

BMP4: Importante regulador del desarrollo embrionario y la hematopoyesis

Verónica Fernández-Sánchez,* Héctor Mayani*

* Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. Hospital de Oncología. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

BMP4: A key regulator of embryonic development and hematopoiesis

ABSTRACT

Bone morphogenic proteins (BMPs) constitute a group of multifunctional growth factors that belong to the transforming growth factor- β (TGF- β) family. During the last few years, the roles of BMPs, both in development and in specific adult tissues, have been extensively studied. One of such proteins, BMP4, has been identified as a key regulator in the development of mesoderm, and particularly, in the specification of the vascular and hematopoietic systems. BMP4 has also been found to be an important regulator of the growth of hematopoietic stem cells (HSC), participating in the control of their proliferation, expansion and differentiation. Herein, we present an overview on the different roles that BMP4 plays in mammal development, and in the regulation of hematopoiesis.

RESUMEN

Las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) son factores de crecimiento multifuncionales, que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). El papel de las BMPs en el desarrollo embrionario, así como sus funciones celulares en la etapa postnatal, han sido extensamente estudiadas en años recientes. Una de dichas proteínas es BMP4, la cual ha sido identificada como un regulador pleiotrópico, fundamental para la formación del mesodermo y para la especificación vascular/hematopoyética durante el desarrollo. El estudio de las moléculas que regulan la proliferación, expansión y diferenciación de las células troncales hematopoyéticas (CTH) y células progenitoras hematopoyéticas (CPH) se han enfocado al estudio de algunas citocinas hematopoyéticas, sin embargo, estudios recientes han sugerido que BMP4, al igual que otras moléculas que actúan como morfógenos en la etapa embrionaria, juegan un papel importante en la especificaciones de la hematopoyesis del adulto. En este trabajo se pretende destacar la importancia de BMP4 durante el desarrollo embrionario y su papel en la expansión de CTH y CPH, particularmente aquellas provenientes de la sangre de cordón umbilical (SCU).

Key words. BMP4. Morphogen. Stem cells. Hematopoiesis. Umbilical cord blood. Embryonic development.

Palabras clave. BMP4. Morfógeno. Células troncales. Hematopoyesis. Sangre de cordón umbilical. Desarrollo embrionario.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario es un proceso extremadamente complejo, en el que participan diversos factores protéicos, regulando la proliferación y diferenciación de los distintos tipos celulares que se van generando. Muchos de esos factores se conservan durante la etapa postnatal, jugando papeles importantes en la fisiología de tejidos de estadios adultos. Uno de dichos factores es la proteína morfogénica 4 del hueso (BMP4, por sus siglas en inglés). BMP4

desempeña papeles muy importantes durante el desarrollo prenatal y su actividad permanece en ciertos tejidos a lo largo de la vida del individuo. Particularmente en la hematopoyesis (formación de las células sanguíneas), BMP4 parece estar involucrado en procesos de proliferación de células hematopoyéticas primitivas. En el presente trabajo, se describen algunas de las funciones más importantes que desempeña BMP4 durante el desarrollo, y se presentan algunos puntos relacionados con el papel que juega esta proteína en la hematopoyesis.

DESARROLLO EMBRIONARIO

El desarrollo gestacional en los mamíferos inicia con la fecundación del óvulo por el espermatozoide y culmina con el nacimiento del nuevo ser. Este es un proceso extremadamente complejo, a lo largo del cual se han identificado distintas etapas; cada una de las cuales, a su vez, involucra la participación de diversos factores y tipos celulares. Las dos etapas más evidentes corresponden a la etapa embrionaria, seguida por la etapa fetal.

