

**Revista Mexicana de
Medicina Física y Rehabilitación**

Volumen 17
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 2005
July-September

Artículo:

Estandarización de la técnica para la obtención de células mesenquimatosas de médula ósea de rata para su aplicación en el manejo de lesiones medulares

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Sociedad Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  **Índice de este número**
-  **Más revistas**
-  **Búsqueda**

***Others sections in
this web site:***

-  ***Contents of this number***
-  ***More journals***
-  ***Search***



medigraphic.com

Estandarización de la técnica para la obtención de células mesenquimatosas de médula ósea de rata para su aplicación en el manejo de lesiones medulares

Dr. Marco A. Guerrero-Godínez,* D. en C. Rebecca E. Franco-Bourland,* D. en C. Gabriel Guízar-Sahagún,** M. en C. Guadalupe Cervantes Vázquez***

RESUMEN

Introducción: Una nueva opción para el manejo de lesiones medulares es el trasplante de células inmaduras, para protección y/o reparación del sitio de la lesión. Una fuente accesible y renovable de células progenitoras es la médula ósea. Hay una subpoblación de células mononucleares en la médula ósea que se adhiere a poliestireno, las células mesenquimatosas, que por su inmadurez pudieran ser útiles en el manejo de la lesión medular. **Objetivos:** Obtener *in vivo* células mesenquimatosas de la médula ósea de una tibia de rata, determinar su inmunofenotipo y probar su viabilidad después de varios días en cultivo. **Métodos:** Se aspiraron *in vivo* 500 µL de médula ósea/sangre de una tibia perforada de rata Wistar. Con gradiente de Ficoll, se aisló la fracción de células mononucleares. Estas células fueron cultivadas en cajas Petri de poliestireno de alta calidad para la separación por adhesión de las células mesenquimatosas. El fenotipo inmunológico de las células mesenquimatosas se determinó por citometría de flujo y su viabilidad se probó por su permeabilidad al azul de tripano. **Resultados:** El procedimiento quirúrgico para la obtención *in vivo* de la médula ósea de tibia de ratas no afectó su marcha. [Esta observación es relevante para futuros estudios de ratas con lesión medular que sean manejadas con células mesenquimatosas de médula ósea autóloga, que serían evaluados en base a su función motora]. Se obtuvieron células mesenquimatosas por adhesión a poliestireno con un rendimiento de 500,000 células/500 µL de médula ósea/sangre, viables en un 98% al noveno día de cultivo. Estas células mostraron un inmunofenotipo positivo para CD-10, CD-13 y CD-61, que apoya su identidad. **Discusión:** Se obtuvo *in vivo* médula ósea de un solo hueso largo (tibia) de rata con daño mínimo en tejidos blandos, sin alterar su marcha. Los marcadores inmunológicos comúnmente asociados a células mesenquimatosas son CD-10, CD-13 y Thy-1 (CD-90). Las células mesenquimatosas que aislamos aquí fueron positivas para CD-10, CD-13 y CD-61. **Conclusión:** De la fracción de células mononucleares de médula ósea aspirada *in vivo* de una tibia se obtuvieron células mesenquimatosas, con un inmunofenotipo característico, en cantidad suficiente para su uso en trasplante a médula espinal lesionada.

Palabras clave: Médula ósea, células mesenquimatosas, lesión medular.

ABSTRACT

Introduction: A new option for the management of spinal cord lesions is the transplant of immature cells for protection and/or repair of the site of injury. A readily accessible and renewable source of progenitor cells is the bone marrow. There is a subpopulation of mononuclear cells in the bone marrow that adhere to polystyrene, the stromal cells, which because of their immaturity could be useful in the management of spinal cord lesions. **Objectives:** Obtain *in vivo* stromal cells from the bone marrow of one rat tibia, determine their immunophenotype, and test their viability after several days in culture. **Methods:** Five hundred microliters of bone marrow/blood were aspirated *in vivo* from a perforated Wistar rat tibia. Using a Ficoll gradient, the mononuclear cell fraction was obtained. These cells were cultured in high quality polystyrene Petri dishes for the separation by adhesion of the stromal cells. Stromal cell immunological phenotype was determined by flow cytometry and their viability by their permeability to trypan blue. **Results:** The surgical procedure to obtain *in vivo* bone marrow from rat tibia did not affect their motor performance. [This observation is relevant for future studies of rats with spinal cord lesions treated with autologous bone marrow stromal cells, which would be evaluated on the basis of their motor performance]. Stromal cells were obtained by adhesion to polystyrene with a yield of 500,000 cells/500 µL of bone marrow/blood; 98% of the cells were viable after 9 days in culture. These cells showed a positive immunophenotype for CD-10, CD-13 and CD-61. **Discussion:** Bone marrow was obtained *in vivo* from a single long rat bone (tibia), with minimum damage to soft tissues and without affecting motor performance. The most common markers associated to stromal cells are CD-10, CD-13 and Thy-1 (CD-90). The stromal we isolated here were positive for CD-10, CD-13, and CD-61, which supports their identity. **Conclusion:** From the fraction of mononuclear cells of bone marrow aspirated *in vivo* from rat tibia, stromal cells were obtained showing a characteristic immunophenotype, in sufficient amount for use in transplantation to injured spinal cords.

