

Osteogénesis en cultivo de endotelio vascular humano

Raúl Aguilar-Vázquez,* Oscar Alejandro Carballo-Molina,*
Omar Collazo-Navarrete,* Maribel Guerrero-Rangel,* Alberto Daniel Saucedo-Campos,*
Paulina Barrera-Lechuga,* Rebeca López-Marure,** Julio Roberto Cáceres-Cortés*

* Laboratorio de Inmunología, Unidad de Morfofisiología,
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
** Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Osteogenesis of human vascular endothelial cells in culture

ABSTRACT

Introduction. Mesenchymal stem cells have the potential to differentiate into several types of cells including osteoblasts. These stem cells have cell surface markers found on cells of endothelial and subendothelial origin of the umbilical cord vein. Taking this into consideration we have postulated that human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) could present osteogenic differentiation as well. Gene activation that could drive osteogenic differentiation is regulated by exogenous and endogenous factors. **Objective.** The induction osteogenesis in HUVEC. **Material and methods.** We used: a) an osteogenic medium containing 0.1 μM dexamethasone, 10 μM β -glycerophosphate, 50 μM L-ascorbic-acid 2-phosphate, 20% MCGS serum; and b) a treatment with DNA demethylating agents hydralazine and 5'-aza-2'-deoxycytidine (0.39-200 μM). Phenotypic characteristics of HUVEC were their spindle and stellate shapes with fine homogenous cytoplasm, typically associated with fibroblast-like cells. **Results.** The control cells (without osteogenic treatment) exhibited little extracellular matrix, whereas the osteogenically treated cells appeared shortened and flattened, and they were surrounded by extracellular matrix that subsequently became mineralized *in vitro*. After 28 days in culture, morphologic and histochemical studies confirmed that osteogenic medium had a strong stimulatory effect on the alkaline phosphatase activity of endothelial cells, a very early marker of cell differentiation into the osteogenic lineage. Hydralazine and 5'-aza-2'-deoxycytidine, two drugs utilized in chromatin remodeling leading to gene re-expression of inactivated DNA hypermethylated islands, did not favor osteoblast differentiation. **Conclusion.** Our study shows that HUVEC can differentiate along an osteogenic lineage and thus provide an alternative source for cell-based therapies and tissue engineering strategies.

Key words. Osteogenesis. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Mesenchymal stem cells. DNA demethylation.

RESUMEN

Introducción. Las células madre mesenquimales tienen el potencial de diferenciarse en varios tipos celulares, entre ellos los osteoblastos. Estas células madre presentan marcadores de superficie encontradas también en las células de la capa endotelial y subendotelial de la vena del cordón umbilical. Por lo anterior, se cree que las células endoteliales podrían presentar diferenciación osteogénica. La tendencia a la diferenciación de las células mesenquimales parece ser inducida por factores que promueven cambios en el patrón de expresión génica. **Objetivo.** La inducción de la osteogénesis en células endoteliales aisladas a partir de células de la vena del cordón umbilical (HUVEC). **Material y métodos.** Se utilizó un medio osteogénico como factor inductor compuesto por 0.1 μM de dexametasona, 10 μM β -glicerofosfato, 50 μM L-ácido ascórbico 2-fosfato y 20% de suero MCGS. Las HUVEC también fueron tratadas con los agentes desmetilantes del ADN hidralazina y 5'-aza-2'-desoxicitidina (0.39 μM a 200 μM). Las características fenotípicas de las HUVEC fueron su forma de huso y estelada con un citoplasma homogéneo, típicamente asociado a la forma fibroblástica. **Resultados.** Las células control (sin tratamiento osteogénico) mostraron poca matriz extracelular, mientras que las células tratadas fueron más cortas y planas, y rodeadas de matriz extracelular que subsecuentemente se mineralizó *in vitro*. Luego de 28 días de cultivo celular, los estudios morfológicos e histoquímicos confirmaron que el medio osteogénico tuvo un fuerte efecto estimulador sobre la actividad de la fosfatasa alcalina de las HUVEC, un marcador primario hacia la línea de diferenciación osteogénica. El uso de hidralazina y 5'-aza-2'-desoxicitidina, dos fármacos implicados en la descompactación de la cromatina y re-expresión genética, no favoreció la diferenciación hacia osteoblastos. **Conclusión.** Los resultados revelan que las HUVEC se diferencian en osteoblastos, cualidad que puede proveer de una fuente alternativa para terapias celulares y estrategias en ingeniería de tejidos.