Mucha de la información acerca del desarrollo en mamíferos proviene de estudios hechos en el ratón y en el ser humano. Sin embargo, es importante resaltar que existen algunas diferencias entre el desarrollo de ambas especies. Por ejemplo, el tiempo del desarrollo embrionario y fetal en el ratón es de 18 a 20 días, mientras que en humanos el proceso toma 9 meses. La forma y función de la placenta difiere en las dos especies; el saco vitelino en el embrión de ratón persiste y funciona a lo largo de la gestación; en humanos el saco vitelino funciona sólo en la embriogénesis temprana.¹

A pesar de lo anterior, es claro que los patrones de desarrollo son semejantes. Después de la fecundación (fase donde un gameto masculino se une con uno femenino), el huevo o cigoto se divide numerosas veces (proceso conocido como segmentación), alcanzando entonces el estadio de blástula, alrededor de los días 8 y 9 en humanos y 4.5 post-coito (pc) en ratón. En este estadio, las células de la masa interna constituyen células troncales pluripotenciales, capaces de generar a todas las células del cuerpo embrionario. Al día 6 pc, en el ratón, se pueden encontrar tres tipos de células diferenciadas: el trofoblasto, el epiblasto (también llamado ectodermo embrionario o ectodermo primitivo) y el endodermo primitivo.²

La siguiente etapa es la gastrulación, en la que ocurren los procesos morfogénicos (formación del cuerpo). Durante esta etapa se lleva a cabo la diferenciación de las tres capas germinales: capa externa o ectodermo, capa interna o endodermo, y la capa intermedia o mesodermo.³ A partir del ectodermo se generan la epidermis y formaciones tegumentarias, los dos extremos del tubo digestivo, el sistema nervioso central (SNC) y nervios periféricos, así como determinadas partes de los órganos sensoriales. El mesodermo da origen al notocordio o cuerda dorsal y a los somites; éstos, a su vez, originan la dermis, los tejidos muscular estriado, óseo, cartilaginoso, conjuntivo y adiposo, el aparato circulatorio, el excretor y el gonadal.⁴ El endodermo, por su parte, origina el tubo digestivo excepto sus extremos, con

sus glándulas derivadas o las glándulas anexas, el revestimiento interior de los pulmones y órganos reproductores y excretores. En el ratón la gastrulación comienza cerca del día 6.5 pc, mientras que en el humano entre los días 14 y 16 del desarrollo.

Durante la gastrulación se verifica el desplazamiento de grupos celulares, que una vez llegados a su destino, inician interacciones con células vecinas que activan o reprimen genes. De esta manera se delimitan áreas o territorios en el cuerpo embrionario donde se diferencian tipos celulares y se conforman los órganos.⁵ Despues de la gastrulación, los órganos se esbozan e inician su especialización (etapa conocida como organogénesis),⁶ donde los patrones de todo el cuerpo son determinados por el establecimiento de tres ejes: anterior-posterior (céfalo-caudal), dorsal-ventral y asimetría derecha-izquierda. Estos patrones son regulados por un grupo de genes homeóticos que presentan una secuencia conocida denominados homeobox o “caja homeótica”. La acción de estos genes conduce a la división del embrión en campos celulares determinados a originar tejidos y órganos específicos. El establecimiento de estos ejes en el espacio y tiempo correctos es fundamental para el desarrollo normal.^{1,2}

LAS BMPs

Durante la embriogénesis participan señales cruciales que regulan cada uno de los eventos celulares. Estas señales, a su vez, son producidas por factores específicos que resultan de la expresión de genes en células generadas en los diferentes estadios del desarrollo. Dentro de dichos factores se encuentran las proteínas morfogénicas del hueso o BMPs.^{7,8} Las BMPs son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante-β (TGF-β).^{4,7-11} Entre los TGF-β y las BMPs se observa una homología en sus secuencias de aminoácidos y la absoluta conservación de siete residuos de cisteínas.¹² Las BMPs fueron originalmente identificadas como péptidos que inducen la formación del hueso ectópico,⁷ y la producción de novo del cartílago.^{8,13} La actividad de los BMPs fue identificada en los años 60s, pero las proteínas responsables de la inducción del hueso permanecían desconocidas hasta que se llevó a cabo la purificación y secuenciación de BMP3 (osteogenina) de bovino y se clonaron las BMP2 y 4 en humanos, en los años 80s.^{8,12} Estudios en ratones transgénicos, knockout y humanos con mutaciones naturales, que ocurrieron en las BMPs y genes relacionados, han demostrado que las señales de BMPs juegan un

papel crítico en el desarrollo del tejido neural, corazón, cartílago y en la formación y remodelación del hueso postnatal.^{8,12,14}

RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS BMPS

Las señales de la familia de BMPs son iniciadas por su unión a un complejo heteromérico de receptores específicos cinasas serina/treonina, conocidos como tipo I activin-like kinase (ALK)-3 y tipo II (ALK-6).^{11,15} El receptor tipo II fosforila al receptor tipo I activando su dominio cinasa; en su forma activa el receptor tipo I, fosforila a las proteínas Smads (que son transductores de la señalización corriente abajo). Bajo la estimulación de los BMPs, las moléculas Smad 1, 3, 5 y 8 son fosforiladas por el receptor I,¹⁵ formando complejos con Smad4,¹⁶ los cuales son trasladados del citoplasma al núcleo, donde actúan como reguladores transcripcionales, interactuando con otros factores de transcripción, tales como Runx2, GATA-1, GATA-2, SCL y LMO-2.^{7-9,11,14} Por otro lado, los inhibidores Smad (Smad 6 y 7) regulan negativamente las señales de TGF-β por competencia con los reguladores Smad (1,3, 5 y 8) por el receptor, o por la interacción con Smad4.⁸ Generalmente, Smad 2 y 3 actúan debajo de los TGF-β y sus receptores; mientras que Smad 1, 5 y 8 actúan mediante señales por las BMPs.¹⁷

Es importante recalcar que las rutas de señalización de las BMPs, así como Notch (otro importante regulador del desarrollo) son cruciales para la diferenciación celular. En algunos casos, las dos rutas actúan de forma similar para inhibir la diferenciación miogénica. No se sabe bien si esta inhibición es causada por distintos mecanismos o por una interacción entre estas dos señales. Dahlqvist, *et al.*^{4,17} demostraron que las señales de Notch son requeridas para bloquear, mediante BMP4, la diferenciación de células troncales de músculo, células satélites y de la línea celular miogénica C2C12. También se ha sugerido que algunos miembros de la familia de las BMPs están corriente-abajo de las señales de las proteínas Hedgehog (Hh).^{4,5,18} Por ejemplo, las señales de Indian hedgehog (Ihh) están mediadas por BMP4 en el tejido epiblástico superior y en el mesodermo intraembrionario.⁵

BMP4

BMP4, es uno de los miembros de la familia de las BMPs.⁸⁻¹⁰ El gen BMP4 humano tiene por lo menos dos promotores funcionales, que son usados de manera específica para cada tipo celular. Esta observa-

ción es de fundamental importancia para el entendimiento del papel de BMP4 en el desarrollo del esqueleto y remodelación de hueso.^{13,19}

En la embriogénesis, BMP4 es expresada en el mesodermo actuando como un morfógeno (molécula soluble que puede difundirse y llevar señales que controlan las decisiones de diferenciación celular dependiendo de su concentración química),¹¹ cuya actividad resulta en la formación del mesodermo ventral.¹⁴ De hecho, el mesodermo dorsal se forma a partir de la supresión de las señales de BMP4 por moléculas dorsalizantes, como Noggin y Cordin, que se unen a BMP4 en el espacio extracelular para interferir con la unión a su receptor.^{20,21} Ratones deficientes en BMP4 no sobreviven el periodo embrionario temprano y embriones homocigotos con mutaciones en BMP4 mueren entre los días 7.5 y 10.5 pc mostrando poca o nula diferenciación mesodermal.⁸