Key words: Bone marrow, stromal cells, spinal cord lesion.

INTRODUCCIÓN

La lesión medular generalmente involucra un daño irreversible al tejido y la consecuente discapacidad^{8,13}. En busca de

* Centro Nacional de Rehabilitación, Servicio de Bioquímica-Ortopedia.

** Centro de Investigación "IMSS/PROYECTO CAMINA".

*** Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio. México, D.F., México.

nuevas alternativas para el manejo de la lesión medular se ha propuesto el trasplante de células inmaduras para proteger al tejido lesionado y/o promover la reparación del sitio de la lesión^{1,9}. En esta última década se ha utilizado material celular embrionario como fuente de células madre (stem cells) para trasplante a tejidos lesionados³¹. El inconveniente del uso de células madre de origen embrionario es su poca disponibilidad²⁶, así como la controversia legal y ética que ha generado la destrucción de embriones humanos para obtener sus células para experimentación²¹. Células inmaduras de tejidos de animal adulto³⁴, parcialmente diferenciadas, con capacidad de diferenciación, aunque de difícil acceso, también han sido trasplantadas exitosamente a tejidos lesionados diferenciándose a células maduras propias del tejido hospederio¹⁰.

Otra fuente de células madre y/o células progenitoras es la médula ósea. Es un tejido compuesto de células diferenciadas de la línea blanca y de células inmaduras, capaces de diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo*³¹. Lo que es particularmente atractivo de esta fuente de células inmaduras es su fácil acceso y su capacidad de renovación⁹. Las células inmaduras de médula ósea de ratón o de humano son células mononucleares que se pueden separar de las demás células mononucleares por su adhesión diferencial a plástico (poliestireno)⁷; son capaces de generar considerables unidades formadoras de colonias de la serie granulocítica-mieloide en cultivos a corto plazo⁷. Se les conoce como células estromales o mesenquimatosas⁷, por su capacidad de diferenciarse en tejido muscular, óseo, condral y líneas adipogénicas^{3,9}.

Una manera de identificar a las células mesenquimatosas o estromales es por su resistencia al tratamiento con 5-fluorouracilo (agente antineoplásico), una propiedad de células inmaduras^{6,25}. Otra forma es a través de la identificación de marcadores que expresan en la superficie celular, tales como: CD-10 CD-13 y CD 90 (Thy-1) o bien, por la ausencia de expresión de marcadores propios de otro tipo de células como CD-34 y CD-45^{10,11}. Otros marcadores de superficie descritos, aunque con menos frecuencia, para las células mesenquimatosas de médula ósea y células progenitoras neuronales son CD-164 y CD-172a. Ambos tipos celulares también expresan nestina, una proteína propia de neuronas inmaduras³².

Células progenitoras de médula ósea se han empleado exitosamente en la regeneración de tejido dañado. El trasplante de una fracción de médula ósea aislada mediante citometría de flujo y biomagnetismo en zonas de infarto cardiaco en ratón ha resultado en el mejoramiento de la función ventricular debido a la diferenciación del trasplante en tejido cardíaco nuevo^{23,30,31}. La inyección local o sistémica de una fracción de médula ósea genéticamente marcada en ratón ha resultado en la regeneración de fibras musculares dañadas químicamente⁴. Lesiones hepáticas en ratón han sido tratadas exitosamente trasplantando células madre aisladas de médula ósea, ob-

servándose la formación de tejido hepático nuevo y consecuentemente, una función hepática recuperada¹⁵.