Palabras clave. Osteogénesis. Células endoteliales de cordones umbilicales humanos (HUVEC). Células madre mesenquimales. Desmetilación del ADN.

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo está constituido por una matriz mineralizada y una fracción celular muy activa. Constituye una reserva de calcio y almacena la médula ósea, interaccionando con las células precursoras de la hematopoyesis.¹

Se desconoce el mecanismo preciso involucrado en la reparación ósea. Un estudio reconoce el procedimiento de reclutamiento de células progenitoras a partir de células madre multipotentes y su posterior amplificación y diferenciación *in vitro* hacia los distintos tipos celulares mesenquimales.^{2,3}

Las células madre mesenquimales han sido aisladas a partir de la médula ósea y de algunos otros sitios en adultos y en fetos.⁴ Se han descrito diversos protocolos en los que se afirma el potencial de las células madre para diferenciarse *in vitro* en diversos tipos de células especializadas tales como cardiomiocitos, adipocitos, neuronas, condrocitos, osteocitos y células musculares.¹⁻³

Las células endoteliales se desarrollan a partir de células del mesénquima embrionario que rodean a grupos de células sanguíneas en desarrollo o a partir de diminutas lagunas de líquido tisular que se acumulan en el mesénquima.⁵ Las células endoteliales revisten todo el sistema circulatorio y linfático, formando un plano continuo sobre una membrana basal. Mediante el uso de la citometría de flujo se ha observado que células de la capa endotelial y subendotelial de la vena del cordón umbilical humano presentan varios marcadores que también se encuentran presentes en las células madre mesenquimales de la médula ósea.⁶ Se podría hipotetizar que las células endoteliales pueden manifestar los mismos potenciales de diferenciación descritos en células mesenquimales.⁷ De esta forma el objetivo de la presente investigación fue el de inducir osteogénesis en células endoteliales provenientes de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC), utilizando medio osteogénico y agentes desmetilantes que permiten iniciar el proceso de diferenciación osteoblástica. Hemos tenido un interés particular en el proceso de la desmetilación del ADN y el estado de compactación de la cromatina, ya que están implicados en los momentos de reprogramación genómica. Se conoce mucho acerca de las enzimas que causan la metilación del ADN; sin embargo, poco se sabe de los mecanismos o el significado de la desmetilación activa en el desarrollo.⁸ Por ejemplo, la metilación del ADN y la acetilación de histonas actúan como señales fisiológicas en la regulación de la estructura de la cromatina y tienen efectos sobre la expresión genética

durante el desarrollo e inactivación del cromosoma X.^{9,10} Se ha mostrado que existe una alteración de la metilación del ADN y de los patrones de acetilación de histonas de genes supresores de tumores en varios tumores humanos.¹¹⁻¹³ La metilación del ADN es un factor epigenético importante que se ha postulado como regulador de la diferenciación celular.¹⁴ Por otra parte, se conoce que la desmetilación del ADN por 5'-aza-2'-desoxicitidina en células madre induce expresión genética y diferenciación celular.¹⁵ El tratamiento con 5'-aza-2'-desoxicitidina también causa otros tipos de cambios en las células, incluyendo la activación de genes silenciados,^{16,17} descondensación de la cromatina¹⁸ y alteración del tiempo de duplicación del ADN.¹⁹

Nuestros resultados mostraron que las HUVEC no se diferenciaron por desmetilación inducida por agentes químicos, únicamente el medio de cultivo conteniendo factores osteogénicos estimuló la generación de osteoblastos a partir de las HUVEC. En este trabajo se postula que las HUVEC son células madre fetales multipotentes semejantes a las células madre mesenquimales de médula ósea, capaces de diferenciarse en osteoblastos en un medio de cultivo conteniendo factores osteogénicos. Agentes desmetilantes del ADN no afectan este proceso de diferenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