BMP4 ha mostrado ser un potente inductor tanto de tejido hematopoyético,^{4,11,14} como osteogénico.^{8,10,13} Por otra parte, en el sistema nervioso central se ha demostrado que BMP4 regula la expresión de Wnt3a en células progenitoras neuronales,^{1,13,22} e induce un fenotipo adrenérgico simpático. La expresión de BMP4, Notch-1, Numb, Shh y Msx2 en células neurales y/o de la glia aumenta significativamente cuando se les induce un daño, lo que sugiere que posiblemente estos genes pudieran tener un potencial endógeno autoreparador.^{22,23}

En el desarrollo morfogénico de los dientes, BMP4 y BMP2 intervienen en una primera fase, desde el engrosamiento epitelial hasta el estadio de brote y la primera condensación del mesenquima. Estos factores regulan la expresión de los genes Msx-1 y Msx-2 que determinan el patrón microscópico del órgano dentario a través de la regulación de distintas moléculas de la superficie celular y de la matriz extracelular.²⁴ BMP4 también se expresa en la vesícula óptica dorsal, que se transforma en la taza óptica (área del centro del disco óptico). La delección de BMP4 resulta en la falla del desarrollo del ojo en humano y ratón. Los niveles de señalización de BMP4 son cruciales para la regulación de la expresión de los genes Tbx2, Tbx3, Tbx5 y Vax2 a lo largo del eje dorso-ventral de la taza óptica. La expresión de BMP4, también se ha reportado en células del estroma de la medula ósea y en algunas líneas celulares como AFT024^{4,9} y HeLa, y en células de placenta humana.²⁵

Por último, BMP4 participa en la inducción epidermal en vertebrados,⁸ en la inducción de la diferenciación de miocitos en fibroblastos de pulmón²⁶ y en la formación del epitelio sensorial del oído inter-

no en oocitos de pollos.^{27,28} Estudios moleculares en ratón, *Xenopus*, pez zebra han demostrado que existe una relación directa entre la formación de la hematopoyesis y factores reguladores mesodermiales,^{8,29} también se han implicado a los genes BMPs, como un grupo importante de inductores tempranos en el desarrollo hematopoyético.

HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA

En el ratón, el inicio de la hematopoyesis ocurre en el saco vitelino y se caracteriza por la producción de células eritroides con morfología primitiva o embrionaria (nucleadas y grandes); a esta primera fase de la hematopoyesis se le conoce como hematopoyesis primitiva.^{5,30} La hematopoyesis primitiva es transitoria y tiene lugar entre los días 7 y 13 pc, antes de ser sustituida por la hematopoyesis definitiva la cual contiene células troncales hematopoyéticas (CTH) multipotentes que mantienen al sistema hematopoyético a lo largo de la vida.⁵

La hematopoyesis definitiva, al igual que la hematopoyesis primitiva progresó de una manera ordenada espacial y temporalmente en el embrión. Las células con potencial hematopoyético definitivo han sido identificadas en regiones intraembrionarias como esplenopleural para-aórtica (PAS) y aorta gonada mesonefros (AGM), así como en el saco vitelino (sitio extraembrionario)²¹ en los días 7.5 – 8.0 pc, aún antes de ser encontradas en circulación. Las células hematopoyéticas que se encuentran en los sitios intraembrionarios se derivan de las células de la capa germinal mesodermal formada en la gastrulación en el estadio temprano al día 6.5 pc. La capa germinal mesodermal, a su vez, está formada por una interacción de las capas endodermiales y ectodermiales.^{8,30}

El mesodermo extraembrionario del saco vitelino da origen a las células sanguíneas y endoteliales que comienzan a formar las islas sanguíneas morfológicamente identificables al inicio del día 7pc; las células endoteliales se diferencian en los bordes de los agregados mientras que los eritrocitos primitivos se diferencian en la región interior.⁵ La estrecha asociación de estos derivados mesodermiales y la expresión de genes tales como Flk1, CD34, SCL/tal-1, Flt1, GATA-2, Cbfa2/Runx/AML1 y PECAM1 en el desarrollo de células hematopoyéticas y endoteliales han llevado a sugerir la hipótesis de un precursor común llamado “hemangioblasto” para estos dos linajes.^{5,30,31}