Además de su diferenciación a células de músculo, hígado y corazón, las células progenitoras de médula ósea de rata y humano se han diferenciado *in vitro*³³ e *in vivo*¹⁴ en células con morfología neuronal. Kopen, et al., 1999 trasplantando células mesenquimatosas de médula ósea por inyección directa al ventrículo lateral de ratón neonatal, observaron que dichas células podían diferenciarse *in vivo* en astrocitos y neuronas, además de desplazarse a través del cerebro del animal. Esta observación demuestra que las células mesenquimatosas también se pueden comportar como células madre neuronales¹.

Células mesenquimatosas de médula ósea ya han sido aplicadas exitosamente en el manejo de la lesión medular. Chopp, et al., 2000 demostraron que el trasplante de células mesenquimatosas de médula ósea a ratas después de una lesión medular, resulta en una mayor recuperación de la función motora de las extremidades traseras evidente a partir de la segunda semana del trasplante en comparación con ratas lesionadas tratadas con vehículo.

Aquí describimos la obtención de células mesenquimatosas de médula ósea de tibia de rata viva. Las células fueron tipificadas por citometría de flujo y mantenidas en cultivo por 9 días.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 g de peso corporal. Fueron mantenidas en el bioterio del CNR en jaulas de plástico individuales con libre acceso a agua y alimento, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado de animales de experimentación.

Obtención *in vivo* de médula ósea/sangre de tibia de rata. Se anestesiaron ratas con una mezcla de ketamina 65 mg/kg (Cheminova) y xilacina 10 mg/kg (Bayer) por vía intraperitoneal⁵. Con técnicas de asepsia y antisepsia se realizó una incisión de 5 mm de longitud en el tercio superior y cara medial en tibia, dejando expuesta un área de tejido óseo. Con soporte para broca manual y una broca con un diámetro de 1.6 mm (Triumph) en posición perpendicular a la superficie de la tibia, se realizó manualmente una perforación en el tejido óseo, hasta llegar al canal medular¹⁷ (Figura 1A). Enseguida, mediante una jeringa de 3 mL con aguja de 22G x 32 mm (BD Plastipak) adaptada con una cánula de polipropileno, enjuagadas con 200 µL de heparina (PISA, 1,000 UI/mL) y colocando la punta de la cánula en la perforación, se aspiraron *in vivo* 500 µL de médula ósea/sangre (Figura 1B).

Al término del procedimiento se cerró la herida quirúrgica en un solo plano con sutura de nylon 3-0, se limpió la

herida con isodine espuma y se mantuvo en observación a la rata hasta recuperarse de la anestesia.

Fraccionamiento de la médula ósea/sangre por gradiente en Ficoll: obtención de células mononucleares. Quinientos microlitros de médula ósea/sangre obtenidos por aspiración *in vivo* de tibia de rata, se mezclaron inmediatamente con 1.5 mL de medio de cultivo L-15 Leibovitz con rojo de fenol y L-glutamina (Gibco) en tubos de cultivo de poliestireno estériles de 5 mL (Sarstedt). En otro tubo de cultivo de 5 mL con 3 mL de Lymphoprep (Ficoll) estéril (Nycomed) se colocaron 2 mL de la mezcla de médula ósea/sangre y medio L-15. Se centrifugó la preparación a 400 x g (Hermle Z320) por 30 min y a temperatura ambiente; la corrida se detuvo sin freno. Cuidadosamente se recogieron 200 a 300 μ L de la interfase turbia que se formó entre el medio acuoso y la capa

de Ficoll, que es precisamente la fracción de células mononucleares o capa linfocitaria.

Para eliminar el Ficoll, se mezcló la fracción de células mononucleares con 500 μ L de una solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9% (Abbott) en un tubo para cultivo, se centrifugó la mezcla a 234 x g por 5 min; se detuvo la corrida sin freno. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 300 μ L de la solución de cloruro de sodio al 0.9%.

