

Células madre estromales de sangre menstrual multipotente: aislamiento, caracterización y diferenciación

Amit N Patel^a, Eulsoon Park^a, Michael Kuzman["], Federico Benetti["], Francisco J. Silva^b, Julie G. Allickson^c

^aCentro para terapia de células cardíacas – Instituto quirúrgico de corazón, pulmón, esófago, Universidad de Pittsburg/UPMC/Instituto de medicina regenerativa McGowan, Pittsburgh, PA, USA. ^bFundación Benetti, Rosario, Argentina, ^cCryo-Cell International, Inc. Oldsmar, FL.

Dirija la correspondencia a Amit N Patel MD MS, Director of Cardiac Cell Therapy, The Heart, Lung and Esophageal Surgery Institute, UPMC Presbyterian, McGowan Institute of Regenerative Medicine, 200 Lothrop Street, Suite C 700, Pittsburgh, PA 15213, Oficina: 412-648-6411; Fax: 412-6478681; correo electrónico: patelan@upmc.edu o Julie G Allickson PhD, Vice President of Laboratory Operations and Research & Development, Cryo-Cell International, Inc. 700 Brooker Creek Blvd., Suite 1800, Oldsmar, Florida 34677, Office: 813-749-2100; Fax: 813-749-2207; email: jallickson@cryo-cell.com.

Resumen

La fracción de célula madre estromal de muchos tejidos y órganos ha demostrado propiedades de célula madre, tales como la capacidad de auto regeneración y multipotencia, permitiendo una diferenciación entre distintos linajes. En este estudio, caracterizamos una población novedosa de células madre estromales derivadas de sangre menstrual (MenSCs). Demostramos que MenSCs son fácilmente ampliables a los marcadores de relevancia clínica y multipotencia expresa, tales como Oct-4, SSEA-4 y c-kit a nivel molecular y celular. Además, demostramos la multipotencia de MenSCs al diferenciar direccionalmente las MenSCs en linajes de células condrogénicas, adipogénicas, neurogénicas y cardiogénicas. Estos estudios demuestran la plasticidad de las MenSCs para potencial investigación en medicina regenerativa.

Palabras clave: Sangre menstrual; células madre Estromales; marcadores Multipotentes; diferenciación.

Introducción

Las células madre embrionicas (ESCs) tienen la capacidad totipotente de diferenciarse en cualquier tipo de célula derivada de las tres capas germinales (14, 22). Además, el potencial de teratomas, junto con una disponibilidad limitada de ESCs para uso clínico a gran escala actualmente las limita estrictamente a la investigación científica. Sin embargo, con el vasto número de pacientes con un sinnúmero de enfermedades, se buscan fuentes adicionales de células madre con una aplicación clínica práctica. Muchas otras fuentes de células madre

han sido identificadas y se utilizan en las fases iniciales de los ensayos clínicos, incluyendo ataques al corazón (18), lesión en columna vertebral (17), reparación ósea y de cartílago (24). La fracción de células estromales de varios tejidos y órganos han mostrado multipotencia *in vitro* al diferenciarse en tipos de células neurogénicas, cardiogénicas, osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas (4, 6, 23, 24, 26). El hecho de que las células estromales se puedan diferenciar en linajes ectodérmicos y mesodérmicos valida aún más su multipotencia. Aquí la pregunta entonces es si existe una fuente de células madre estromales multipotentes que se pueda obtener de forma segura y rutinaria, de forma renovable, de forma que se mantenga la potencia de diferenciación y que sea escalable para uso clínico. Recientemente las células estromales han sido identificadas en tejido endométrico (3,19). Sin embargo, obtener estas células directamente sería un procedimiento sumamente invasivo. El revestimiento endométrico del útero cuenta con una capacidad sorprendente de regeneración. Durante cada ciclo menstrual existe un vasto crecimiento de tejido y vasos sanguíneos, que se elimina al final del ciclo. El tejido y la sangre eliminados contienen una población heterogénea de células entre las que se incluyen algunas con capacidad regenerativa (5). Las células estromales uterinas cuentan con marcadores multipotentes similares que se encuentran comúnmente en las células madres mesenquimáticas de la médula ósea y de hecho se pueden originar en parte de la médula ósea (12, 20, 21). Marcadores importantes para determinar multipotencias son el Oct-4 y el SSEA-4, mismos que se encuentran expresados en muchas células madre multipotentes y pluripotentes, incluyendo ESCs junto con el marcador superficial de células c-kit (CD 117) (8, 10, 25). Para poder evaluar la practicidad de obtener células madre multipotentes del útero en una forma segura y reproducible, analizamos la sangre y el tejido menstrual desechado para identificar células estromales (MenSCs). En este documento presentamos una población novedosa de MenSCs que expresan los marcadores

multipotentes Oct-4, SSEA-4 y c-kit, junto con su capacidad de ser diferenciadas direccionalmente *in vitro* en distintos linajes de células derivados del mesodermo y ectodermo, y su capacidad para ampliarse fácilmente.

Materiales y métodos:

Obtención y procesamiento de las células: Se obtuvo una muestra de células endométricas/menstruales utilizando un Divacup (Kitchener, ON) durante los primeros días del ciclo menstrual. Las células se cosecharon con el consentimiento informado de la donante, según sea aprobado por un consejo de revisión institucional. Las células se transfirieron en una solución salina regulada con fosfato y con penicilina/estreptomicina y heparina. La muestra se envió a 4°C hasta llegar al laboratorio de procesamiento dentro de las 24 - 48 horas siguientes a su obtención. La muestra se centrifugó y se evaluó el sobrenadante para observar bacterias. Las células se cultivaron.