El saco vitelino está muy vascularizado y la circulación extraembrionaria se conecta con la del embrión a través de la aorta dorsal, por donde las

células hematopoyéticas pueden circular intravascularmente entre los sitios intra y extraembrionarios.^{30,32} En la región PAS, se pueden encontrar progenitores hematopoyéticos son encontrados en el día 7.5 pc. La región AGM funciona como un sitio hematopoyético hasta los días 10 y 11 pc cuando comienza a degenerarse, al mismo tiempo hay un incremento de la actividad hematopoyética en el hígado fetal.²¹

El timo y el bazo se forman relativamente tarde en la gestación y están involucrados en la producción y maduración de las células hematopoyéticas, provenientes de progenitores hematopoyéticos que se han producido en éstos y en otros órganos hematopoyéticos. Al día 9 pc el hígado es todavía un órgano rudimentario, incapaz de iniciar la hematopoyesis in situ, sin embargo, es colonizado y sirve como un reservorio de CTH formadas anteriormente en otros sitios hematopoyéticos, por lo que el hígado fetal asume el papel hematopoyético principal a partir de los días 10-11 pc hasta el nacimiento.³⁰

En el humano, la eritropoyesis primitiva también se inicia en el saco vitelino, alrededor de la tercera semana de gestación y permanece activa hasta la sexta semana. Como en el ratón, la región PAS/AGM contiene células hematopoyéticas definitivas antes de su detección en el hígado fetal. Aunque la región AGM es un importante sitio de surgimiento de CTH, este no parece soportar la diferenciación de estas células a linajes hematopoyéticos específicos, por lo que la región AGM está exclusivamente involucrada en la generación de un grupo de CTH capaces de poblar el hígado fetal. El hígado fetal entonces continúa como el principal sitio de hematopoyesis hasta la semana 22, momento en el cual los huesos fetales que han sido colonizados en las semanas 8-12, se convierten en el sitio principal de la hematopoyesis. Se ha demostrado la presencia de CTH en otros sitios intraembrionarios, incluyendo las arterias vitelina y umbilical, tanto en el ratón como en el humano.^{1,2}

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE BMP4 EN LA HEMATOPOYESIS

Como se mencionó, durante la etapa embrionaria BMP-4 actúa como un morfógeno, mientras que en la etapa adulta su papel fundamental es como factor de crecimiento, regulando la homeostasis en varios tejidos. En cuanto al sistema hematopoyético, la actividad inductora de BMP4 inicia durante la embriogénesis, ya que induce la formación del mesodermo hematopoyético.²⁹ Estudios realizados en el pez zebra en etapas previas a la hematopoyesis primitiva,

muestran que, el establecimiento de programas hematopoyéticos comienza con la inducción y especificación del mesodermo ventral para la fase hematopoyética. Al día 6 pc, esta región es marcada por la expresión de BMP2, BMP4 y el factor de transcripción GATA-2. Una mutación en BMP2A (homólogo de BMP4 en mamíferos) reduce la producción de células sanguíneas embrionarias, mientras que la sobre expresión de BMP2 o BMP4 por microinyección de RNA puede incrementar la población hematopoyética.²⁰

En *Xenopus*, la inyección de RNA mensajero de BMP4 dentro de la zona ventralizante del embrión en el huevo fertilizado, resulta en un incremento en la formación de células sanguíneas; esto ocurre sólo si BMP4 no está expresado en el sitio dorsal. Por otro lado, se ha observado que BMP4 es necesario para el desarrollo del mesodermo ventral/lateral, incluyendo las islas sanguíneas del saco vitelino en el ratón.²⁰ Es, pues, claro que BMP4 está involucrada en la producción de células sanguíneas durante la embriogénesis tanto en vertebrados como en invertebrados.

