sin embargo, aunque los resultados son alentadores, también existen resultados contradictorios, lo cual sugiere que es necesario realizar más estudios encaminados a entender la biología de estas células y así lograr un uso adecuado de las mismas.

BIBLIOGRAFIA

1. Mayani H. Células troncales y medicina regenerativa: conceptos básicos, estado actual y perspectivas futuras. En: Células Troncales y Medicina Regenerativa. Pelayo R, Santana-Olalla J y Velasco I ed. Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), México, 2011, 35-6.
2. Montesinos JJ y Castro ME. Células Troncales Mesenquimales. En: Células Troncales y Medicina Regenerativa. Pelayo R, Santana-Olalla J y Velasco I ed. Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), México, 2011, 119-38.
3. Lemoli R, Bertolini F, Cancedda R, De Luca M, Del Santo A, Ferrari G, Ferrari S, Martino G, Mavilio F, Tura S. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? Haematologica 2005; 90:360-81.
4. Herzog E, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood 2003; 15:3483-93.
5. Watt F y Driskell R. The therapeutic potential of stem cells. Philos Trans R Soc Lond B BiolSci 2010; 12:155-63.
6. Salem HK and Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem Cells 2010; 28:585-96.
7. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol 1974; 2:83-92.
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284:143-47.
9. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8:315-17.
10. Montesinos JJ, Mora-García Mde L, Mayani H, Flores-Figueroa E, García-Rocha R, Fajardo-Orduña GR, Castro-Manrreza ME, Weiss-Steider B, Monroy-García A. In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. Stem Cells and Development 2013; 22:2508-519.
11. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom M, MacArthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN and Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature 2010; 466:829-34.
12. Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, Minamino K, Iwasaki M, Hisha H, Song CY, Kusafuka K, Nakano K, Koike Y, Wang J, Koh E, Cui Y, Li C, Ikehara S. Simultaneous inyección of bone marrow cells and stromal cells into bone marrow accelerates hematopoiesis in vivo. Stem Cells 2004; 22:1256-62.

13. Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol* 2014; 35:32-7.
14. Lai W, Li Y, Mak S, Ho F, Chow S, Chooi W, Chow Ch, Leung A, Chan B. Reconstitution of bone-like matrix in osteogenically differentiated mesenchymal stem cell-collagen constructs: A three-dimensional in vitro model to study hematopoietic stem cell niche. *J Tissue Eng* 2013; DOI: 10.1177/2041731413508668.
15. Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, Eckstein V, Ho AD. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 2007; 25:2638-647.
16. Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Horsch K, Miesala K, Ho AD. Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. *Stem Cells* 2007; 25:798-806.
17. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 2:1550-561.
18. Marta E. Castro Manreza and Juan J. Montesinos. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of Immunology Research* 2014. DOI: 10.1155/1607
19. Chiesa S, Morbelli S, Morando S, Massollo M, Marini C, Bertoni A, Frassoni F, Bartolomé ST, Sambuceti G, Traggiai E, Uccelli A. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:17384-389.
20. Ghannam S, P`ene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, and Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *Journal of Immunology* 2010; 185:302-12.
21. Castro-Manreza ME, Mayani H, Monroy-García A, Flores-Figueroa E, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, Santiago-Osorio E, Montesinos JJ. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem Cells Dev* 2014; 23:1217-32.
22. Jitschin R, Mougiakakos D, Von Bahr L, Völkl S, Moll G, Ringden O, Kiessling R, Linder S, Le Blanc K. Alterations in the cellular immune compartment of patients treated with third-party mesenchymal stromal cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells* 2013; 31:1715-25.
23. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; 111:1327-33.
24. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* 2006; 81:1390-97.
25. Introna M, Lucchini G, Dander E, Galimberti S, Rovelli A, Balduzzi A, Longoni D, Pavan F, Masciocchi F, Algarotti A, Micò C, Grassi A, Deola S, Cavattoni I, Gaipa G, Belotti D, Perseghin P, Parma M, Pogliani E, Golay J, Pedrini O, Capelli C, Cortelazzo S, D'Amico G, Biondi A, Rambaldi A, Biagi E. Treatment of Graft versus Host Disease with Mesenchymal Stromal Cells: a Phase I Study on 40 Adult and Pediatric Patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20:375-81.
26. Resnick IB, Barkats C, Shapira MY, Stepensky P, Bloom AI, Shimoni A, Mankuta D, Varda-Bloom N, Rheingold L, Yeshurun M, Biorai B, Toren A, Zuckerman T, Nagler A, Or R. Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC). *Am J Blood Res* 2013; 19:225-38.
27. Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, Murata M, Eto T, Kobayashi N, Taniguchi S, Imamura M, Ando K, Kato S, Mori T, Teshima T, Mori M, Ozawa K. Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *Int J Hematol* 2013; 98:206-13.
28. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, van Tol MJ, Contoli B, Zwaginga JJ, Avanzini MA, Conforti A, Bertaina A, Giorgiani G, Jol-van der Zijde CM, Zecca M, Le Blanc K, Frassoni F, Egeler RM, Fibbe WE, Lankester AC, Locatelli F. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2013; 163:501-9.
29. von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Hölig K, Platzbecker U, Illmer T, Schaich M, Schetelig J, Kiani A, Ordemann R, Ehninger G, Schmitz M, Bornhäuser M. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43:245-51.
30. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoeffer F, Dominici M, Greil J, Handgretinger R. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40:25-32.
31. Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, Yu Z, Li B, Xu C, Li Y, Wang J, Hu J, Lou X, Chen H. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008; 22:593-99.
32. Weng JY, Du X, Geng SX, Peng YW, Wang Z, Lu ZS, Wu SJ, Luo CW, Guo R, Ling W, Deng CX, Liao PJ, Xiang AP. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45:1732-40.
33. Peng Y, Chen X, Liu Q, Zhang X, Huang K, Liu L, Li H, Zhou M, Huang F, Fan Z, Sun J, Liu Q, Ke M, Li X, Zhang Q, Xiang AP. Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia* 2015; 29:636-46.
34. Forslöv U, Blennow O, LeBlanc K, Ringdén O, Gustafsson B, Mattsson J, Remberger M. Treatment with mesenchymal stromal cells is a risk factor for pneumonia-related death after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2012; 89:220-27.
35. Remberger M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with mesenchymal stromal cells: a comparison with non-MSC treated patients. *Int J Hematol* 2012; 96:822-24.