Método de cultivo de las células: Las células se cultivaron con Medios completos de Chang y se sembraron en un matraz de cultivo para obtener células adherentes [19]. Los Medios completos de Chang están compuestos de medios alfa MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), Chang B (basal) (18% v/v) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), medio Chang C para Suplemento C106 (2% v/v) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) Penicilina/sulfato de Estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA), L-glutamina a 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA), Suero bovino fetal (15% v/v) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se cultivaron durante 7 días, momento en que se cambiaron los medios. En el día 10 las células se subcultivaron utilizando TrypLE Express (Invitrogen) y se obtuvieron 50,000 células. Las células se

subcultivaron hasta el pasaje cinco, momento en el cual las células se procesaron por selección positiva para el c-kit⁺ (CD117) que se realizó con cuentas Micromagnéticas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes utilizando anticuerpos monoclonales CD117 antihumanos de ratón purificados (IgG1) con clon 104D2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Se procesaron diez millones de células, con 900,000 células en la fracción positiva que se cultivó. Las células c-kit⁺ (CD117) se subcultivaron después con 3 pasos adicionales en medios MSC-BM (Lonza, Basilea, Suiza). Las células se subcultivaron utilizando 0.25% de tripsina (Invitrogen) y se cultivaron en matraces y placas sembrados a 5000 – 7000 células/cm². Los medios se cambiaron cada 2 – 3 días entre los pasos después de los primeros 7 días de cultivo.

Análisis de cariotipo: El análisis de cariotipo se llevó a cabo en Cell line Genetics (Madison, WI) mediante el protocolo citogenético estándar. Se prepararon un total de 50 metafases por método de secado por aire y se tiñeron con Tripsina conforme al protocolo de teñido de Wright para producir bandas G.

Extracción de ARN y análisis de RT-PCR: Se aisló el ARN celular total utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA). Se recolectó ARN celular total de aproximadamente 100,000 células por experimento. Para eliminar contaminación de ADN, las muestras se trataron con 2.0 U de DNasa 1 (Invitrogen) a 37° C durante 15 minutos, seguido por inactivación mediante la adición de 2 mM de EDTA 65° C durante 10 minutos. Las muestras se concentraron mediante precipitación de etanol y se volvieron a suspender en agua libre de RNasa. Previo a la síntesis de cADN, las muestras se filtraron para eliminar la contaminación de ADN genómico mediante PCR en controles RT. Se transcribió el Total de ARN dentro del cADN utilizando el kit Omniscript RT y después se purificaron con el kit de purificación

QIAquick PCR (Qiagen Inc.). Para cada reacción de PCR, se utilizó una plantilla de 20 ng de cADN en un volumen de reacción de 25 μ l. con cebadores HotStar Taq Plus y Quantitect (Qiagen Inc.). Todos los blancos se amplificaron a una temperatura de templado de 55° C durante 30 ciclos. Se identificaron productos de amplificación por tamaño en un gel de agarosa al 2%.

Citometría de flujo: Para los análisis de antígeno de superficie celular después del enriquecimiento del c-kit se recolectaron células, se lavaron con un búfer de bloqueo helado (MEM/Hepes + 2% BSA), y se incubaron durante 30 minutos en hielo en un búfer de bloqueo que contiene los anticuerpos específicos para FITC, APC, ficoeritrina (PE), o etiquetados para PECy5. Los anticuerpos para antígenos de la superficie de la célula humana CD9, CD29, CD34, CD38, CD44, CD45, CD49f, CD90, CD105, CD117, CD166, LIN, MHC I, MHC II fueron de Becton, Dickinson y Company, mientras que CD133 se obtuvo de Miltenyi Biotec y SSEA-4 de Chemicon. En todos los experimentos, se utilizaron los anticuerpos correspondientes al isotipo (Becton, Dickinson y Company, Franklin Lakes, NJ) como controles negativos. Se obtuvieron datos (20,000 eventos) utilizando el citómetro de flujo FACS Canto (BD Biosciences, San José, CA) y se analizaron en el software FACS Diva (BD Biosciences).

Diferenciación adipogénica: Las células se colocaron en placas en gelatina al 0.2% (Sigma) a 20,000 células/cm² en un kit de diferenciación adipogénica hMSC Adipogenic Differentiation BulletKit (ADB) (Cambrex, East Rutherford, NJ), los medios ADB consistieron en 1mM dexametasona, 0.5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 10 μ g/ml insulina humana recombinante, 100 mM indometacina y 5% de FBS (Hyclone). Las células se mantuvieron en

el ADB durante 7 días, en medios de mantenimiento adipogénico (AM) ((DMEM-LG/GL (Invitrogen, Carlsbad, CA) + 1 % penicilina/estreptomicina (Invitrogen) + 15% FBS (Hyclone) + 10 μ M insulina (Sigma) durante 3 - 4 días, y después se intercambió de AM a ADB cada 3 - 4 días hasta un total de 20 días.

Diferenciación osteogénica: Las células se colocaron en placas sobre 0.2% de gelatina (Sigma) con 20,000 células/cm² y se trataron con el hMSC Osteogenic Differentiation BulletKit (ODB) (Cambrex), los medios ODB consistieron en 100 nM dexametasona, 10 mM β - glicerofosfato, 0.2 mM ascorbato, y 5% FBS y se mantuvieron en ODB con 1/2 de cambios de medios cada 3 - 4 días durante 20 días.

Diferenciación condrogénica: Las células se colocaron en placas en gelatina al 0.2% a 6000 células/cm² en hMSC Chondrogenic Differentiation BulletKit (CDB) preparado de acuerdo con el protocolo del fabricante (Cambrex) + 1% FBS + 20 ng/ml TGF- β 3 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) que se agregó en fresco. Estas células recibieron cambios completos de medios cada 3 – 4 días durante 14 - 20 días.