En la hematopoyesis adulta BMP4, sus receptores (tipo I y II), así como sus moléculas de señalización (Smad), son expresados en los diferentes linajes hematopoyéticos por ejemplo: BMP4 se expresa en niveles bajos en linfocitos de MO normal y en niveles altos en líneas celulares linfocíticas, como Molt4, SupT1 y Jurkat.¹¹ Otros estudios han encontrado que BMP4 tiene un efecto estimulador in vitro en poblaciones enriquecidas en CTH, así como en poblaciones de CPH, lo que sugiere que estas células expresan a los receptores de BMPs (I y II) y moléculas de señalización (Smad 1,4 y 5).^{4,14,15,20}

BMP4 Y LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

Durante la última década se ha visto un gran interés en lo que concierne a la expansión in vitro de CTH y CPH, no sólo provenientes de MO o sangre periférica movilizada (SPM), sino también de sangre de cordón umbilical (SCU). Esto es debido a que esta última representa una excelente fuente alternativa de células hematopoyéticas para su uso en trasplantes.³³

Diseños experimentales han sido reportados, en los que las CTH y CPH son cultivadas bajo diferentes condiciones, por ejemplo, con o sin suero, en presencia o ausencia de diferentes líneas celulares de estroma⁹ o en presencia de diferentes combinaciones de citocinas recombinantes. Aunque diversos estudios han demostrado incrementos significativos en el número de CTH y CPH, las condiciones y mecanis-

mos que controlan su proliferación, expansión y diferenciación hasta ahora no son del todo conocidos.^{34,35}

La mayoría de estos sistemas incluyen la participación de citocinas recombinantes con el fin de estimular la proliferación de progenitores hematopoyéticos. Sin embargo, recientemente han habido reportes sobre la capacidad de algunas proteínas morfogénicas para inducir la autorrenovación y expansión de las CTH bajo ciertas condiciones de cultivo in vitro. Estas proteínas incluyen a sonic hedgehog (Shh),⁴ BMP4, Wnt-3a,³⁶ ligandos de Notch³⁷ y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-1).⁹

Estudios realizados con CTH de MO en los que se adicionaron al medio de cultivo algunas de las BMPs (2,3,4,5,6 y 7), demostraron que dichas moléculas tienen efectos directos en la proliferación, diferenciación y mantenimiento de la capacidad repobladora en cultivos in vitro, y además que BMP4, en combinación con el factor de crecimiento de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y eritropoietina (Epo), incrementa el número de colonias de eritrocitos y granulocitos/macrófagos formadas en medio semisólido.¹¹

Bhatia, *et al.* demostraron la habilidad de BMP4 (a una concentración de 25 ng/ml) para promover el mantenimiento a corto plazo, de células repobladoras murinas en inmunodeficiencia combinada severa (*SCID Repopulating Cells*) en cultivo. Hutton, *et al.* confirmaron la habilidad de BMP4 para contribuir al mantenimiento de células hematopoyéticas primitivas con capacidad de iniciar colonias a largo plazo (LTC-IC) en cultivos libres de estroma.^{9,14}

Se ha reportado también el papel de BMP4 en la obtención de CTH y su progenie a partir de células troncales embrionarias humanas (CTEH). En un estudio reciente, se evaluó el papel de BMP4, factor de crecimiento epidermal vascular (VEGF), factor de células troncales (SCF) y factor de crecimiento de fibroblastos clásico (FGF2) en la generación de CTH y su progenie a partir de CTEH. BMP4 fue capaz de inducir la expresión de genes de la vena primitiva tales como: MLXL1, BRACHYURY y GOOSECOID y genes involucrados en la señalización del mesodermo: GATA-2 y RUNX-1; también se encontró que la combinación de BMP4 con VEGF es requerida para la eficiente generación de CPH.³⁸ En otro estudio se demostró que BMP4, independiente de citocinas hematopoyéticas, tiene la capacidad de estimular y mantener el crecimiento de progenitores formadores de colonias en cultivo semisólido.³⁹