El medio de cultivo M199, la colagenasa tipo II y el antibiótico-antimicótico (100 U/mL de penicilina G sódica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomycin y 0.25 µg/mL de anfotericina B (BioWhittaker), fueron adquiridos de Gibco/BRL (Grand Island, NY, USA). El factor de crecimiento endotelial fue adquirido de Biomedical Technologies, Inc. (Stoughton, MA, USA). El suero fetal de bovino (SFB) fue comprado a HyClone (Loga, UT, USA). El material de plástico estéril para cultivo de tejidos fue de NUNC y COSTAR. El medio basal de diferenciación osteogénica (DBMO), está compuesto por: 0.1 µM de dexametasona, 10 µM β-glicerofosfato, 50 µM de L-ácido ascórbico 2-fosfato, y 20% de suero MCGS (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.). Todos los demás productos químicos fueron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

Obtención de células endoteliales

Se utilizaron 4-6 segmentos de cordones umbilicales humanos provenientes de partos eutócicos a tér-

mino y se establecieron los cultivos primarios como previamente se ha descrito.²⁰⁻²² Los cordones fueron colectados en el Hospital Troncoso, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Las donantes firmaron formas de consentimiento de la FES Iztacala-UNAM y del Instituto Nacional de Cardiología para donar los cordones con propósitos de investigación. Los segmentos se limpiaron por fuera con una gasa estéril. El interior de la vena umbilical se lavó con una solución salina HEPES (NaCl 142 mM, KCl 4.4 mM, Hepes 10.9 mM, glucosa 12.2 mM pH 7.5) para retirar la sangre contenida en el interior. Un extremo del cordón umbilical fue sellado y por el extremo libre se vertió, por la vena umbilical, solución salina con colagenasa (0.2 mg/mL), y se incubó a 37 °C durante 20 min; se recuperó la solución salina-colagenasa conteniendo las células endoteliales desprendidas y se centrifugó a 234 x g durante 6 min; por último se desechó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 8 mL de medio de cultivo M199 suplementado con 10% de SFB y antibióticos. Las células se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² y se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂. La pureza de los cultivos fue confirmada por su tinción positiva al factor von Willebrand por inmunofluorescencia.

Condiciones de cultivo

Las células fueron cosechadas por tratamiento con tripsina 0.05%-EDTA 0.02% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS: NaCl 150 mM, KCl 30 mM, Na₂HPO₄ 15 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.2), la tripsina se inactivó con la adición de 1 mL de suero. Para investigar la actividad de los factores osteogénicos, las células en su segundo pasaje, fueron sembradas a una densidad de 1.25 x 10⁴ células/cm² en placas de 24 pozos en medio M199 suplementado con 50 µg/mL de factor de crecimiento endotelial, 100 µg/mL de heparina, antibióticos, 2 mM de L-glutamina y 20% de SFB, a 37 °C y 5% de CO₂. Se permitió su adhesión al sustrato y 24 h después se cambió el medio M199 por medio osteogénico. A otro grupo de células, después de 24 h de adhesión, se les expuso a la hidralazina y a la 5'-aza-2'-desoxicitidina en un rango de concentraciones de 0.39 µM hasta 200 µM en el medio de cultivo durante 24 h, seguido de un cambio de medio el cual se reconstituyó cada semana en un 50% por un mes de cultivo.

Prueba de actividad de fosfatasa alcalina

Se preparó una solución de la sal de p-toluidina de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) a una

concentración de 50 mg/mL disolviéndola en dimetil formamida pura. Se preparó una solución de cloruro de tetrazolio nitro-azul (NBT) a una concentración de 50 mg/mL en dimetil formamida al 70%. La solución de trabajo se preparó mezclando 16.5 µL del concentrado de NBT con 33 µL del concentrado BCIP en 5 mL de PBS-MgCl₂ (5 mM). De esta solución se agregaron 300 µL a los pozos de la placa, se incubó a 37 °C a 5% CO₂ por 24 h. Todas las observaciones se realizaron en un microscopio invertido a un aumento total de 400X.