Células troncales provenientes de sangre de cordón umbilical: de la investigación a la aplicación clínica

Stem Cell from umbilical cord blood: from research to clinical application

Verónica Fernández Sánchez^{1,2},
Gabriela Ibañez Cervantes^{1,3},
Juan Manuel Bello López^{1,4}.

Recibido: 26-01-2015 Aceptado: 10-04-2015

RESUMEN

En 1986, Broxmeyer demostró que la Sangre de Cordón Umbilical (SCU) era una fuente rica en Células Troncales Hematopoyéticas (CTH) y en Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH), lo cual permitió su uso en el trasplante de CTH/CPH. El primer trasplante alogénico exitoso empleando CTH/CPH de SCU fue realizado hace 25 años lo cual ha permitido, junto con el establecimiento de bancos altruistas no relacionados, incrementar el número de pacientes que se benefician con un trasplante de CTH/CPH. Sin embargo, su uso se ha visto limitado, sobre todo en adultos debido al bajo número de CTH/CPH contenidas en una unidad de SCU. Varios grupos de investigación se han dado a la tarea de estudiar a fondo las condiciones idóneas de cultivo celular para mantener y expandir a las CTH/CPH sin perder sus características biológicas originales. El conocimiento adquirido durante estos años ha permitido ampliar el uso de la CTH/CPH provenientes de SCU en diferentes patologías. Las nuevas investigaciones que actualmente se están llevando a cabo, tanto in vitro como in vivo son necesarias para su aplicación clínica. En este trabajo se hace un abordaje sobre los avances en el conocimiento y aplicación de las CTH/CPH provenientes de SCU, así como al estado que guarda este tema en nuestro país.

Palabras Claves: Sangre de Cordón Umbilical, Células Troncales Hematopoyéticas, Células Progenitoras Hematopoyéticas, Trasplante Hematopoyético.

ABSTRACT

In 1986, Broxmeyer showed that umbilical cord blood (UCB) was a rich source of Hematopoietic Stem Cells (HSC) and Hematopoietic Progenitors Cells (CPH), allowing their use in transplantation CTH / CPH. The first successful allogeneic transplant using CTH / CPH SCU was done 25 years ago which has allowed with the establishment of altruistic unrelated banks, increasing the number of patients who benefit from transplantation CTH / CPH. However, its use has been limited, especially in adults due to the low number of CTH / CPH contained in a unit SCU. Several research groups have studied the cell culture conditions appropriate for maintaining and expanding the CTH / CPH without losing their original biological characteristics. The knowledge gained over the years has enhanced the use of CTH / CPH from SCU in different pathologies. New research currently being undertaken, both in vitro and in vivo are needed for clinical application. In this paper, an approach to on advances in knowledge and application of CTH / CPH is done from SCU and the state that keeps this in our country.

¹Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea

²Jefatura de Investigación Desarrollo y Control de Calidad, Departamento de Investigación.

³Investigador en Ciencias Médicas nivel A. Departamento de Investigación.

⁴Investigador en Ciencias Médicas nivel B. Departamento de Investigación.

Correspondencia:

Verónica Fernández Sánchez
Chihuahua 134-interior 2, Col. Valle Ceylan,
Del. Tlalnepanitla Estado de México, C.P. 54150
Teléfono: 5542394252,
Correo electrónico: alf2228@yahoo.com.mx

Abreviaturas

CPH: Células Progenitoras Hematopoyéticas

CTH: Células Troncales Hematopoyéticas

MO: Médula Ósea

SCU: Sangre de Cordón Umbilical

SNC: Sistema Nervioso Central

SPM: Sangre Periférica Movilizada

Introducción

Han transcurrido ya 25 años desde que se realizó el primer trasplante de Células Troncales Hematopoyéticas (CTH/CPH) de Sangre de Cordón Umbilical (SCU) para tratar a un niño con anemia de Fanconi utilizando la SCU de su hermana. Sin embargo, son pocos los pacientes que tienen un hermano recién nacido compatible. Es por esto que surge la creación del primer Banco de Cordón Umbilical (BCU) en el año de 1992, en la ciudad de Nueva York [1]. Desde entonces, se ha demostrado las ventajas de las CTH/CPH provenientes de la SCU en comparación al uso de las CTH/CPH provenientes de Médula Ósea (MO) y de Sangre Periférica Movilizada (SPM), entre las que podemos mencionar: a) la extracción no dolorosa y sin riesgo para la madre ni al recién nacido; b) no se requiere la completa compatibilidad con el receptor, c) existe una gran cantidad de donadores potenciales y d) disponibilidad inmediata [1].

El progreso en el trasplante con CTH/CPH ha sido resultado de los avances alcanzados inicialmente en la investigación básica para su posterior aplicación en la investigación clínica. El conocimiento adquirido ha permitido expandir el uso de la CTH/CPH provenientes de SCU en diferentes patologías. Sin embargo, es necesario continuar con las investigaciones, tanto *in vitro* como *in vivo* para su posterior aplicación futura. En esta revisión se hace mención sobre los avances en el conocimiento y aplicación de las CTH/CPH provenientes de SCU, con atención al estado actual sobre este tema en México.

Estado actual de los estudios *in vivo* e *in vitro* en el uso de CTH/CPH de sangre de cordón umbilical

A raíz del descubrimiento de desórdenes oncohematológicos y otras patologías en la población humana así como el creciente éxito en el trasplante de CTH/CPH obtenidas de SCU, existe la necesidad de continuar con las investigaciones alrededor del uso de las CTH/CPH. El empleo de modelos animales (*in vivo*) e *in vitro* (cultivos celulares) para el estudio de las CTH/CPH ha permitido ahondar en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en el comportamiento, movilización, diferenciación y desarrollo, con el objetivo de puntualizar mejores estrategias que permitan conocer aspectos aun no bien definidos. En esta sección se abordan las recientes evidencias de los estudios a

nivel de laboratorio que han sido realizados en pro del avance científico alrededor del estudio de las CTH/CPH.