Diferenciación neural: Las células se colocan en placas en cubreobjetos cubiertas con fibronectina (BD Biosciences, San Jose, CA) a 10,000 células/cm² en Medio de inducción neural (NIM) consistente en DMEM-F/12 (Invitrogen) + 1 % penicilina/estreptomicina + 2mM Glutamax (Gibco) + 1 x N-2 suplemento (Invitrogen) más la siguiente condición: (1) 10 ng/mL o 100 ng/ml de Factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) durante 4 días, (2) se pasaron 1:2 en 10 ng/mL bFGF + 10 ng/mL Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) + 20 ng/ml de Factor de crecimiento epidérmico (EGF) durante 5 días, y (3) 10 ng/ml

bFGF + 10 ng/ml PDGF excluyendo EGF durante 7 días, totalizando 16 días. Las células se cultivaron en cubreobjetos recubiertas con fibronectina y se hicieron cambios completos de medios cada 2 - 3 días con factores de crecimiento frescos (todos de R&D Systems, Inc.).

Diferenciación cardíaca: Las células se colocaron en placas en gelatina al 0.2% recubiertas con cubreobjetos (VWR) a 30,000 células/cm² y en platos de baja adhesión (Fischer) a 156,000 células/cm² en medio Cardíaco consistente en DMEM-LG + 1 % penicilina/estreptomicina + 2mM Glutamax (Gibco) + 1 % FBS (Hyclone). Después de 2 días, se colocaron en placas los agregados celulares en la monocapa celular. Después de 2 días se cambiaron los medios a medio Cardíaco con 8 μM con 5-aza-2'-deoxicitidina (Aza) o 400 - 800 μM S-Nitroso-N-Acetilpenicilamina (SNAP) (ambos de Sigma). Se realizaron cambios completos de medios con Aza fresca y cambios a la mitad de los medios con SNAP fresco cada 2 - 3 días durante 12 días. Algunos cultivos de MenSCs se indujeron para que sufrieran cardiogénesis al permitir que los cultivos se vieran sobrepoblados, se cambiaron los medios cada 2 - 3 días.

Inmunocitoquímica. Todas las células se fijaron en paraformaldeído al 4% (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT). Las células inducidas adipogénicas se tiñeron para vacuolas de grasa utilizando el kit de tinte rojo cero para aceite (American Master Tech Scientific, Lodi, CA). Brevemente, al poco tiempo se lavaron las células con etanol al 70% (EMD Chemicals Inc., San Diego, CA), se incubaron durante 10 minutos a RT con rojo cero para aceite, y se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer modificada (MMH). Las células inducidas osteogénicamente se tiñeron para detectar depósitos de calcio utilizando rojo alizarin S (Fisher Scientific, Pittsburg,

PA). Poco después, se lavaron las células con 2 volúmenes de agua, se incubaron durante una hora con RT con 0.0075% de rojo de alizarin S (Fisher Scientific) diluido en dH₂O, y contrateñidas con MMH. Las células inducidas condrogénicamente se tiñeron para localizar proteoglucanos sulfatados utilizando azul alciano (Sigma). Poco después se incubaron las células con azul alciano al 1% (Sigma) en 0.1 N HCl (Sigma) durante 1 hora RT (ATA), se lavaron con 1 volumen de 0.1 N HCl (Sigma) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se contratiñeron con HMM. Para el teñido de anticuerpos las células se lavaron en PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT). La solución de bloqueo, PBS/BSA al 2%/Suero de cabra al 10%/Triton X-100 0.2%, se aplicó durante 1 hora a RT seguida por incubación con anticuerpo primario durante la noche a 4 °C. Después de lavar en PBS/Triton X-100, 0.2% de las células se incubaron con un anticuerpo secundario durante 1 h a RT, se lavó en PBS y se montó en medios de montaje Vectashield H-1000. Las células inducidas neuralmente se analizaron utilizando los siguientes anticuerpos primarios: tub-III (1:100), Map2 (1:200), Vimentina (1:500), O4 (1:200) (Chemicon, Temecula, CA), GalC (1:200) (Sigma), y GFAP (1:200) (BD Biosciences). Las células inducidas en medio cardíaco se analizaron utilizando los siguientes anticuerpos primarios: troponina (1:200), conexina 43 (1:200) (Chemicon), y actina cardíaca (1:100) (RDI, Concord, MA). Los núcleos se tiñeron utilizando DAPI (Invitrogen). La especificidad de los anticuerpos se probó usando cultivos de células madre embriónicas humanas y células neurales y cardíacas humanas como controles positivos. Los controles negativos para teñido incluyeron el correspondiente control de isotipo IgG o la omisión del anticuerpo primario. Se analizó la fluorescencia usando un microscopio Olympus BX-61 con software de imagen SlideBook mientras el teñido mesodérmico se analizó utilizando un microscopio Leica DM IRB con el software de imagen del paquete Microsuite Biological.

Resultados

Crecimiento, expresión del marcador multipotente y caracterización de las MenSCs

Las MenSCs se expanden rápidamente al doble de la velocidad de 24 a 36 horas, empezando con 50,000 células obtuvimos 48,000,000 para el día 26. (Figura 1A) y se mantuvieron las células diploides sin aberraciones cromosómicas según se determina por el análisis de cariotipo en el paso 12 (Figura 1D). Además, los datos RT-PCR demuestran que las MenSCs expresan el marcador multipotente Oct-4 en el paso 12, pero no el SOX-2 ni Nanog (Figura 1B). El análisis citométrico de flujo ilustra que las MenSCs son positivas para los marcadores de célula madre y/o célula madre mesenquimática, tales como CD44, CD105, CD166, CD90, CD49f, MHC 1, CD29 y CD9 mientras que son negativas para CD38, CD133, CD45, CD34, MHC II, LIN y ligeramente positivas para CXCR4 en relación con el alojamiento de células madre. Además, el análisis citométrico de flujo confirma que las MenSCs expresan altamente el marcador pluripotente SSEA-4 y c-kit + (CD117) (Figura 1C). Asimismo, SSEA-4 y c-kit+ se colocalizaron sobre clones aislados de las MenSCs. (Figura 2). Las MenSCs cultivadas parecen tener morfología de célula estromal (Figura 1E). Estos datos demuestran que las MenSCs son fácilmente expandibles y expresan marcadores de célula madre multipotente.