CONCLUSIONES

BMP4 es un importante regulador del desarrollo embrionario, participando en la formación de diversos tejidos y órganos, particularmente aquellos que forman parte del mesodermo. Sin embargo, un gran número de estudios ha demostrado la participación de esta molécula en la etapa adulta del individuo, regulando la homeostasis celular en diferentes tejidos. Tal es el caso del sistema hematopoyético, en donde BMP4 participa, junto con una serie de citocinas estimuladoras e inhibidoras, en la regulación de la proliferación y expansión de las CTH y CPH.

Recientemente se ha comenzado a estudiar el papel de BMP4 en sistemas in vitro enfocados a la expansión de CTH y CPH con fines clínicos (trasplante de células hematopoyéticas). De aquí que la importancia de este factor trascienda no sólo en el aspecto biológico, sino también al preclínico. Es, pues, fundamental profundizar en el estudio de este tipo de proteínas, importantes tanto en el desarrollo embrionario como en la fisiología de tejidos durante la etapa adulta.

REFERENCIAS

1. Jones JM, Thomson JA. Human embryonic stem cells technology. *Semin Reprod Med* 2000; 18: 219-23.
2. Scot F.G. Development biology. 7^a Ed. Sinauer Associates; Inc. (capítulo 6,7), 2003.
3. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallece EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multi-Lineage Differentiation Potential. *Biol Reprod* 2007; 77(3): 577-88
4. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nature Immunology* 2001; 2(2): 172-9.
5. Baron MH. Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. *Differentiation* 2001; 68: 175-85.
6. Behringer RR. Developmental biology. Dance of the embryo. *Science* 2007; 316(5825): 697-8.
7. Kenji S, Hata A. Indian Hedgehog gene is a target of the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem* 2004; 279(18): 18544-9.
8. Chen Di, Zhao M, Mundy GR. Bone Morphogenetic proteins. *Growth Factor*. 2004; 22(4): 233-41.
9. Hutton JF, Rozenkov V, Khor FSL, D'Andrea JD, Lewis ID. Bone Morphogenetic Protein 4 Contributes to the Maintenance of Primitive Cord Blood Hematopoietic Progenitors in an Ex Vivo Stroma-Noncontact Co-Culture System. *Stem Cells and Development* 2006; 15: 805-13.
10. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4 and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *Plos Genet* 2006; 2(12): 2116-30.
11. Detmer K. y Walker A.N. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Citokine* 2002; 17(1): 36-47.
12. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, et al. Novel regulators of bone formation molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528-33.
13. Wijngaard VA, Kraay VM, Zoelen VEJ, Olijve W, Boersma CJC. Genomic Organization of the human bone morphogenetic protein-4 gene: molecular basis of multiple transcripts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 219: 789-94.
14. Bathia M, Bonnet D, Wu D, et al. Bone Morphogenetic Proteins Regulate the Developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1999; 189(7): 1139-47.
15. Singbrant S, Moody LJ, Blank U, Karlsson G, Umans L, Zwijnen S, et al. Smad 5 is dispensable for adult murine hematopoiesis. *Blood* 2006; 108(12): 3707-12.
16. Karlsson G, Blank U, Moody JI, Ehinger M, Singbrant S, Dent CX, et al. Smad 4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2007; 204(3): 467-74.
17. Dahlqvist C, Blokzijl A, Chapman G, Falk A, Dannaeus K, Ibañez FC, et al. Functional Notch signaling is required for BMP-4 induced inhibition of myogenic differentiation. *Development* 2003; 130: 6089-99.
18. Bitgood M, Mc Mahon A. Hedgehog and BMP genes are co-expressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 1995; 172: 126-38.
19. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992; 32(2): 160-7.
20. Zon LI. Self-renewal versus differentiation, a job for the mighty morphogens. *Nature Immunology* 2001; 2(2): 142-3.
21. Sadlon TJ, Lewis ID, D'Andrea Richard J. BMP4: its role in development of the hematopoietic system potential as a hematopoietic growth factor. *Stem Cells* 2004; 22: 457-74.
22. Chen J, Leong SY, Schachner M. Differential expression of cell fate determinants in neurons and glial cells of adult mouse spinal cord after compression injury. *Eur J Neurosci* 2005; 22(8): 1895-906.
23. Enzmann GU, Benton RL, Woock JP, Howard RM, Tsoulfas P y Whittemore SR. Consequences of noggin expression by neural stem, glial, and neuronal precursor cells engrafted into the injured spinal cord. *Exp Neurol* 2005; 195(2): 293-304.
24. Ferraris EZ. Histología y embriología bucodental. Ed. Panamericana. 1999; 1: 80-1.
25. Limura OS, Maruoka Y, Takeda K, Sasaki S. Cloning and sequence of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) from a human placental cDNA library. *DNA Seq* 1995; 5(5): 273-5.
26. Jeffery T, Upton DP, Trembath CR and Morrell W. BMP4 inhibits proliferation and promotes myocyte differentiation of lung fibroblasts via Smad 1 and JNK pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L370-L378.
27. Li H, Corrales CE, Wang Z, Zhao Y, Wang Y, Heller S. BMP4 signaling is involved in the generation of inner ear sensory epithelial. *BMC Dev Biol* 2005; 17(5): 16.
28. Pujades C, Kamaid A, Alsina B, Giraldez F. BMP-signaling regulates the generation of hair-cells. *Dev Biol* 2006; 292(1): 55-67.
29. Johansson BM, Wiles MV. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 1995; 15(1): 141-51.
30. Dzierzak E, Medvinsky A, Merella de B. Qualitative and quantitative aspects of hematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunology Today* 1998; 5: 228-35.
31. Park C, Afrianova I, Chung YS, Zhang WJ, et al. A hierarchical order of factors in the generation of FLK-1 and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Dev Disease* 2004; 131: 2749-62.
32. Boyd NL, Dhara SK, Rekaya R, Godbey EA, Hasneen K, Rao RR, et al. BMP4 Promotes Formation of Primitive Vascular Networks in Human Embryonic Stem Cell-Derived Embryoid Bodies. *Exp Biol Med* 2007; 232(6): 833-43.
33. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998; 16: 153-65.