Estudios *in vivo*

Actualmente, los modelos animales de laboratorio son herramientas que por excelencia, han sido empleadas antes de su aplicación en la clínica. Diversos modelos han sido utilizados en el estudio de CTH/CPH obtenidas de SCU, dentro de estos los más recurridos se encuentran los ratones inmunocomprometidos o irradiados y los conejos inmunocompetentes. En la tabla 1 se muestran los diferentes modelos animales y el estudio en los que han sido empleados así el aporte que tienen en los estudios a nivel clínico. En base a estos estudios realizados se ha podido esclarecer los mecanismos que conducen a la colonización, expansión y regulación del desarrollo hematopoyético. En los estudios realizados por Amberg y col., se logró demostrar que la infusión vía aortica presenta mayor eficacia en el éxito del injerto de CTH/CPH. Estos estudios sientan las bases de estudios a nivel clínico [3]. Por otro lado, Su y col., demostraron en ratones (NOD/SCID), una mejor capacidad de injerto y la reconstitución multi-linaje, utilizando células cultivadas en presencia de BMP-2 y BMP-7 a diferentes dosis sobre la expansión, esto comparado con células cultivadas en condiciones estándar [4]. Los resultados obtenidos pueden ayudar a mejorar los sistemas de cultivo existentes.

Arien Zacay y col., estudiaron el efecto neuroterapéutico, utilizando una dosis única de CTH/CPH vía intravenosa (IV) en modelo de ratón, demostrando una mejoría en el déficit neuroconductual, ampliando así la ventana terapéutica para el tratamiento de la lesión cerebral traumática [5].

Estudios *in vitro*

Los cultivos celulares son y han sido las herramientas primordialmente empleadas en los estudios de diferenciación y desarrollo de CTH; así como para conocer los mecanismos moleculares implicados en los procesos de diferenciación y comportamiento a estímulos externos. (Tabla 2).

El empleo de ciertas citosinas hematopoyéticas, factores de crecimiento, células estromales (ejem. Células Troncales Mesenquimales) y morfogenos han demostrado que pueden ayudar a mejorar los sistemas de cultivo existentes para su posterior uso en la clínica.

Uso terapéutico de las células provenientes de SCU

Los avances en la investigación básica en materia de trasplantes en modelos animales, han permitido aplicarlo en ensayos clínicos controlados, en diferentes patologías. En el caso de la terapia celular, diversas investigaciones han demostrado que la administración intralesional o intravenosa de las células

provenientes de SCU sin ninguna manipulación *ex vivo* podrían tener un papel potencial para regeneración de tejido dañado [12-15].

Tabla 1. Estudios recientes en materia de células hematopoyéticas de SCU utilizando modelos in vivo.

Modelo animal	Estudio realizado	Referencia
Ratones inmunocomprometidos	Identificación de moléculas químicamente relacionadas que estimulan la expansión <i>ex vivo</i> de células de sangre de cordón capaces de reconstituir la hematopoyesis humana durante al menos 6 meses en ratones inmunocomprometidos.	[2]
Ratones	Estudio del éxito en el trasplante células de cordón umbilical de forma supraselectiva intraarterial (vía aorta) en la arteria iliaca en ratones.	[3]
Conejos	Estudio del éxito en el trasplante células de cordón umbilical de forma supraselectiva intraarterial en la arteria femoral (FNA) en conejos.	[3]
Ratones irradiados inmunodeficientes	Evaluación del potencial hematopoyético en la reconstitución de las células CD34+ derivadas de cordón umbilical tratados con proteínas morfogénicas óseas.	[4]
Ratones	Estudios de efectos neuroterapéuticos de las células troncales hematopoyéticas en ratones después de lesión cerebral traumática.	[5]
Ratones inmunodeficientes	Expansión eficaz de células troncales hematopoyéticas humanas injertadas en la médula ósea de ratones que expresan inmunodeficiencias.	[6]

Tabla 2. Estudios recientes en materia de células hematopoyéticas de SCU utilizando modelos in vitro.

Modelo	Estudio realizado	Referencia
Células troncales hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical humano	Los efectos de la 1,25-dihidroxitamina D3 en el desarrollo de células in vitro NK humano a partir de células troncales hematopoyéticas.	[7]
	Comportamiento <i>in vitro</i> de células troncales de cordón umbilical basado en mínimas condiciones de crecimiento de citoquinas.	[8]
	Estudio de los efectos individuales y combinados de las células estromales mesenquimales y citocinas sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de las células hematopoyéticas a partir de sangre de cordón.	[9]
	En efectos in vitro de las células del estroma que expresan diferentes niveles de Jagged-1 y Delta-1 sobre el crecimiento de células CD34+ a partir de sangre del cordón umbilical humano	[10]
	Estudio de la cinética de hematopoyesis en cultivos a largo plazo tipo Dexter de umbilical humana de Sangre de Cordón	[11]

Recientemente, se reportaron varios estudios donde utilizaron el trasplante de CTH/CPH autólogas en miocardio en pacientes con enfermedades cardiovasculares obteniendo

buenos resultados [15-17 Veinticuatro pacientes con angina de pecho que estaban bajo tratamiento médico óptimo y que no fueron candidatos a revascularización mecánica, participaron en un estudio doble ciego, controlado dirigido por Losordo y col [16] utilizando células CD34+, Identificaron las regiones isquémicas pero viables de miocardio para la inyección de las células. En este estudio concluyeron que la inyección intramiocárdica de células CD34 + autólogas en pacientes con angina intratable proporciona evidencia de viabilidad, seguridad y bioactividad. Povsic y col. [17] ampliaron dicho estudio en 444 pacientes, obteniendo resultados similares. En otro estudio piloto de Losordo y colaboradores utilizaron trasplante autólogo por inyección intramuscular de CTH/CPH en pacientes con isquemia crítica de las extremidades. El estudio reportó que el tratamiento con CTH/CPH reduce las tasas de amputación en pacientes que recibieron dosis altas de tratamiento (P=0.137) hasta a un 22% [18].

En otros estudios se ha observado que el trasplante de CTH/CPH provenientes de SCU ha sido particularmente eficaz en el tratamiento de niños menores a los dos años de edad con ciertos errores innatos del metabolismo, como la mucopolisacaridosis, el síndrome de Hurler y leucodistrofias, como la enfermedad de Krabbe [19-21]. Escolar y colaboradores, utilizando trasplante de CTH/CPH de SCU de donantes no emparentados en recién nacidos con la enfermedad de Krabbe, observaron un cambio favorable en la historia natural de la enfermedad en pacientes asintomáticos, mientras que en los bebés sintomáticos no se observó una mejoría neurológica sustantiva [22]. En estos pacientes el uso de las CTH/CPH de SCU proporciona una forma de terapia de reemplazo mediante la producción de la enzima faltante o defectuosa.