MenSCs diferenciadas en el linaje mesodérmico.

Las células madre Estromales tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos mesodérmicos tales como cartilaginosa, adiposa y ósea. Las MenSCs inducidas hacia el linaje adipogénico (Figura 4B), linaje condrogénico (Figura 4D), y diferenciación de linaje osteogénico (Figura 4F). Todas mostraron características histológicas específicas, tales como vacuolas grasas

encontradas en adipocitos, teñido por proteoglucanos sulfatados para cartílago y depósitos de calcio para hueso. Las Figuras 4A, B, y C son controles negativos. Estos datos demuestran que las MenSCs se diferencian hacia tejidos mesodérmicos en diferentes grados, por ejemplo, 40-50% de las MenSCs se diferenciaron hacia linaje condrogénico, 60-70% hacia linaje adipogénico y 45% hacia linaje osteogénico, todos de forma similar o ligeramente mejor que las MSCs derivadas médula ósea.

Las MenSCs se diferencian hacia linajes neurales

Para poder demostrar la plasticidad de las MenSCs, diferenciamos células hacia linaje ectodérmico y evaluamos su expresión de marcador celular y molecular. Cuando las MenSCs se colocaron en medios que contenían FGF durante 4 días, seguida por la adición de FGF, PDGF y EGF durante 7 días y después se cultivaron en FGF y PDGF sin incluir EGF durante 5 días, las células expresaron marcadores oligodendrogliales O4 y GalC (Figura 3A-C), el marcador neuronal maduro Map-2 (Figura 5D), y Vimentin (Figura 5F). Las células también expresaron el marcador de astrocitos GFAP (Figura 5E). Los datos del RT-PCR respaldan los datos de la inmunocitoquímica al confirmar que las MenSCs expresan varios marcadores neurales a nivel de ARN (Figura 5G), incluyendo Nestina, NCAM y Nurr-1. Estos datos muestran la plasticidad de las MenSCs y el potencial para diferenciación en varios fenotipos neurales a una velocidad de 45-50%, que es similar a las MSCs derivadas de médula ósea.

Las MenSCs se diferencian en linaje cardiogénico

Las MenSCs se pueden diferenciar en células de linaje cardíaco utilizando dos técnicas diferentes. Los datos inmunocitoquímicos demuestran tñido positivo para marcadores cardíacos como actina, troponina y conexina 43 cuando las células se diferencian utilizando ya sea 8µM Aza u 800 µM SNAP (Figura 4A-C). Los datos del RT-PCR respaldan los hallazgos de inmunocitoquímica al demostrar que las MenSCs diferenciadas expresan marcadores cardíacos a nivel de ARN (Figura 6D), cuando las células crecen en demasía con agregados celulares MenSCs. Estos datos confirman que las MenSCs expresan marcadores cardiogénicos a nivel celular y molecular a una velocidad de 50-60%, que es similar a las MSCs derivadas de médula ósea.

Actividad de Telomerasa

Las MenSCs mantienen más de 50% de su actividad de telomerasa incluso en el paso 12 cuando se comparan con las células madre embriónicas humanas, lo cual es mucho mejor que las MSCs derivadas de médula ósea (Figura 2).

Análisis

Las células madre estromales han demostrado tener gran potencial para uso futuro en la transferencia clínica de terapias regenerativas (23, 24, 26). Hemos presentado una población novedosa de células estromales aisladas de sangre menstrual humana (MenSCs). Las MenSCs se caracterizan tanto a nivel celular como molecular, junto con su capacidad de expandirse y diferenciarse fácilmente. Este estudio demuestra que las MenSCs son una población celular única que se puede aislar de manera segura y proporciona una fuente expandible de células madre en mujeres que han tenido hijos. La expresión de marcadores multipotentes Oct-4, SSEA-4 y c-kit (CD117) en las MenSCs no es común en la mayoría de otras células madre adultas. Hemos aislado clones con c-kit positivo y colocación SSEA-4

(Figura 2). Esta población única de MenSCs es diferente que la descrita recientemente por Cui et al., la cual demostró diferenciación esqueleto muscular (5) cuando encontraron células de sangre menstrual expresando el siguiente perfil de flujos: positivo CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, MHC-I y negativo CD14, CD31, CD34, CD45, CD50, c-kit, cd133, MHC-II. Nuestras células (Figura 1) tienen los marcadores multipotentes que se mencionan arriba, mismos que no estaban en las células identificadas y utilizadas por Cui et al. Asimismo, las MenSCs parecen tener características similares a las células madre endométricas humanas identificadas por Cho et al. Con c-kit (CD117), Matthai et al con Oct-4, expandidas clonalmente por Gargett et al., y células madre endométricas de ratón identificadas por Cervello et al. con c-kit + (CD117) y Oct-4 (1, 2, 3, 9, 15). Esto se podría interpretar como que las MenSCs son la versión desechada de las células madre endométricas que se pueden recolectar fácilmente en una forma no invasiva. La expresión de marcadores multipotentes es indicio de que las células tienen la capacidad de diferenciarse hacia tipos de células derivadas de las capas germinales múltiples. El factor de transcripción Oct-4 y SSEA-4 constituyen marcadores expresados en las células madre embrionarias humanas (11), que también tienen un alto índice de expresión en nuestras MenSCs y podría explicar la rápida expansión celular (Figura 1). También podría explicar la capacidad de estar diferenciadas direccionalmente hacia diferentes tipos de células (Figura 4, Figura 5 y Figura 6). Los tipos de células diferenciadas demuestran la plasticidad de las MenSCs por el hecho de que no sólo tienen marcadores de superficie celular fenotípica por citometría de flujo e inmunocitoquímica, sino también expresión mRNA.