Obtención de células adherentes a poliestireno a partir de la fracción de células mononucleares de médula ósea/sangre. Ciento cincuenta microlitros de la suspensión de células mononucleares libres de Ficoll se cultivaron en placas para cultivo de poliestireno de alta calidad con 6 pozos de 9.5 cm² de área de crecimiento (Sarstedt), en 1.5 mL de medio de cultivo de Iscove, un medio de Dulbecco modificado con L-glutamina y rojo de fenol (IMDM, Gibco), con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 10 mL/L de una solución de antibióticos (10,000 U/ μ L de penicilina G sódica, 10,000 mg/mL de sulfato de estreptomicina y 25 mg/ μ L de anfotericina B, Gibco). Las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂, en ambiente húmedo (National Weinicke Company) por 3 días. Se vigiló diariamente la viabilidad de las células mediante el uso de un microscopio invertido (Axiovert 25, Zeiss), así como el volumen del medio de cultivo en cada pozo. Al cuarto día se realizó un cambio de medio de cultivo, se agitó la caja moderadamente y se retiró el medio. Las células que permanecieron adheridas (células mesenquimatosas) se lavaron con 500 μ L de medio IMDM con agitación suave. Para su estudio de viabilidad y caracterización inmunofenotípica, las células mesenquimatosas fueron suspendidas en 2 mL de medio IMDM con 10% de suero fetal bovino y 10 mL/L de la solución de antibióticos.

Viabilidad de las células mesenquimatosas con azul de tripano. En un tubo de vidrio con 400 μ L de azul de tripano al 0.4% (Gibco) se añadieron 100 μ L de la suspensión de células mesenquimatosas (dilución 1:5). Se agitó la mezcla de manera moderada e inmediatamente después se colocó en la cámara de Neubauer (American Optical Company) para hacer la cuenta de células viables.

Caracterización de las células mesenquimatosas por citometría de flujo. Se determinó el inmunofenotipo de las células mesenquimatosas por citometría de flujo, empleando anticuerpos monoclonales anti-humano (Beckman Coulter) para CD-10, CD-13 y CD-61.

RESULTADOS

Aislamiento de médula ósea/sangre de tibia de rata. En la figura 2 se muestra una fotomicrografía de médula ósea/sangre extraída de tibia de rata, en la que se aprecian células mononucleares, gran cantidad de eritrocitos y un megacariocito.

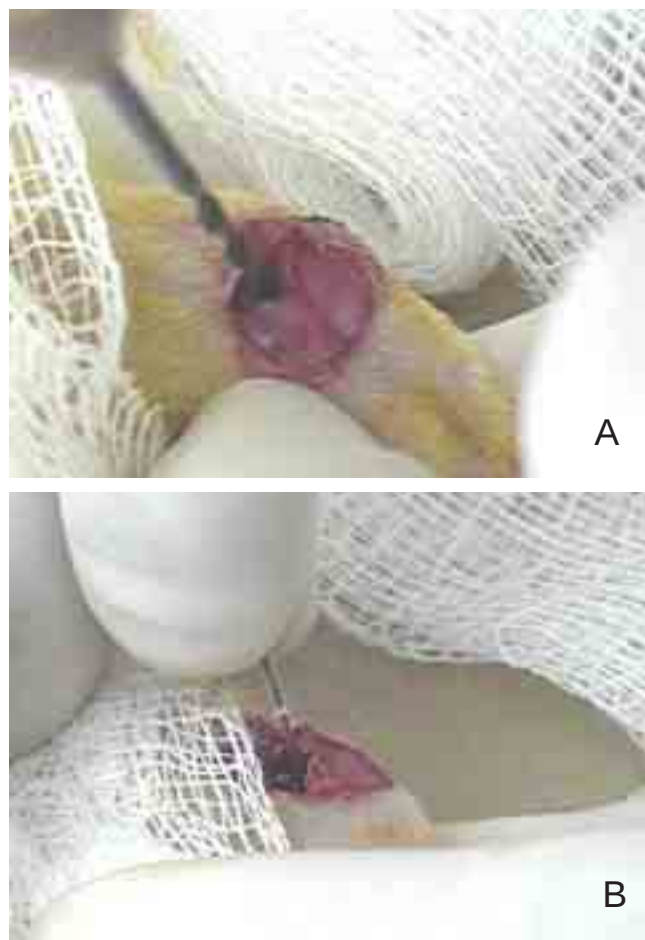


Figura 1. Obtención *in vivo* de médula ósea de la tibia de rata Wistar. A, Perforación de la tibia con una broca de 1.6 mm de diámetro. B, Aspiración de la médula ósea a través de la perforación con una cánula de polipropileno.