Otro ensayo clínico utilizando SCU autólogo en niños menores de 5 años con diabetes tipo 1 observando un mejor control y manejo de la glucosa en sangre, con la retención de la producción endógena de insulina [23] sin preservar el péptido C [24].

El estudio se diseñó como un estudio de observación de 2 años de los efectos del trasplante autólogo utilizando SCU de los niños con diabetes tipo 1. Cada niño fue seguido cada 3 meses durante el primer año post-infusional y posteriormente cada 6 meses. Se obtuvo muestra de sangre de cada paciente para estudios metabólicos e inmunológicos en cada visita. Tiempo de diagnóstico de tipo 1 diabetes significa umbilical infusión de sangre de cordón fue de 6 meses. Dichos ensayos clínicos sugieren que la infusión de CTH/CPH de SCU puede apoyar tanto en el mantenimiento y regeneración de islotes, así como la restauración del sistema inmune aberrante, pero reconocen que es necesario evaluar por más tiempo a los participantes con el fin de obtener información concluyente de

la eficacia de la infusión autóloga de sangre de cordón umbilical en la diabetes tipo 1 [23].

Por otro lado, la presencia de células mesenquimales en la SCU y MO, también han sido empleadas en ensayos clínicos, en pacientes adultos con enfermedades neurológicas degenerativas o daño de la médula espinal; sin embargo, se han observado mejores resultados en la aplicación terapéutica hematológica en niños en la restauración de funciones de los tejidos dañados en pacientes con diabetes, con encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal, autismo y parálisis cerebral [25-28].

En el caso de las lesiones hepáticas, Zhang y colaboradores [29] realizaron un ensayo clínico en 30 pacientes con hepatitis B crónica los cuales recibieron una transfusión de células mesenquimales derivadas de SCU. En dicho estudio no se observaron efectos secundarios o complicaciones significativas. Sin embargo, se observó una mejoría en la función hepática y la ascitis disminuyó significativamente. La terapia con MSC derivada de SCU también ha sido segura y beneficiosa en el tratamiento de los pacientes con insuficiencia hepática aguda asociada con la infección del virus de hepatitis B. Las transfusiones de MSC derivadas de SCU han aumentado de manera significativa las tasas de supervivencia en los pacientes [30].

La regeneración de la microvasculatura pulmonar es una estrategia terapéutica prometedora para restaurar la hemodinámica pulmonar en pacientes con hipertensión arterial pulmonar (HAP) avanzada. La evidencia en modelos experimentales de enfermedad vascular pulmonar ha sugerido que las MSC puede también inducir la regeneración de los microvasos pulmonares. La administración de MSC puede ser una opción terapéutica para la HAP [31]. A pesar de los avances en la biología de las células troncales, aún existen una serie de obstáculos que hay que superar, incluyendo la dificultad de expansión *ex vivo*, la baja eficiencia de mantenimiento después del trasplante (<5% de las células trasplantadas se conservan después de trasplante), y su destino incierto *in vivo* [32].

Para algunos de los campos de la terapia celular, el paso de la investigación pre-clínica a la práctica clínica requiere del suministro eficaz de células para el paciente humano. Para el tratamiento de algunas enfermedades, se requiere de la innovación en enfoques terapéuticos. Por ejemplo, las CTH se trasplantan generalmente a pacientes humanos a través de la infusión por vía intravenosa (VI), la misma ruta usada en estudios con roedores, mientras, que en el tratamiento a nivel de sistema nervioso central no se presenta dicho acceso conveniente para el traspaso celular o un entorno permisivo para la distribución de células por difusión y hemodinámica. La barrera hemato-encefálica es el mayor obstáculo para el suministro de la terapia celular desde el compartimiento

intravascular, por lo que los avances de las investigaciones en el tratamiento de las enfermedades a nivel de sistema nervioso como el Alzheimer y el Parkinson permanecen en etapa pre-clínica. Uno de los grandes problemas que presenta la terapia celular en este tipo de enfermedades es el tamaño celular, las cuales son mucho más grandes que el poro del tejido del SNC. Con la inyección de una suspensión celular, las células son más propensas a permanecer dentro del espacio potencial creado por la deformación mecánica de la cánula de inyección que se utiliza para introducir dichas células, mientras que el fluido portador se dispersa en todo el intersticio [33]. A menos que se pueda "aleccionar" células para migrar a través del espacio intersticial para dispersar específicamente dentro de la región de destino, se debe desarrollar dispositivos quirúrgicos y técnicas para que "manualmente" se puedan distribuir los injertos celulares [34]. Los avances en la investigación de la biología celular han demostrado que ciertas células troncales por sí mismas pueden tener la capacidad innata para migrar a las regiones dañadas dentro del cerebro, [34-37] y tal vez, algún día, podrán utilizarse en la terapia dirigida. Es necesaria la estrecha colaboración de la comunidad científica básica y comunidad clínica para facilitar el paso de la investigación preclínica a la terapia clínica.

Aplicación clínica de las CTH/CPH de SCU

La SCU es considerada como una fuente rica de CTH/CPH, importante para su uso en el trasplante de células hematopoyéticas. Las CTH/CPH de SCU tiene la capacidad de dar lugar a tejido hematopoyético, epitelial, tejidos endoteliales y neuronales. Recientemente, la aplicación de la terapia celular utilizando SCU ha extendido su utilidad clínica, en particular, mediante el uso de CTH/CPH de SCU autóloga en niños con enfermedades hematológicas malignas o no malignas, enfermedades hereditarias, metabólicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades neurológicas [1, 38-45].

Sin embargo, la dosis baja de células disponible en las unidades SCU es la principal limitación de su uso generalizado en pacientes adultos con neoplasias malignas hematológicas. No obstante, el trabajo realizado por Brunstein y colaboradores en 2010 estableció firmemente la posibilidad de combinar dos unidades de SCU, para superar la limitación de celularidad en la realización de trasplante único en los pacientes adultos [40]. En la tabla 3 se muestra el uso actual más frecuente de la SCU en la terapia clínica.