La necesidad de terapias regenerativas que incorporen células con capacidad para injertarse y diferenciarse es muy amplia. Sin embargo, la célula ideal también debe tener la capacidad de ser utilizada en forma alogénica. Las células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea actualmente se encuentran en ensayos clínicos después de demostrar su seguridad y eficacia en modelos animales para uso alogénico por sus propiedades inmunosupresoras. [25], [26]. Debido a su facilidad de recolección y aislamiento, las MenSCs pueden ser una estupenda fuente potencial de células multipotentes si también presentan estas propiedades.

Actualmente, evaluamos el uso de MenSCs humanas *in vivo* para terapias neurodegenerativas y cardiovasculares regenerativas en modelos animales. También estamos en proceso de identificar una mezcla heterogénea de tipos de células que se encuentran en la sangre menstrual y evaluarlas mediante el aislamiento y cultivo de poblaciones puras de MenSCs. Asimismo, estamos realizando más estudios de distintos donantes para determinar la reproducibilidad y eficiencia del potencial de diferenciación multipotente de estas células. En resumen, nuestro estudio demuestra que una población única y novedosa de células madre estromales se puede recolectar, aislar, caracterizar, expandir y diferenciar de la sangre menstrual humana.

Reconocimientos

Queremos agradecer a Cryo-Cell International Inc. por proporcionar las células que fueron el fundamento para este estudio de investigación, el soporte técnico utilizado en este estudio y el financiamiento para la validación de estos hallazgos. Deseamos reconocer a Mercedes Walton, Directora General de Cryo-Cell International Inc. por su hipótesis relacionada con el potencial para suministrar, aislar, procesar y criopreservar células madre menstruales, lo cual estableció el fundamento para este estudio de investigación. Cryo-Cell International ha presentado solicitudes de patente asociadas con la propiedad intelectual relacionada con los procesos, metodologías y composición del tema referenciado en este estudio. Nuestro agradecimiento para los equipos de NewStem Biosciences (Irvine, CA) por realizar la validación de la diferenciación celular, análisis y fenotipos celulares, así como a Marin Biologic Laboratories (Tiburon, CA) por realizar la validación de la diferenciación celular. AP es apoyado por el Gamal & Cheryl Tawfik Fund.

Referencias

1. Cervello, I.; Martinez-Conejero, J. A.; Horcajadas, J. A.; Pellicer, A.; Simon, C. Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum. Reprod.* 22:45-51; 2007.
2. Chan, R.W.; Schwab, K. E.; Gargett, C. E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod.* 70:1738-1750; 2004.
3. Cho, N. H.; Park, Y. K.; Kim, Y. T.; Yang, H.; Kim, S. K. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil. Steril.* 81:403-407; 2004.
4. Cogle, C. R.; Yachnis, A. T.; Laywell, E. D.; Zander, D. S.; Wingard, D. R.; Steindler, D. A.; Scott, E. W. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: A retrospective study. *Lancet* 363:1432–1437; 2004.
5. Cui, C. H.; Uyama, T.; Miyado, K.; Terai, M.; Kyo, S.; Kiyono, T.; Umezawa, A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol. Biol. Cell* 18:1586-1594; 007.
6. De Coppi, P.; Bartsch, G.; Siddiqui, M. M.; Xu, T.; Santos, C. C.; Perin, L.; Mostoslavsky, G.; Serre, A. C.; Snyder, E. Y.; Yoo, J. J.; Furth, M. E.; Soker, S.; Atala, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotech.* 25:100–106; 2007.
7. Delo, D. M.; De Coppi, P.; Bartsch, G. Jr.; Atala, A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymology* 419:426-438; 2006.

8. Gang, E. J.; Bosnakovski, D.; Figueiredo, C. A.; Visser, J. W.; Perlingeiro, R. C. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109:1743-1751; 2007.
9. Gargett, C. E. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. *Australian and New Zealand J. Obstet. Gynaecol.* 46:250-253; 2006.
10. Greco, S. J.; Liu, K.; Rameshwar, P. Functional Similarities among Genes Regulated by OCT4 in Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 25:3143-3154; 2007.
11. Henderson, J. K.; Draper, J. S.; Baillie, H.S.; Fishel, S.; Thomson, J. A.; Moore, H.; Andrews, P. W. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 20:329–337; 2002.
12. Kearns, M.; Lala, P. K. Bone marrow origin of decidual cell precursors in the pseudopregnant mouse uterus. *J. Exp. Med.* 155:1537-54; 82.
13. Le Blanc, K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 5:484–489; 2003.
14. Ludwig, T. E.; Levenstein, M. E.; Jones, J. M.; Berggren, W. T.; Mitchen, E. R.; Frane, J. L.; Crandall, L. J.; Daigh, C. A.; Conard, K. R.; Piekarczyk, M. S.; Llanas, R. A.; Thomson, J. A. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24:185–187; 2006.
15. Mattai, C.; Horvat, R.; Noe, M.; Nagele, F.; Radjabi, A.; Van Trotsenburg, M.; Huber, J.; Kolbus, A. Oct-4 expression in human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 12:7-10; 2006.