34. Flores-Guzman P, Gutierrez RM, Mayani H. In vitro proliferation, expansion and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of Medical Research* 2002; 33: 107-14.
35. Flores-Guzman P, Flores FE, Martinez JG, Mayani H. In vitro characterization of two lineage-negative CD34+ cell-enriched hematopoietic cell populations from human UC blood. *Cytotherapy* 2005; 7(4): 334-44.
36. Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, et al. Hematopoietic stem cells and multi-lineage defects generated by constitutive β -catenin activation. *Nature Immunology* 2006; 7(10): 1037-45.
37. Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Bhatia M. The notch ligand jagged-1 represent a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000; 192(9): 1365-72.
38. Pick M, Azzola L, Mossman A, Stanley EG, Elefanti AG. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in Serum Free Medium Reveals Distinct Roles for BMP4, VEGF, SCF and FGF2 in Hematopoiesis. *Stem Cells* 2007; 25(9): 2206-14.
39. Chadwick K, Wang LL, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, Bhatia M. Cytokines and BMP4 promote hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. *Blood* 2003; 102(3): 906-15.

Reimpresos:

M en C Verónica Fernández-Sánchez

Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales.
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico
Nacional Siglo XXI, IMSS.
Av. Cuauhtémoc No. 330,
Col. Doctores,
06725, México, D.F.
Tel.: 5627 6900 ext. 22705; fax 8596 4704.
Correo electrónico: alf2228@yahoo.com.mx

Recibido el 5 de julio de 2007.

Aceptado el 26 de octubre de 2007.