Expectativas del uso de las células troncales en México

El uso de las células troncales en México ha provocado gran expectación en nuestra sociedad en general y en nuestra comunidad científica, en particular, hoy en día, por la difusión por radio, televisión oímos hablar frecuentemente de las

Tabla 3. Indicaciones terapéuticas frecuentes de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS	ENFERMEDADES NO ONCOLÓGICAS
Leucemias agudas <ul style="list-style-type: none"> -Leucemia bifenotípica Aguda -LLA -LMA -Leucemia indiferenciada 	Hematoglobinopatias <ul style="list-style-type: none"> -anemia aplásica -Citopenia congénita -Hemoglobinuria paroxística nocturna -Trombocitopenia congénita -Amegacariocitosis -linfocitosis hemofagocítica
Leucemias crónicas <ul style="list-style-type: none"> -LLC -LMC -LMCJ -LMMJ 	
Síndromes Mielodisplásico <ul style="list-style-type: none"> -Amiloidosis -LMMC -Anemias refractarias 	Síndromes de insuficiencia medular <ul style="list-style-type: none"> aplasia medular grave
Desórdenes Mieloproliferativos <ul style="list-style-type: none"> -Mielofibrosis aguda -Trombositopenia esencial -Policitemia vera 	Aplasia medular congénita <ul style="list-style-type: none"> -Disqueratosis conénita -Anemia de Fanconi -Blackfan-Diamond
Desórdenes Linfoproliferativos <ul style="list-style-type: none"> -Linfoma de Hodgkin -Linfoma no Hodgkin -Leucemia prolinfocítica 	Errores del metabolismo <ul style="list-style-type: none"> -Enfermedades peroxisómicas y de depósito lisosómico -Osteopetrosis
Tumores sólidos (neuroblastoma)	Inmunodeficiencias <ul style="list-style-type: none"> -Neutropenia Congénita de Kostmann -Inmunodeficiencia primaria
	Enfermedades autoinmunitarias (Síndrome Evan)

Basado en [38].

“células madre”, de la clonación y principalmente de los bancos de sangre de cordón umbilical. Por otro lado en muy pocos años, el número de científicos trabajando en nuestro país en esta área se ha incrementado considerablemente.

Hace más de 15 años, México entró en esta área de la investigación biomédica a través de la participación y el trabajo de algunos investigadores, que en ese entonces, eran muy pocos, sin embargo a lo largo de este de este tiempo, dichos grupos han crecido y se han fortalecido. La investigación en el tema de las células troncales se inició en México en la década de los 90's. unos de los grupos pioneros y con mayor trayectoria es el del Dr. Luis Covarrubias, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Sus primeros estudios, publicados en 1995, coincidieron con la demostración de la existencia de células troncales neurales en el

cerebro adulto.

El Grupo de Investigación en Hematopoyesis y Células Troncales del IMSS es otro de los grupos con más de 15 años trabajando en esta área. Este grupo está encabezado el Dr. Héctor Mayani, y fue uno de los primeros en demostrar que las CTH de la SCU poseen potencial de proliferación y expansión muy superiores a los de las células hematopoyéticas de sujetos adultos. Estos descubrimientos, impulsaron el uso de la SCU en trasplantes hematopoyéticos en pacientes adultos.

Desde el 2003, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, el Dr. Iván Velasco y la Dra. Diana Escalante-Alcalde, trabajan con células troncales del sistema nervioso central de roedores.

El grupo del Dr. René Drucker, también del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, desde hace varios años ha estado interesado en el estudio de la neurogénesis en el cerebro adulto y las células precursoras neurales que participan en ella.

Dentro de los grupos de investigación interesados en el estudio de las células hematopoyéticas, se encuentra en Dr. Jorge Vela Ojeda, del hospital de especialidades Centro Medico “la Raza” IMSS quien tiene especialidad en Hematología, y está involucrado en la realización los trasplantes alogénicos de células hematopoyéticas en la leucemia mieloblástica aguda, entre otros estudios.

En el Norte y Noroeste del país se han establecidos varios grupos de investigación tales como el grupo del Dr. Oscar González-Pérez (Universidad de Colima) quien trabaja en la caracterización de células neurales adultas de roedores y humanos en el cerebro adulto; los doctores Ortuño Sahagún y Gudiño Cabrera en Guadalajara, que trabajan en la diferenciación de precursores neurales. Por su parte, grupos en Monterrey y San Luis Potosí están buscando establecer nuevas condiciones para el cultivo de CTH/CPH y adipocíticas [46].

El trasplante de CTH/CPH en México

Antes de abordar el tema de los trasplantes en México, es importante definir el concepto de trasplante, así como se mencionan las principales fuentes de obtención de CTH/CPH.

El trasplante de CPH es un procedimiento en el que las CPH son infundidas para restaurar la función de la MO, afectada parcial o completamente por enfermedades propias de la MO o como consecuencia de una alteración secundaria.[47]

Dependiendo del origen de las CPH, los trasplantes pueden ser autólogos o alogénicos.

En el trasplante autólogo, los pacientes reciben sus propias CPH, las cuales deben ser cosechadas antes del acondicionamiento. En el trasplante alogénico, los pacientes reciben las CPH de un individuo de la misma especie, puede provenir de un donador relacionado (familiar) o no relacionado. Actualmente existen tres fuentes de obtención de CTH/CPH: MO, SPM y SCU.

La MO es el principal órgano hematopoyético, y las CTH/CPH se obtienen mediante múltiples punciones en ambas crestas ilíacas posteriores. La duración de una aspiración de MO es de 2 a 3 hrs. El volumen aspirado de MO va de 10 a 20 ml por Kg de peso del donador. La dosis requerida para su uso es de 2.5×10^8 células nucleadas por Kg de peso del receptor.

La SPM se obtiene después de la mielosupresión inducida por quimioterapia y del uso de factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF) que incrementan en número de CTH/CPH en circulación. La colección de gran número de células mononucleares de SPM es posible gracias al desarrollo de procedimientos de aféresis.

La SCU o también llamada sangre placentaria, es obtenida después del alumbramiento (normal o cesaría), en mujeres sanas. La SCU se emplea principalmente en pacientes pediátricos, aunque en los últimos años empieza a ser utilizada también en adultos.