Obtención de células mesenquimatosas de médula ósea/sangre: viabilidad y conteo. A partir de cultivos de la fracción de células mononucleares de médula ósea/sangre obtenida en gradiente de Ficoll, al cuarto día de cultivo se separaron células mesenquimatosas por adherencia diferencial a poliestireno de alta calidad. Vistas en el microscopio invertido las células mesenquimatosas presentaron una morfología esférica (*Figura 3*). Con azul de tripano, las células mesenquimatosas mostraron una viabilidad del 98% con un rendimiento de 500,000 células/500 μ L de médula ósea/sangre después de 9 días en cultivo.

Caracterización inmunofenotípica de las células mesenquimatosas. La tipificación del inmunofenotipo de las células mesenquimatosas fue positivo para los tres anticuerpos utilizados CD 10, CD 13 y CD 61, como se ilustra en los histogramas de un parámetro de la *figura 4*.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los últimos 5 años sugieren que el trasplante de células madre para la regeneración de diversos tipos de tejidos lesionados es un procedimiento con gran potencial (ref). Una de las limitantes es la obtención de estas células. Su obtención a partir de embriones humanos conlleva cuestionamientos éticos y morales²¹. Su obtención de organismos adultos es compleja debido a su localización¹⁹ y dificultad para mantenerlas en cultivo¹⁸.

Una fuente de células multipotenciales renovable y de fácil acceso es la médula ósea. Chopp et al., 2000 aislaron

células mesenquimatosas multipotenciales de médula ósea de tibia y fémur de rata que trasplantaron a ratas con lesión medular, con un efecto benéfico aparente a las 2 semanas después del trasplante. En este estudio la limitante fue el uso de inmunosupresores para evitar el rechazo del tejido extraño. Nosotros hemos diseñado un procedimiento para aislar células inmaduras de médula ósea **autóloga**, de una sola tibia de rata, para el manejo de la misma rata con lesión medular, con el propósito de evitar su rechazo, sin la necesidad del uso de inmunosupresores.

La obtención de células mesenquimatosas de médula ósea autóloga de tibia implica su aislamiento a través de una perforación en la tibia de la rata viva sin alterar su marcha (un parámetro de recuperación a evaluar en las ratas con lesión medular trasplantadas). El procedimiento quirúrgico descrito aquí no afectó el estado general de la rata, no produjo daño importante a la tibia ni afectó la marcha de las ratas operadas. La recuperación del tejido óseo en el sitio de la perforación ocurre entre los días 5 y 14 postquirúrgicos¹⁷. Es claro, que el procedimiento descrito aquí para obtener médula ósea de tibia de ratas vivas no interferirá cuando valoremos la función motora de las extremidades posteriores de una rata con lesión medular posterior al trasplante de células mesenquimatosas obtenidas de su propia tibia.

Debido al sangrado en el canal medular que se produce durante la aspiración de la médula ósea la muestra de médula ósea que procesamos para la obtención de células mesenquimatosas es una mezcla de médula ósea/sangre.

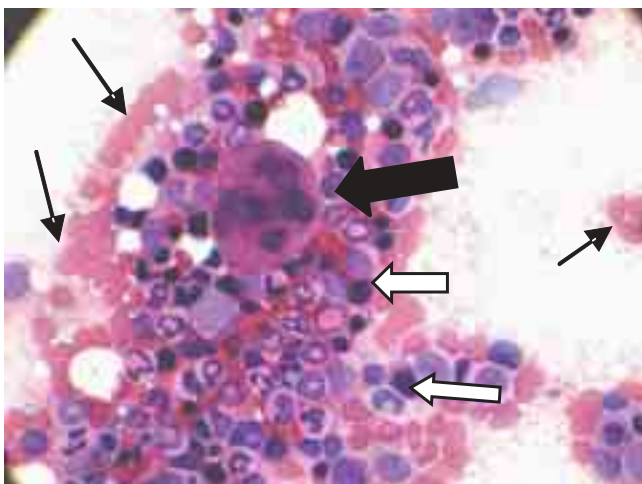


Figura 2. Fotomicrografía de frotis de médula ósea/sangre de tibia de rata teñida con hematoxilina-eosina. Megacariocito (flecha en bloque negra), células mononucleares (flechas en bloque blancas) y glóbulos rojos (flechas). Microscopio de luz, 100X.