Tinción con rojo alizarín S

El rojo alizarín S tiñe los depósitos de calcio de color rojo naranja y el entorno rosado en las células. Después de concluido el tiempo de cultivo, se aspiró suavemente el medio de cultivo de cada pozo y las células se fijaron con etanol frío al 70% por 5 min a temperatura ambiente; se aspiró suavemente el alcohol; se lavó con agua MilliQ (MQ, Millipore) dos veces por 5 min cada una y se agregó 1 mL de rojo alizarín S al 2%. El pH de la solución de rojo alizarín S fue ajustada a 4.1-4.3 con hidróxido de amonio antes del procedimiento. La placa fue incubada a temperatura ambiente por 3 min; se retiró la solución de rojo alizarín S y se lavó tres veces con 2 mL de agua MQ.

Estudio de cultivos por microscopia

Las imágenes de microscopia se realizaron con un microscopio invertido de luz visible y fluorescente IX71 (Olympus) equipado con un sistema de cámara de alta velocidad monocromático CCD QImaging Retiga Exi SVGA y un programa IPLab para Mac (versión 4.0.5) para el procesamiento y análisis de imagen.

RESULTADOS

Para investigar la actividad de los factores osteogénicos, las HUVEC se sembraron a una densidad baja, que permitió observar óptimamente el crecimiento y diferenciación de los cultivos. Las características fenotípicas de las HUVEC fueron su forma de huso y estelada con citoplasma fino homogéneo, típicamente asociado a una forma fibroblástica. Las células control (sin tratamiento osteogénico) mostraron poca matriz extracelular (Figura 1A), mientras que las células tratadas aparecieron más cortas y planas, y rodeadas de matriz extracelular que subsecuentemente se mineralizó *in vitro* (Figura 1B). La prueba de la fosfatasa alcalina fue positiva demostrando la presencia de la enzima en células

expuestas al tratamiento osteogénico por 28 días (Figura 2); la prueba fue ligeramente positiva en células control (datos no mostrados). Los ensayos con hidralazina y 5'-aza-2'-desoxicitidina, conocidos factores desmetilantes del ADN, no fueron factores de diferenciación osteogénica a lo largo de todo el rango de concentraciones utilizado, de 0.39 μM hasta

200 μM (datos no mostrados). Además mostramos la producción *in vitro* de partículas mineralizadas extracelulares (reacción positiva al rojo alizarín S). La matriz extracelular de células tratadas a los 28 días de cultivo, no pudo ser desprendida del sustrato de cultivo ni por medios químico-enzimáticos (tripsina-EDTA), ni mecánicos (gendarme) (Figura 3).

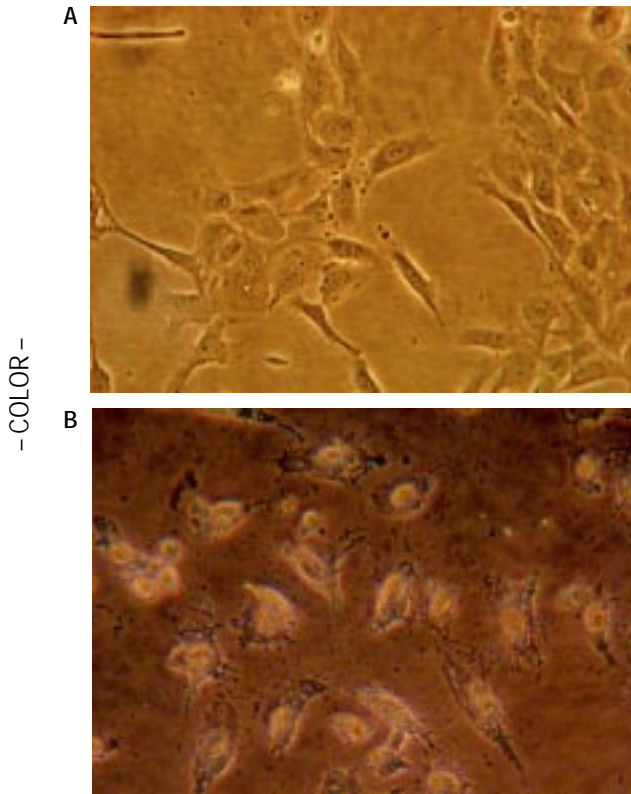


Figura 1. Micrografías que muestran las HUVEC control (sin tratamiento) (A) y cultivadas en presencia de medio osteogénico por 28 días (B). Aumento 400X.