Los primeros trasplantes de MO en México fueron realizados en la década de los 80's, por los doctores Ricardo Sosa Sánchez del Instituto Nacional de la Nutrición (INN-SZ) y Manuel Morales Polanco, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) [48,49]. En la década de los 90's los trasplantes hematopoyéticos cobraron interés por parte de las instituciones médicas mexicanas, siendo el IMSS es la institución mexicana que hoy en día ha realizado alrededor del 60% de todos los trasplantes en nuestro país [48]. En el año 1999 se dio inicio a un programa denominado TANM (Trasplantes Alogénicos No Mieloablativos) en Monterrey y Puebla usando un esquema novedoso, accesible y de bajo costo, que emplea fludarabina, ciclofosfamida y busulfán, este programa ha demostrado ser útil para trasplantes en niños y adultos y han observados resultados similares a lo de los esquemas tradicionales de

acondicionamiento pretrasplante. Debido a las ventajas de este programa varias instituciones del país (Centro Médico la Raza del IMSS y el Instituto Nacional de Cancerología) lo usan y se ha adoptado como método de referencia por el grupo LACOHG (Latin-American Cooperative Onco-Hematology Group). [50]

En cuanto al trasplante de SCU, la experiencia en México es todavía poco común. Este tipo de trasplantes se realiza en contadas instituciones, sin embargo, es importante destacar que esta práctica va en aumento. Las instituciones que han llevado a cabo trasplantes de SCU son el Hospital Universitario de Monterrey, el Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, Hospital Ángeles de Puebla, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Instituto Nacional de Cancerología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Nacional de Pediatría, Hospital Civil de Guadalajara, Hospital ABC, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Dr. Salvador Zubirán".

En nuestro país se cuentan con 4 bancos públicos de importancia nacional tales como en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS), Centro Médico Nacional "la Raza" del IMSS, Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE). El Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, cuenta con el banco de SCU con un inventario de más de 1000 USCU disponibles para trasplantes y ha entregado más de 300 unidades de las cuales el 80% de los receptores fueron pediátricos, siendo la leucemia linfocítica aguda la enfermedad más frecuente [51].

Conclusión

El trasplante de CTH/CPH provenientes de SCU es una opción terapéutica, con varias probables aplicaciones que aún se encuentran en estudio. En la actualidad la SCU es la principal fuente de CTH/CPH empleada para el tratamiento de desórdenes onco-hematológicos. Los avances en la caracterización y expansión de las CTH/CPH presentes en la SCU han permitido ampliar su aplicación en trasplantes pediátricos y no pediátricos. Los verdaderos alcances de sus beneficios o complicaciones en su empleo aún faltan por determinarse, sin embargo, la accesibilidad de las células más primitivas y el uso de los modelos *in vitro* e *in vivo* han permitido definir algunos de los mecanismos que intervienen en la regulación de los patrones de diferenciación temprana de las CTH/CPH.

Bibliografía

1. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995; 346:214-9.
2. Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, Gingras S, Ruel R, Mayotte N, Csaszar E, Knapp DJ, Miller P, Ngom M, Imren S, Roy DC, Watts KL, Kiem HP, Herrington R, Iscove NN, Humphries RK, Eaves CJ, Cohen S, Marinier