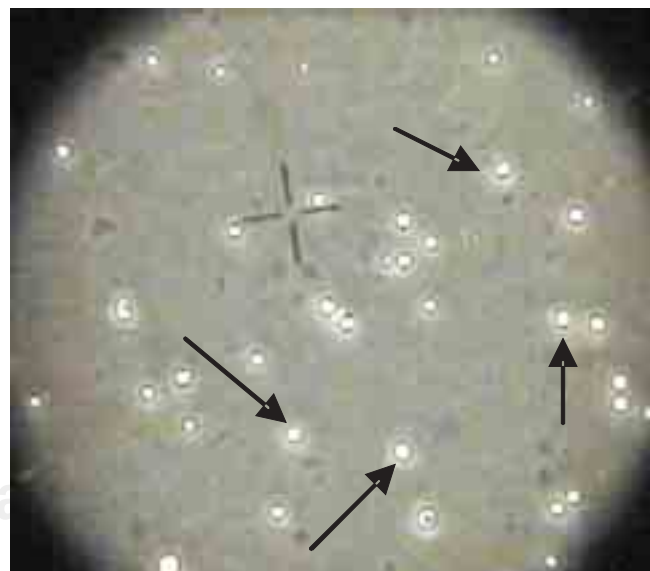


Figura 3. Fotomicrografía de células mesenquimatosas. Células adheridas al plástico (flechas) al cuarto día del cultivo. Microscopio invertido, 40X.

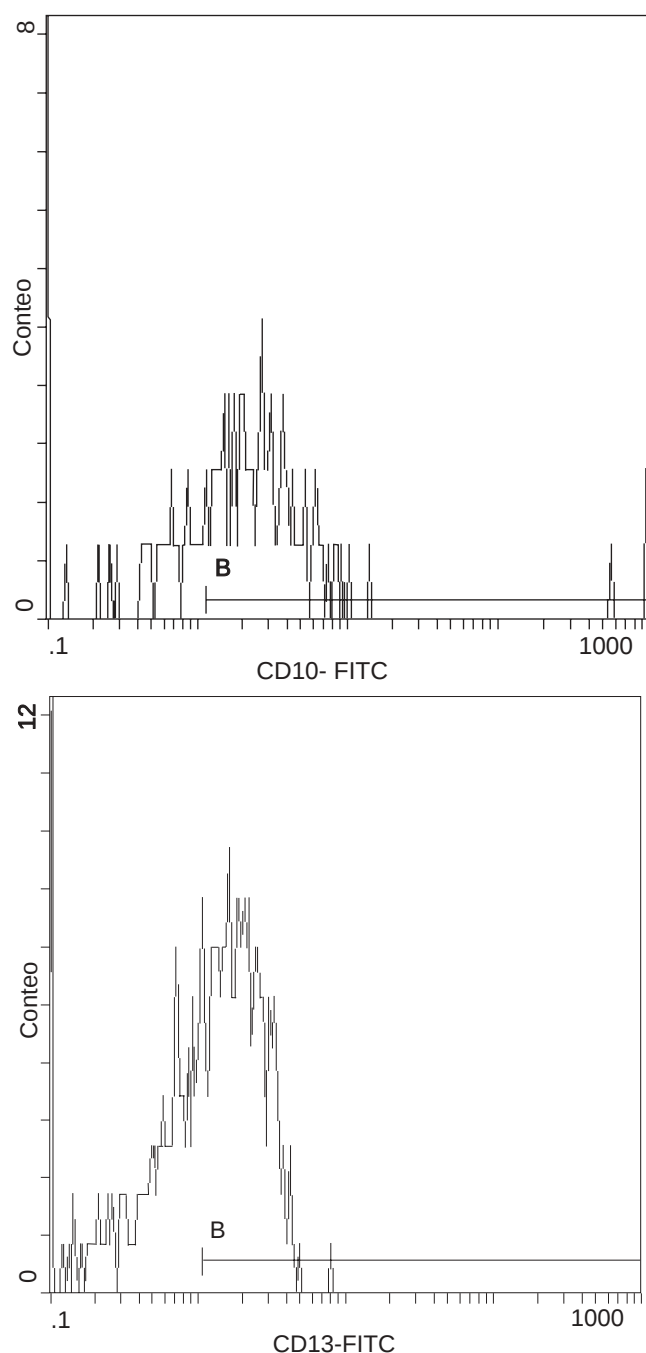
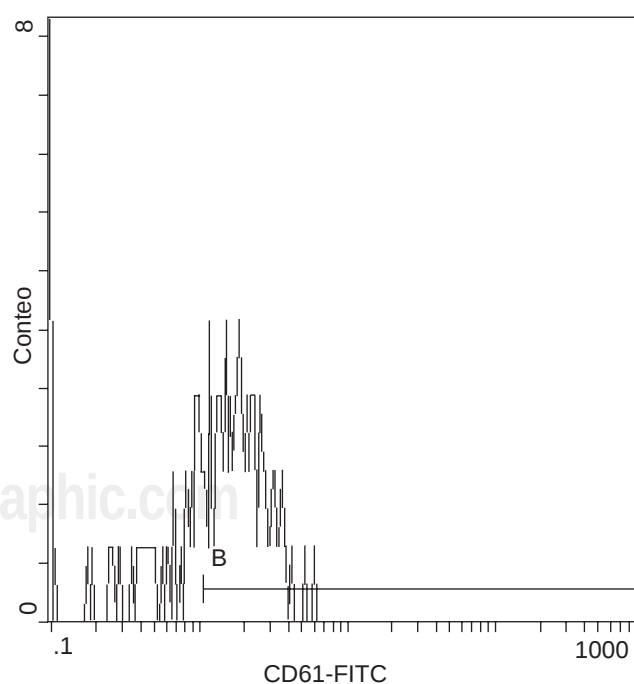