16. Minguell, J. J.; Erices, A.; Conget, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* 226:507–520; 2001.
17. Nandoe, T. R.; Hurtado, A.; Levi, A. D.; Grotenhuis, J. A.; Oudega, M. Bone marrow stromal cells for repair of the spinal cord: towards clinical application. *Cell Transplant.* 15:563–577; 2006.
18. Patel, A.N.; Geffner, L.; Vina, R. F.; Saslavsky, J.; Urschel, H. C. Jr.; Kormos, R.; Benetti, F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130:1631-1638; 2005.
19. Schwab, K. E.; Chan, R. W.; Gargett, C. E. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 84:1124-1130; 2005.
20. Schwab, K. E.; Gargett, C. E. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum. Reprod.* 22:2903-2911; 2007.
21. Taylor, H. S. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA* 292:81-85; 2004.
22. Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147; 1998.
23. Toma, C.; Pittenger, M. F.; Cahill, K. S.; Byrne, B. J.; Kessler, P. D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105:93-98; 2002.

24. Vilquin, J. T.; Rosset, P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. *Regen. Med.* 1:589–604; 2006.
25. Yao, S.; Chen, S.; Clark, J.; Hao, E.; Beattie, G. M.; Hayek, A.; Ding, S. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:6907–6912; 2006.
26. Zurita, M.; Vaquero, J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport* 15:1105–1108; 2004.

Figura 1. Las MenSCs crecen rápidamente, cuentan con un cariotipo normal (B) y expresan marcadores multipotentes. (A). Las MenSCs duplican el tiempo en 24 - 36 horas lo cual permite una expansión rápida a 48 millones de células en 8 duplicaciones que empiezan tan sólo con 50 mil células, y no expresa ninguna aberración cromosómica según lo determina un análisis de cariotipo en el paso 12 (C). Las MenSCs expresan el marcador multipotente Oct-4 a nivel ARN hasta 12 pasajes, según lo determina en el RT -PCR L, escalera; W, agua; ESC, células madre embrionarias; P12, pasaje 12. (D) Citometría de flujo: Las MenSCs mostraron resultados positivos para marcadores de célula estromal y/o célula madre mesenquimática, tales como CD44, CD105, CD166, CD90, CD49f, MHC I, CD29 y CD9, mientras que fueron negativos para CD38, CD133, CD45, CD34, MHC II, LIN y ligeramente positivos para CXCR4. Además, el análisis citométrico de flujo confirma que las MenSCs expresan altamente su marcador pluripotente SSEA-4 y c-kit + (CD117). (E) Las MenSCs cultivadas parecen tener una morfología de célula estromal.

Figura 2. Las MenSCs se tiñen en positivo para ckit (A), y SSEA4 (c) ckit y colocalización SSEA4 (E). Los controles negativos no se tiñen para ckit o SSEA4 (B, D, F)

Figura 3. Las MenSCs expresan actividad de telomerasa en el paso 12. hESC = células madre embrionarias humanas; MEF = fibroblastos embrionarios de ratón.

Figura 4. Las MenSCs se diferencian fácilmente en tipos de tejido mesodérmico. El teñido con rojo O de aceite para vacuolas grasas demuestran la diferenciación en tejido adipogénico cuando se induce (B) en comparación con controles no inducidos (A). El teñido con azul alciano para proteoglicanos sulfatados demuestra diferenciación en tipos de tejido

condrogénicos cuando se induce (D) en comparación con controles de MenSCs no inducidas (C). El teñido con rojo alizarin S (F) en células inducidas mostró cierta diferencia en comparación con los controles no inducidos (E).

Figura 5. Las MenSCs se diferencian hacia tejido neural. Las MenSCs inducidas hacia células neurales se diferencian hacia células oligodendrogliales que expresan los marcadores O4 y GalC (A–C). Además, se pueden diferenciar en células neuronales y progenitores neurales mostrados por la expresión de Map-2 (D), Tub-3 (E), y Vimentina (F), respectivamente. Los datos de RT-PCR apoyan y extienden nuestro teñido inmunocitoquímico demostrando expresión de ARN de células neurales (G). Inmunocitoquímica, 20×. RT-PCR: L, escalera; W, agua; B, control cerebral; MenSCs inducidas a células neurales.

Figura 6. Las MenSCs se diferencian hacia tejido cardíaco. La adición de 8 μ M Aza produce células cardíacas con una expresión máxima de actina demostrada por inmunocitoquímica (B). La expresión de troponina (A), la expresión de conexina 43 fue lograda mediante la adición de 800 μ M SNAP (C) demostrado por inmunocitoquímica y el RT-PCR. (A-D), 20x. RT-PCR: L, escalera; W, agua; H, control de cardíaco; MenSCs inducidas hacia células cardíacas (sobre crecimiento).