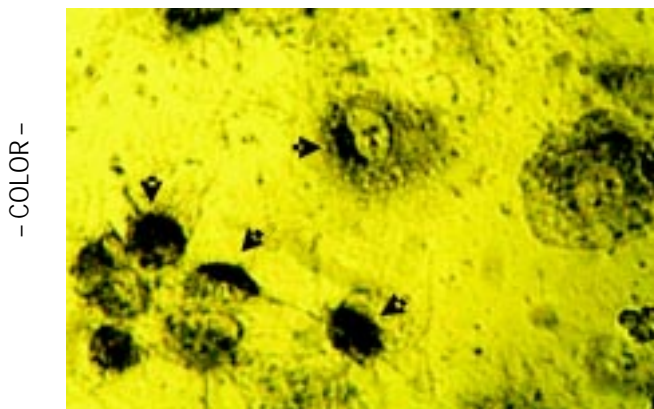


Figura 2. Ensayo de fosfatasa alcalina positivo (flechas) en las HUVEC expuestas al tratamiento osteogénico por 28 días. Aumento 400X.

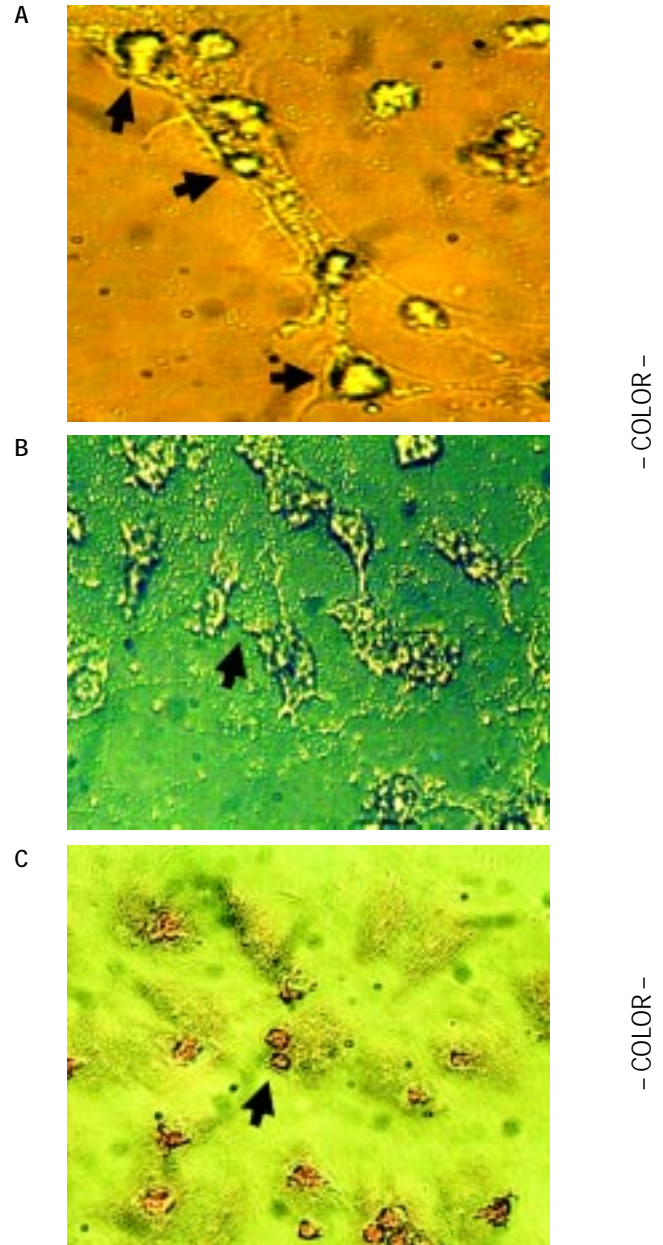


Figura 3. Las HUVEC después del tratamiento con el medio osteogénico durante 28 días. A. Apariencia de la mineralización (flechas) de las HUVEC, aumento 400X. B. Calcificaciones y aspecto de la matriz extracelular (flecha), aumento 100X. C. Reacción positiva al rojo alizarín S (flecha), aumento 100X.