Figura 4. Análisis por citometría de flujo del fenotipo inmunológico de las células mesenquimatosas de médula ósea/sangre de tibia de rata. Los «histogramas de un parámetro» ilustran el conteo del número de células (eje de las Y) positivas para un marcador de superficie CD-10, CD-13 ó CD-61, identificados con anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo y medidos según la intensidad de la fluorescencia (eje de las X). A. Histograma para CD-10. El desplazamiento de la curva hacia la derecha indica un marcaje positivo; la altura de la curva, el número de células de la preparación que son positivas. B. Histograma para CD-13. C. Histograma para CD-61.

Las células mononucleares que se aíslan en la interfase entre el Ficoll y el medio de cultivo son células hematopoyéticas, no hematopoyéticas, células precursoras y linfocitos, con capacidad de proliferar y diferenciarse¹. De esta fracción separamos las células mesenquimatosas de las demás células por su adherencia al plástico. Estas células mesenquimatosas proliferan y se diferencian en cultivo fácilmente, en comparación con células precursoras obtenidas de cordón umbilical, que además tienen una menor supervivencia¹⁸.

Las cajas de cultivo que utilizamos para separar las células mesenquimatosas de las demás células mononucleares, están hechas de poliestireno de alta calidad, el cual presenta una mejor superficie para su adhesión¹⁶. Este plástico contiene en su superficie componentes nitrogenados cargados positivamente que permiten primero la adhesión de fibronectina y vitronectina que se encuentran en el suero con el que se enriquece al medio de cultivo. Estas proteínas son las que luego promueven la adhesión de las células mesenquimatosas a la superficie de la caja de cultivo^{20,27-29}. Las células mesenquimatosas que obtuvimos de la muestra de médula ósea/sangre por adhesión sobrevivieron en cultivo por nueve días en un 98%.

Existe controversia respecto a la expresión de marcadores característicos en la superficie de las células mesenquimatosas, pero los más comúnmente descritos son: CD-10, CD-13 y Thy-1 (CD-90)^{7,10,12,24,32}. Empleando anticuerpos monoclonales anti-marcadores de humano, demostramos por citometría de flujo que las células me-



senquimatosas aisladas son positivas para CD-10, CD-13 y CD-61³².

CONCLUSIÓN

La técnica de aspiración descrita aquí para la obtención *in vivo* de una mezcla de médula ósea/sangre de una tibia de rata rinde una fracción de células mononucleares en gradiente con Ficoll adecuada para obtener, por adhesión diferencial a poliestireno, células mesenquimatosas, según su inmunofenotipo y su propiedad adherente al plástico, en cantidad suficiente para su uso en trasplante a médula espinal lesionada. El procedimiento quirúrgico no alteró la marcha de las ratas, lo que nos permitirá valorar el efecto de un trasplante autólogo de células mesenquimatosas aisladas *in vivo* de una tibia de rata sobre la función motora de la misma rata con lesión medular por contusión.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al D. en C. Andrés A. Gutiérrez López el uso del microscopio invertido.