Figura 1

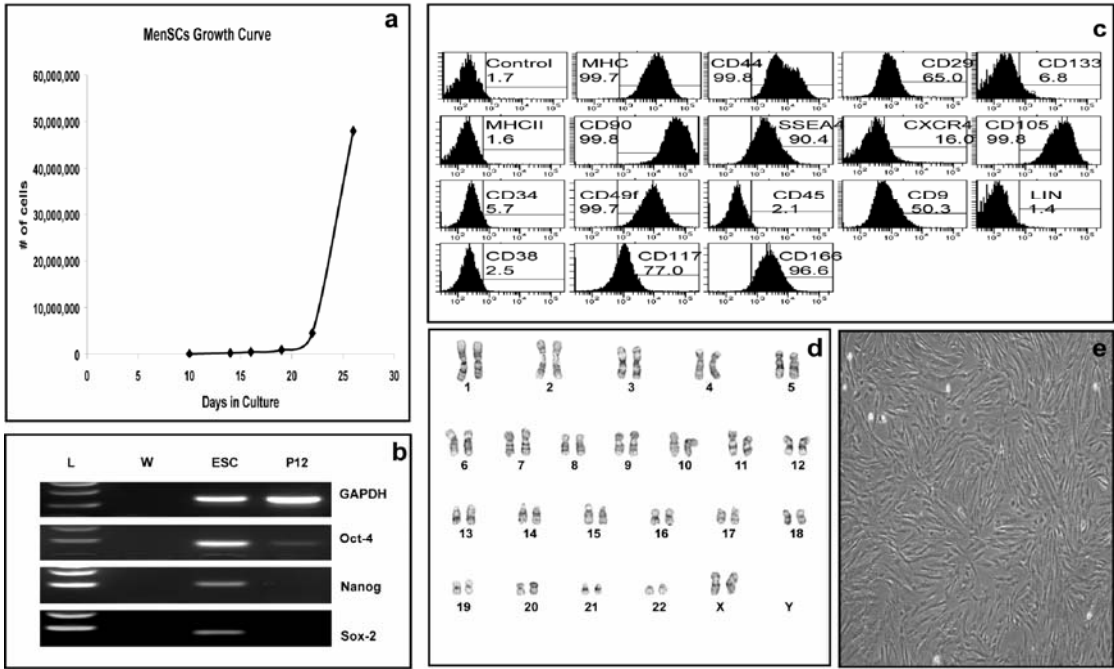


Figura 2

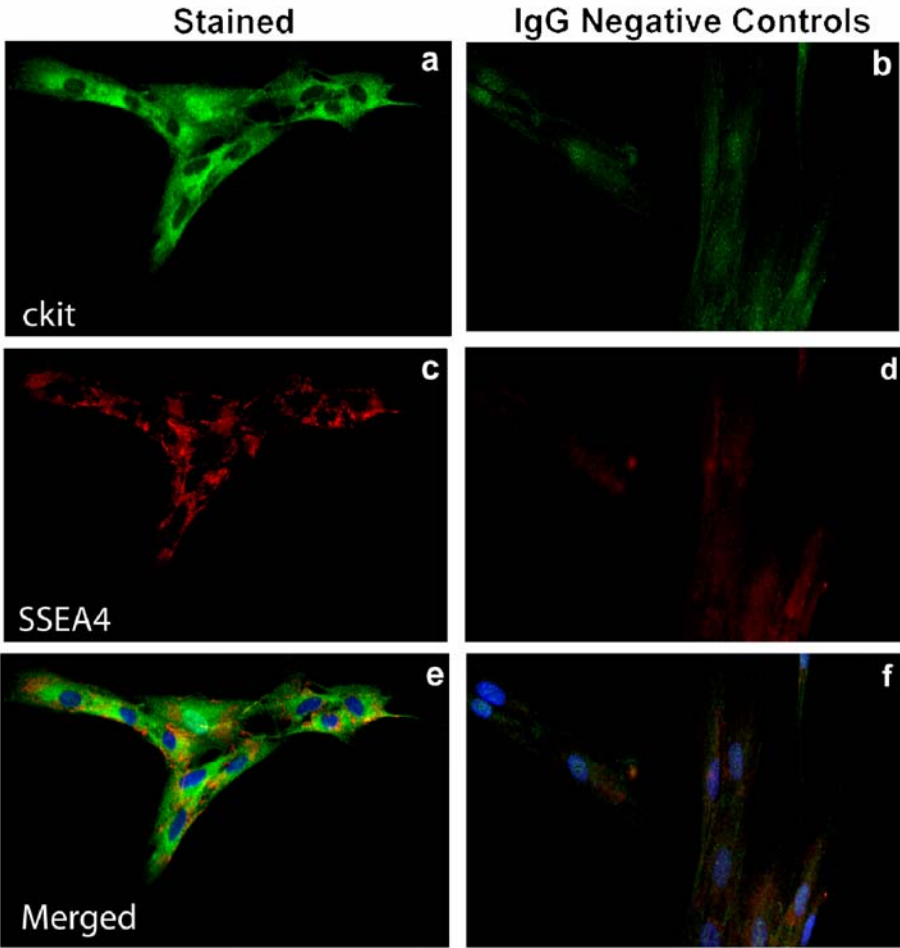


Figura 3

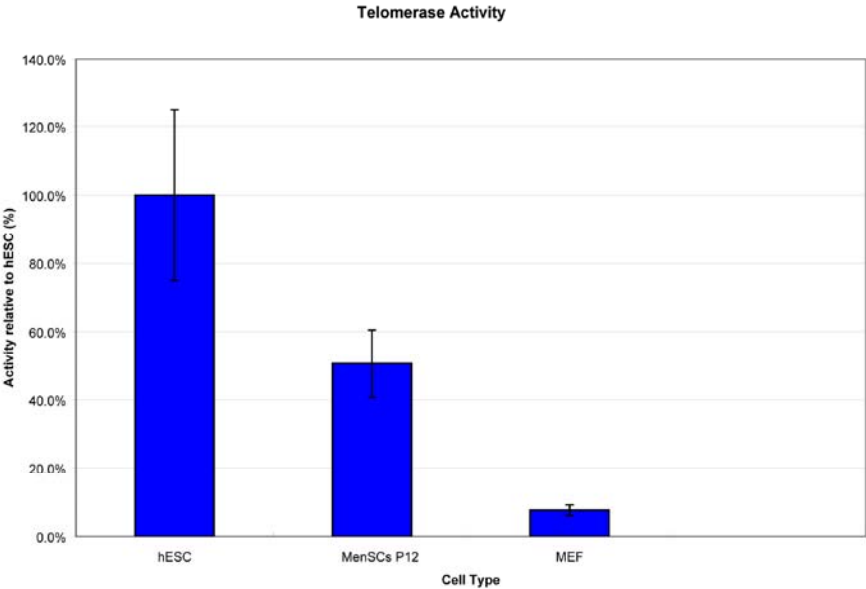