DISCUSIÓN

Se ha reconocido el papel que juegan las células madre mesenquimales en la formación de diversos tejidos, entre ellos el hueso. A partir de recientes investigaciones se ha podido establecer que otro tipo de células, las HUVEC, también tienen propiedades de células mesenquimales. De esta manera las dos poblaciones celulares podrían ser consideradas células madre multipotentes. Todavía existe la controversia de si las células endoteliales encontradas en el revestimiento de la vena del cordón umbilical son una población homogénea o contienen focos de células mesenquimales, responsables de los hallazgos similares con células madre mesenquimales de médula ósea. Nuestros resultados muestran que, en efecto, se trata de una población homogénea de células que se localiza en el revestimiento de la vena, ya que son uniformemente positivas al factor de von Willebrand. Sin embargo, al comenzar el proceso de diferenciación osteogénica, todas las células se diferencian simultáneamente, aunque con grados diferentes, reflejando heterogeneidad funcional, por ejemplo, más mineralización en unas células que en otras. El medio osteogénico DBMO, contiene factores de diferenciación osteogénica utilizados en la inducción de biomineralización de corales^{23,24} y en líneas de células madre mesenquimales humanas derivadas de médula ósea (Cambrex, Co.) usadas para el estudio de la afectación de diversos factores hormonales y químicos durante la inhibición de la formación de hueso.

En nuestro estudio, únicamente el medio osteogénico tuvo una fuerte inducción de hueso, mas no así la hidralazina ni la 5'-aza-2'-desoxicitidina, dos fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento de la hipertensión arterial y del cáncer respectivamente, por su actividad desmetilante del ADN.

En las células madre mesenquimales y células endoteliales postulamos que también existen regiones silenciadas que necesitan ser activadas durante los procesos de diferenciación osteogénica. Sin embargo, en nuestros cultivos, el uso de la hidralazina y la 5'-aza-2'-desoxicitidina no favoreció la diferenciación de osteoblastos concluyendo de esta manera que la desmetilación del ADN no es suficiente para promover la diferenciación osteogénica. Es probable que además de éstos existan otros elementos activadores o procesos adjuntos o secundarios para llevar a cabo la osteogénesis.

De entre los elementos que componen nuestro medio osteogénico, el ácido ascórbico tiene particular importancia. El ácido ascórbico sirve como agente reductor (un antioxidante) que favorece altamente la

desmetilación oxidativa del ADN por la proteína AlkB, una oxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato y hierro.²⁵ Además, se ha comprobado que el tratamiento con ácido ascórbico en células MC3T3-E1 de ratón inicia la formación de colágena en matriz extracelular, incrementa la fosfatasa alcalina y promueve la síntesis de varias proteínas relacionadas con osteoblastos.²⁶ Estudios previos han demostrado que la adición de ácido ascórbico estimula la producción de colágena en muchos metazoarios.²⁷⁻³⁰ La cromatina condensada y los genes silenciados están siempre presentes en el material genético de las células madre.

Se ha postulado con anterioridad que las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea son células no hematopoyéticas capaces de generar colonias provenientes de una sola célula llamada unidad formadora de colonias de fibroblastos (CFU-Fs). Además de proveer el microambiente de la médula ósea, estas células se diferencian en varios tipos de linajes celulares.³¹ Sin embargo, la limitante en estos estudios es la disponibilidad de médula ósea humana. Las células estromales del cordón umbilical han llamado la atención últimamente; sin embargo, su diferenciación hacia linajes específicos en humanos se ha demostrado en pocos estudios. La relevancia de nuestro trabajo radica en el hecho de que demostramos que un producto de desecho, disponible y de bajo costo como el cordón umbilical de humano, es una fuente alterna de células vasculares endoteliales con un potencial de diferenciación similar al descrito para células mesenquimales de médula ósea, útiles para terapias celulares e ingeniería de tejidos.