REFERENCIAS

1. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brain of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3908-3913.
2. Chopp M, Zhang XH, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000; 11: 3001-3005.
3. Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414: 92-97.
4. Ferrari G, Cusella-DeAngelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
5. Franco-Bourland RE. Vasopressinergic, oxytocinergic and somatostatinergic neuronal activity after adrenalectomy and immobilization stress. *Neurochem Res* 1998; 23: 695-701.
6. Gordon MY, Riley GP, Greaves MF. Plastic-adherent progenitor cells in human bone marrow. *Exp Hematol* 1987; 15: 772-778.
7. Gordon MY. Plastic-adherent cells in human bone marrow generate long-term hematopoiesis *in vitro*. *Leukemia* 1994; 8: 865-870.
8. Hamilton BB, Deutsch A, Russell C, Fiedler RC, Granger CV. Relation of disability costs to function: spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1999; 80: 385-391.
9. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injury spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2199-2204.
10. Horwitz EM, Keating A. Nonhematopoietic mesenchymal stem cell: What are they? *Cytotherapy* 2000; 2: 387-388.
11. Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are sensitive to plating density and expand more rapidly from single cell derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001; 19: 219-225.
12. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz GXR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.
13. Kirshblum SC, O'Connor KC. Predicting neurologic recovery in traumatic cervical spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1998; 79: 1456-1466.
14. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10711-10716.
15. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nature Med* 2000; 11: 1229-1234.
16. Laluppa J A, McAdams T A, Papoutsakis ET, Miller WM. Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Mater Res* 1997; 36: 347-359.
17. Landry PS, Marino AA, Sadasivan KK, Albright JA. Bone Injury response. *Clin Ortho Rel Res* 1996; 332: 260-273.
18. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: Bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; 86: 1099-1100.
19. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Med* 1999; 5: 1410-1412.
20. McFarland CD, Mayer S, Scotchford C, Dalton BA, Steele JG, Downes S. Attachment of cultured human bone cells to novel polymers. *J Biomed Mater Res* 1999; 44: 1-11.
21. McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 2001; 414: 129-131.
22. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
23. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakonluc I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Ginard BN, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
24. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
25. Randall TD, Weissman IL. Characterization of a Population of Cells in the Bone Marrow that phenotypically Mimics Hematopoietic Stem Cells: Resting Stem Cells or Mystery Population?. *Stem Cells* 1998; 16: 38-48.
26. Sasaki M, Honmou O, Akiyama Y, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia* 2001; 35: 26-34.
27. Steele JG, McFarland C, Dalton BA, Johnson G, Evans MD, Howlett CR, Underwood PA. Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment. *J Biomater Sci Polym Ed* 1993; 5: 245-257.
28. Steele JG, Dalton BA, Johnson G, Underwood PA. Polystyrene chemistry affects vitronectin activity: an explanation for cell attachment to tissue culture polystyrene but not to unmodified polystyrene. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 927-940.
29. Steele JG, Dalton BA, Johnson G, Underwood PA. Adsorption of fibronectin and vitronectin onto primary and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts. *Biomaterial* 1995; 16: 1057-1067.
30. Sussman Mark. Hearts and bones. *Nature* 2001; 410: 640-641.
31. Vogel G. Can stem cells suffice? *Science* 2001; 292: 1820-1822.

32. Vogel W, Grünebach F, Messam C, Kanz L, Brugger W, Bühring H. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *J Hematology/Haematologica* 2003; 88: 126-133.
33. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 364-370.
34. Zigova T, Sanberg PR. Neural stem cells for brain repair. *Sci & Med* 1999; 18-27.

Domicilio para correspondencia:

D. en C. Rebecca E. Franco-Bourland y Dr. Marco A. Guerrero-Godínez. Centro Nacional de Rehabilitación, Servicio de Bioquímica-Ortopedia, Torre de Investigación, 4to piso. Av. México-Xochimilco No. 289, Col. Arenal de Guadalupe, C.P. 14389, México, D.F., México.
Tel 59991000, ext. 19503, 19508
rfranco@cnr.gob.mx; cotojones@yahoo.com.mx