Figura 4

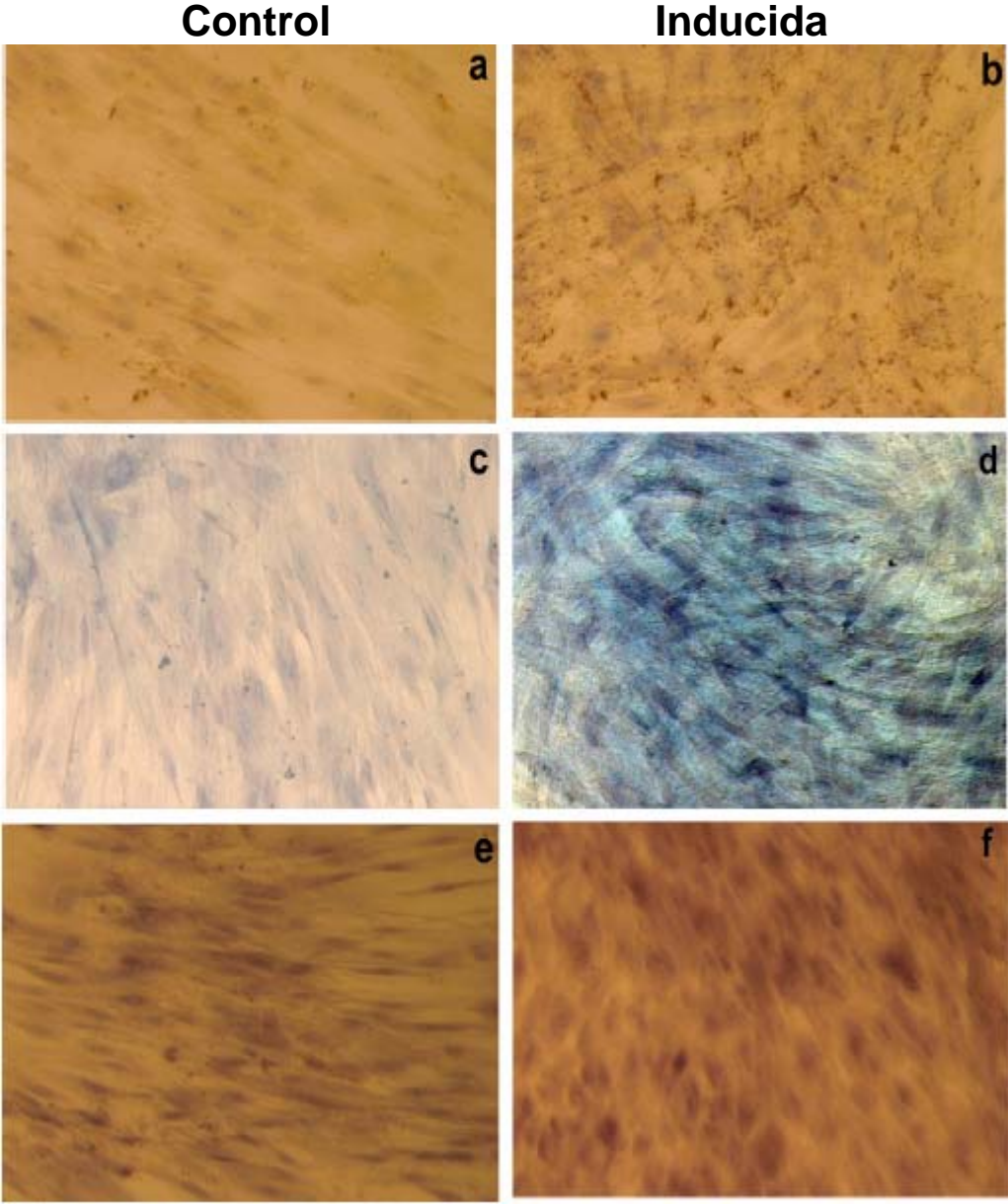


Figura 5

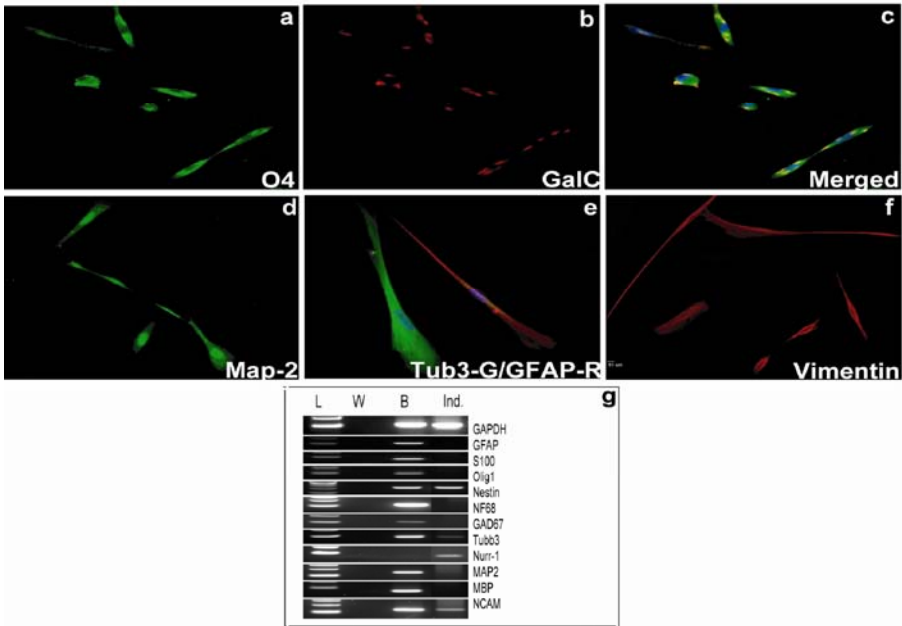


Figura 6