A diferencia de las células madre mesenquimales de la médula ósea, las células vasculares endoteliales de la vena de cordón umbilical humano aún están lejos de estar bien caracterizadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores deseamos agradecer el apoyo económico recibido por el CONACyT a los proyectos 52589 y 52682. Asimismo, deseamos agradecer especialmente al MSc Daniel Rivas de la Division of Geriatric Medicine, Center for Bone and Periodontal Research, Montreal, Quebec, Canada por sus consejos y ayuda recibida.

REFERENCIAS

1. Lafita J. Physiology and bone physiopathology. *An Sist Sanit Navar* 2003; 26(Suppl. 3): 7-15.
2. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by

- bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 2006; 98: 538-54.
3. Shanthly N, Aruva MR, Zhang K, Mathew B, Thakur ML. Stem cells: a regenerative pharmaceutical. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 50: 205-16.
 4. Park KS, Lee YS, Kang KS. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *J Vet Sci* 2006; 7: 343-8.
 5. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004; 95: 343-53.
 6. Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 1263-78.
 7. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 2007; 25: 319-31.
 8. Latham T, Gilbert N, Ramsahoye B. DNA methylation in mouse embryonic stem cells and development. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 31-55.
 9. Barlow DP. Gametic imprinting in mammals. *Science* 1995; 270: 1610-13.
 10. Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 362-78.
 11. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-74.
 12. Stirzaker C, Millar DS, Paul CL, Warnecke PM, Harrison J, Vincent PC, et al. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 2229-37.
 13. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9700-04.
 14. Fan G, Martinowich K, Chin MH, He F, Fouse SD, Hutrich L, et al. DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 2005; 132: 3345-56.
 15. Jüttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11797-801.
 16. Jones PA, Taylor SM, Mohandas T, Shapiro LJ. Cell cycle-specific reactivation of an inactive X-chromosome locus by 5-azadeoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 1215-19.
 17. Jones PA. Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell* 1985; 40: 485-6.
 18. Haaf T, Schmid M. 5-Azadeoxycytidine induced undercondensation in the giant X chromosomes of *Microtus agrestis*. *Chromosoma* 1989; 98: 93-8.
 19. Jablonka E, Goitein R, Marcus M, Cedar H. DNA hypomethylation causes an increase in DNase-I sensitivity and an advance in the time of replication of the entire inactive X chromosome. *Chromosoma* 1985; 93: 152-6.
 20. Gimbrone MA Jr. Culture of vascular endothelium. In: Spaet TH (ed.). *Progress in Hemostasis and Thrombosis*. New York: Grune & Stratton; 1976, p. 1-28.
 21. Maciag T, Hoover GA, Stemerman MB, Weinstein R. Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 1981; 91: 420-6.
 22. Thornton SC, Mueller SN, Levine EM. Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 1983; 222: 623-5.
 23. Al-Salihi KA, Samsudin AR. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiation and proliferation on the surface of coral implant. *Med J Malaysia* 2004; 59(Suppl. B): 45-6.
 24. Helman Y, Natale F, Sherrell RM, Lavigne M, Starovoytov V, Gorbunov MY, Falkowski PG. Extracellular matrix production and calcium carbonate precipitation by coral cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 54-8.
 25. Welford RW, Schlemminger I, McNeill LA, Hewitson KS, Schofield CJ. The selectivity and inhibition of AlkB. *J Biol Chem* 2003; 278: 10157-61.
 26. Franceschi RT, Iyer BS, Cui YQ. Effects of ascorbic-acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine Mc3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 843-54.
 27. Peterkofsky B, Udenfriend S. Enzymatic hydroxylation of proline in microsomal polypeptide leading to formation of collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; 53: 335-42.
 28. Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1135-40.
 29. Murad S, Grove D, Lindberg KA, Reynolds G, Sivarajah A, Pinnell SR. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2879-82.
 30. Tsuneto M, Yamazaki H, Yoshino M, Yamada T, Hayashi S. Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 1239-46.
 31. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med* 2007; 140: 67-81.

Reimpresos:

Dr. Julio R. Cáceres-Cortés

Laboratorio de Inmunología, Unidad de Morfofisiología
 Facultad de Estudios Superiores Iztacala
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Av. De los Barrios No. 1,
 Los Reyes Iztacala,
 54090, Tlanepantla, Edo. de México

Recibido el 22 de enero de 2008.
 Aceptado el 20 de octubre de 2008.