- A, Zandstra PW, Sauvageau G. Cord blood expansion. Pymidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science*. 2014; 345:1509-12.
3. Arnberg F, Lundberg J, Kenne E, Jaff N, Müller P, Nava S, Kaibe H, Ringdén O, Holmin S. Superselective intra-arterial umbilical cord blood administration to BM in experimental animals. *Bone Marrow Transplant*. 2014. doi: 10.1038/bmt.2014.190.
 4. Su YH, Cai HB, Ye ZY, Tan WS. BMP-7 improved proliferation and hematopoietic reconstitution potential of ex vivo expanded cord blood-derived CD34+ cells. *Hum Cell*. 2014 [Epub ahead of print]
 5. Arien-Zakay H, Gincberg G, Nagler A, Cohen G, Liraz-Zaltsman S, Trembovler V, Alexandrovich AG, Matok I, Galski H, Elchahal U, Lelkes PI, Lazarovici P, Shohami E. Neurotherapeutic effect of cord blood derived CD45+ hematopoietic cells in mice after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014; 31:1405-16.
 6. Negishi N, Suzuki D, Ito R, Irie N, Matsuo K, Yahata T, Nagano K, Aoki K, Ohya K, Hozumi K, Ando K, Tamaoki N, Ito M, Habu S. Effective expansion of engrafted human hematopoietic stem cells in bone marrow of mice expressing human. *Jagged.Exp Hematol*. 2014;42:487-94
 7. Weeres MA, Robien K, Ahn YO, Neulen ML, Bergerson R, Miller JS, Verneris MR. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin d3 on in vitro human NK cell development from hematopoietic stem cells. *J Immunol*. 2014 193:3456-62.
 8. Mantri S, Mohapatra PC. In-vitro Behavior of Human Umbilical Cord Blood Stem Cells Towards Serum Based Minimal Cytokine Growth Conditions. *Indian J Clin Biochem*. 2014; 29:279-89.
 9. Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Martínez-Jaramillo G, Fernández-Sánchez V, Valencia-Plata I, Alarcón-Santos G, Mayani H. Individual and combined effects of mesenchymal stromal cells and recombinant stimulatory cytokines on the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Cytotherapy*. 2009; 11:886-96.
 10. Fernández-Sánchez V, Pelayo R, Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Villanueva-Toledo J, Garrido E, Ruiz-Sánchez E, Alvarez-Sanchez E, Mayani H. 2011. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood. *Blood Cells Mol Dis*. 2011; 47:205-13.
 11. Mayani H, Gutiérrez-Rodríguez M, Espinoza L, López-Chalini E, Huerta-Zepeda A, Flores E, Sánchez-Valle E, Luna-Bautista F, Valencia I, Ramírez OT. 1998. Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem Cells*. 1998;16:127-35.
 12. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995;346:214-9.
 13. Mathieu M, Bartunek J, El Oumeiri B, Touihri K, Hadad I, Thomam P, et al. Cell therapy with autologous bone marrow mononuclear stem cells is associated with superior cardiac recovery compared with use of nonmodified mesenchymal stem cells in a canine model of chronic myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138:646-53.
 14. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001;32:2682-8.
 15. Xiao J, Nan Z, Motooka Y, Low WC. Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. *Stem Cells Dev* 2005;14: 722-33.
 16. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007; 115: 3165-3172.
 17. Povsic TJ, Junge C, Nada A, Schatz RA, Harrington RA, Davidson CJ, Fortuin FD, Kereiakes DJ, Mendelsohn FO, Sherman W, Schaer GL, White CJ, Stewart D, Story K, Losordo DW, Henry TD. A phase 3, randomized, double-blinded, active-controlled, unblinded standard of care study assessing the efficacy and safety of intramyocardial autologous CD34+ cell administration in patients with refractory angina: design of the RENEW study. *Am Heart J* 2013; 165: 854-861. e2
 18. Losordo DW, Kibbe MR, Mendelsohn F, Marston W, Driver VR, Sharafuddin M, Teodorescu V, Wiechmann BN, Thompson C, Kraiss L, Carman T, Dohad S, Huang P, Junge CE, Story K, Weistroffer T, Thorne TM, Millay M, Runyon JP, Schainfeld R A randomized, controlled pilot study of autologous CD34+ cell therapy for critical limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012;5:821-30.
 19. Prasad VK, Kurtzberg J. Emerging trends in transplantation of inherited metabolic diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 41:99-108.
 20. Staba SL, Escolar ML, Poe M, et al. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med*. 2004; 350:1960-1969.
 21. Boelens JJ, Wynn RF, O'Meara A, et al. Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation for Hurler's syndrome in Europe: A risk factor analysis for graft failure. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40:225-33.
 22. Escolar ML1, Poe MD, Provenzale JM, Richards KC, Allison J, Wood S, Wenger DA, Pietryga D, Wall D, Champagne M, Morse R, Krivit W, Kurtzberg Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *J. N Engl J Med* 2005;352: 2069-81.
 23. Haller MJ, Wasserfall CH, McGrail KM, Cintron M, Brusko TM, Wingard JR, et al. Autologous umbilical cord blood transfusion in very young children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32: 2041-6.
 24. Haller MJ, Wasserfall CH, Hulme MA, Cintron M, Brusko TM, McGrail KM, et al. Autologous umbilical cord blood transfusion in young children with type 1 diabetes fails to preserve C-peptide. *Diabetes Care* 2011;34:2567-9.
 25. Zhao F, Qu Y, Liu H, Du B, Mu D. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells co-modified by TERT and BDNF: A novel neuroprotective therapy for neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Dev Neurosci*. 2014 Jul 3.
 26. Momin EN, Mohyeldin A, Zaidi HA, Vela G, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal stem cells: new approaches for the treatment of neurological diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;5:326-44.
 27. Phinney DG, Isakova IA. Mesenchymal stem cells as cellular vectors for pediatric neurological disorders. *Brain Res*. 2014 Jul 21;1573:92-107
 28. Lee YH, Choi KV, Moon JH, Jun HJ, Kang HR, Oh SI, et al. Safety and feasibility of countering neurological impairment by intravenous administration of autologous cord blood in cerebral palsy. *J Transl Med* 2012;10:58.
 29. Zhang Z, Lin H, Shi M, Xu R, Fu J, Lv J, Chen L, Lv S, Li Y, Yu S, Geng H, Jin L, Lau GK, Wang FS. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 Suppl 2: 112-120.
 30. Shi M, Zhang Z, Xu R, Lin H, Fu J, Zou Z, Zhang A, Shi J, Chen L, Lv S, He W, Geng H, Jin L, Liu Z, Wang FS. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1: 725-731.
 31. Wang XX, Zhang FR, Shang YP, et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with

- idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1566–71.
32. Gombert-Maitland M, Bull TM, Saggat R, Barst RJ, Elgazayerly A, Fleming TR, Grimminger F, Rainisio M, Stewart DJ, Stockbridge N, Ventura C, Ghofrani AH, Rubin LJ. New trial designs and potential therapies for pulmonary artery hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62.
 33. Nicholson C. Diffusion and related transport mechanisms in brain tissue. *Rep Prog Phys* 2001;815–84.
 34. Potts MB, Silvestrini MT, Lim DA. Devices for cell transplantation into the central nervous system: Design considerations and emerging technologies. *Surg Neurol Int* 2013;19;22-30.
 35. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: Evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:12846–51.
 36. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 2009; 27:2614-23
 37. Motani H, Schichor C, Lah TT. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer* 2010; 116:2519–30.
 38. Flores-Guzmán, Fernández Sánchez. Sangre de cordón umbilical: Biología, almacenamiento y trasplante clínico. Cap. VIII de Células troncales y medicina regenerativa. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México 2011; 206-207.
 39. Boelens JJ. Trends in haematopoietic cell transplantation for in born errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:413-20.
 40. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, Defor TE, Gooley TA, Verneris MR, Appelbaum FR, Wagner JE, Delaney C. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* 2010; 116: 4693-4699.
 41. Jensen A. Autologous cord blood therapy for infantile cerebral palsy: from bench to bedside. *Obstet Gynecol Int.* 2014; 2014:976321.
 42. Kanate AS, Pasquini MC, Hari PN, Hamadani M. Allogeneic hematopoietic cell transplant for acute myeloid leukemia: Current state in 2013 and future directions. *World J Stem Cells.* 2014 Apr 26;6(2):69-81.
 43. Christopheit M1, Kröger N, Haferlach T, Bacher U. Relapse assessment following allogeneic SCT in patients with MDS and AML. *Ann Hematol.* 2014 Jul;93(7):1097-110. doi: 10.1007/s00277-014-2046-8. Epub 2014 Mar 27.
 44. Mukherjee S1, Boccaccio D2, Sekeres MA3, Copelan E4. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndromes: Lingering Uncertainties and Emerging Possibilities. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Jul 29.
 45. Momin EN, Mohyeldin A, Zaidi HA, Vela G, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal stem cells: new approaches for the treatment of neurological diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;5: 326-44.
 46. Mayani H, Lamas Mónica, Velasco I. Células Troncales y medicina regenerativa en México. Cap. XVI de Células troncales y medicina regenerativa. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México 2011; 347-355.
 47. Gaytán-Morales F. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en Pediatría. *Gaceta Mexicana de Oncología* 2003; 12(3):174-181
 48. Mayani H. Trasplante de células hematopoyéticas. Cap. X de Células troncales y medicina regenerativa. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México 2011;239-253.
 49. León-Rodríguez E. Hematopoietic stem-cell transplantation: a long way from animal models to a standard treatment in human. *Rev. Invest. Clín* 2005;57:129-131.
 50. Ruiz-Argüelles G. Historia del trasplante de médula ósea en México. *Rev. Biomed* 2005; 16:207-213.
 51. http://cnts.salud.gob.mx/interior/bscu_estadi.html



COMUNICACIÓN CIENTÍFICA

Instrucciones para los autores

La Revista Médica de la Universidad Veracruzana es el órgano oficial del Instituto de Ciencias de la Salud, Hospital Escuela y Facultad de Medicina-Xalapa. Es un foro abierto a científicos, médicos, investigadores, docentes, estudiantes y otros profesionales de la salud que deseen expresar y compartir experiencias en temas desarrollados por esta comunidad de científicos. Se edita semestralmente, e incluye: editoriales, artículos originales, especiales, de revisión bibliográfica, comunicaciones breves, comentarios, cartas al editor, reportes de casos clínicos, reporte de artículos publicados, una sección de historia de la medicina, arte y medicina y un vocabulario inglés-español de términos médicos. Debido a lo multidisciplinario de estos temas, se cubre una amplia gama de actividades médicas, procedimientos de laboratorio y actividades desarrolladas en las facultades y hospitales. Los editoriales sólo se considerarán por invitación.

La aceptación de publicar un trabajo es decisión exclusiva del comité editorial. Los manuscritos deben acompañarse de una carta cediendo los derechos editoriales a la revista, asegurando que no han sido publicados en otras revistas; ninguna publicación parcial o total del material enviado puede ser publicada o empleada en otro sitio sin autorización expresa de la revista. Los artículos en inglés deben ser previamente revisados por un corrector de estilo que tenga experiencia en el campo médico y/o biológico; en caso necesario en la oficina de la Revista se pueden obtener nombre y dirección de algunos expertos.

Toda correspondencia o escrito debe dirigirse a:

Revista Médica de la Universidad Veracruzana

Instituto de Ciencias de la Salud.

Av. Dr. Luis Castelazo Ayala s/n.

Col. Industrial las Ánimas.

C. P. 91190, Xalapa, Veracruz, México.

Tel. (228)8418925, fax (228)8418926.

Correos electrónicos: revista_medica@uv.mx

rev_meduv@hotmail.com

Todos los manuscritos deberán enviarse en original y dos copias, acompañados de un disquete o CD que contenga la versión original en Microsoft Word, con letra Times New Roman 11, a doble espacio, en papel blanco tamaño carta por una sola cara, y las figuras en archivos JPG.

Cada sección o componente del manuscrito debe iniciar en una nueva página siguiendo la siguiente secuencia: (1) página del título, (2) resumen y palabras clave, (3) texto, (4) agradecimientos, (5) referencias, (6) cuadros (cada uno en una página con su título y pies por separado en otra hoja) y (7) pies de figuras. Todas las páginas deben ir numeradas, incluyendo la página del título, cuadros, figuras y referencias. Deben incluirse los permisos para reproducir material publicado previamente o para ilustraciones que puedan identificarse a alguna persona.

Página del título

El título deberá escribirse en español e inglés. En esta sección deben incluirse los nombres completos de los autores, grados académicos sin abreviaturas, la institución a la que pertenecen y fuentes de apoyo recibido. En la parte inferior debe señalarse nombre, dirección, apartado postal y teléfono, así como correo electrónico del autor responsable, a quien se le enviará cualquier notificación, pruebas de galeras y solicitud de sobretiros.

Resumen y palabras clave

Artículos originales: el resumen y el *abstract* deben ser menores de 250 palabras y deberán estructurarse con los subtítulos: introducción, objetivos, material y métodos, resultados y conclusiones. Al final debe incluirse una lista de tres a cinco palabras consideradas como clave para la publicación.

Artículo de revisión: el resumen y el *abstract* deben ser menores de 250 palabras. Al final debe incluirse una lista de tres a cinco palabras consideradas como clave para la publicación.

Texto

Cada parte debe iniciar en una página por separado manteniendo el siguiente orden: introducción, materiales y métodos, ética, resultados, discusión y, cuando sea necesario, conclusiones y recomendaciones. Aconsejamos evitar la jerga exagerada de la especialidad, así como el abuso de las iniciales. Las instrucciones se presentan de acuerdo con el International Committee of Medical Journal Editors que se publicó en el *Ann Intern Med* 1982; 96: 766-71 y en el *Br Med J*. 1982; 284: 1877-90. Los nombres de equipo y fármacos deben hacer referencia a la compañía con su nombre completo. En caso de medicamentos, los nombres genéricos deben ir seguidos del nombre comercial entre paréntesis.

Bibliografía

Las referencias bibliográficas deben numerarse en el orden que fueron citadas en el texto y usar para su identificación números arábigos como superíndices. La lista de referencias también debe ir a doble espacio. Cuando haya más de 4 autores, se escribirá sólo el nombre del primero seguido por: y cols. Deberán apegarse a las normas del Index Medicus <http://www.encolombia.com/medicina/infectologia/infectologia4100sup-requisitos3.htm>, como es el caso de las abreviaturas de revistas. Las comunicaciones personales y los resultados no publicados deben incorporarse al texto y no como referencias.

Cuadros

Deben contener los resultados más importantes. Sus títulos y pies deben ir en página aparte.

Figuras

Las figuras e ilustraciones deben ir en papel ilustración, papel albanene o equivalente. Las fotografías deben ser impresas en alto contraste, en blanco y negro y ser de tamaño postal (127 x 173 mm). Todas las figuras y fotos deben ir debidamente identificadas en su parte posterior con una etiqueta adherible, no escribir directamente sobre las figuras o fotografías. Toda figura debe ir acompañada de su texto o pie en hoja aparte.

Los artículos aceptados serán sometidos a una revisión editorial que puede incluir, en caso necesario, la condensación del texto, la corrección del estilo y la supresión o adición de cuadros, ilustraciones y anexos, sin modificarse el sentido del artículo.

La aceptación de los artículos será comunicada por escrito a los autores en un periodo no mayor a un mes desde la fecha de recepción. Para ello, deberán indicar claramente la dirección, teléfono, fax, correo electrónico y domicilio donde laboren los autores principales.