

[dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.23](https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.23)

Comparación entre Células Troncales Mesenquimales obtenidas de Médula Ósea, Tejido Adiposo y Gelatina de Wharton en base a los Criterios de la ISCT

Comparison between Mesenchymal Stem Cells obtained from Bone Marrow, Adipose Tissue and Wharton Gelatin according to the ISCT Criteria

A. Parra-Barrera¹, X. Murúa-Beltran García², C.C. Calzada-Mendoza¹, J.R. Cáceres-Cortés¹,
E. Reyes-Maldonado³, G. Gutiérrez-Iglesias¹

¹Departamento de Posgrado. Escuela Superior de Medicina Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México.

²Departamento de QFBT. Universidad del Valle de México Campus Lomas Verdes. Estado de México.

³Departamento de Morfología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México.

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales (CTM) representan una población heterogénea con capacidad para auto-renovarse y diferenciarse a distintos tipos celulares. Estas fueron descritas en un inicio en médula ósea (MO) a mediados del siglo pasado, desde entonces este tejido se ha convertido en el estándar de oro para la obtención y caracterización de CTM. Actualmente se sabe que este tipo de células se encuentran alojadas en nichos distribuidos por todo el organismo, donde contribuyen a los procesos de regeneración del tejido donde se localizan. No obstante, encontrar una fuente alterna de CTM con las mismas características que las de MO, pero que su extracción no suponga riesgo para el donador es fundamental para su utilización con fines terapéuticos. En este trabajo se aislaron células troncales de médula ósea, y se compararon con tejido adiposo y gelatina de Wharton y caracterizaron de acuerdo a los criterios de la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT). Los resultados mostraron que la morfología, diferenciación osteogénica y adipogénica, así como la expresión de los antígenos de superficie CD90, CD73 y CD105 cumplen con los estándares, señalando a las provenientes de gelatina de Wharton como mejor opción.

PALABRAS CLAVE: Células troncales mesenquimales, médula ósea, tejido adiposo, gelatina de Wharton.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) represent a heterogeneous population with the capacity to self-renew and differentiate into different cell types. At the middle of the last century these cells initially were described in bone marrow (BM), thence this tissue has become the gold standard for obtaining and characterization of MSC. It is known that these cells are housed in specific areas called niches distributed throughout all body, where they contribute to tissue regeneration processes of self-tissue where they are located. However, finding an alternative source of CTM with the same characteristics that have showed in MO, but its obtention no represent a risk since the donor is essential to their use for therapeutic purposes. In this study we isolated mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly and they were compared in their characteristics in according to the standards of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). The results showed that the morphology as well as adipogenic and osteogenic differentiation and also the expression of surface antigens (CD90, CD73, and CD105) from all tissues accomplished the standards, although Wharton's jelly represented the best option.

KEYWORDS: Mesenchymal stem cell (MSC), bone marrow, adipose tissue Wharton's jelly.

Correspondencia

DESTINATARIO: Gisela Gutiérrez Iglesias
INSTITUCIÓN: Departamento de Posgrado, Escuela
Superior de Medicina Instituto Politécnico Nacional
DIRECCIÓN: Plan de San Luis y Díaz Mirón, Col. Casco
Santo Tomás, C.P. 11340, Ciudad de México, México
CORREO ELECTRÓNICO: iglesiasgg@yahoo.com

Fecha de recepción:

15 de octubre de 2016

Fecha de aceptación:

26 de diciembre de 2016

INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa (MR) tiene como objetivo sustituir o complementar los procesos de regeneración tisular mediante el uso de factores de crecimiento, biomateriales y células ^[1, 2, 3]. Por otro lado, las investigaciones realizadas por Fredeinstein y cols., mostraron la existencia de un tipo particular de células (células troncales mesenquimales, CTM) en médula ósea (MO), actualmente se sabe que éstas residen en diferentes tejidos y comparten características, como: capacidad de auto-renovación y de diferenciación ^[4-7]. Aunque es posible obtener CTM de tejidos embrionarios, cuestiones éticas y legales no permiten esta práctica. Aunque el principal sitio para la obtención de CTM es la médula ósea, otros tejidos como el adiposo y la gelatina de Wharton poseen una gran reserva de este tipo celular ^[8]. Independientemente de su origen mesodérmico, las CTM pueden adoptar un destino endodermal o ectodermal, lo que se conoce como: plasticidad celular, la cual se atribuye a la influencia que ejerce el microambiente donde residen, característica relevante para su uso en MR ^[9-15].

Para que las CTM puedan ser utilizadas en la clínica se debe; a) disponer de un gran número de ellas, b) ser aisladas con procedimientos mínimamente invasivos, c) tener capacidad de diferenciación, d) de ser posible trasplantarlas autóloga o alogénicamente, e) el aislamiento y cultivo deben estar basado en guías de buenas prácticas de manufactura, y cumplir con los postulados de la sociedad internacional para la terapia celular (ISCT) ^[6,17].

Es por ello que en este trabajo aislaron CTM de médula ósea (MO), tejido adiposo (TA) y gelatina de Wharton (GW) humanos y se caracterizaron en base a los criterios de la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT): morfología fibroblastoide y adherencia al recipiente de cultivo, diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica, y expresión de CD90, CD73 y CD105 ^[18].

METODOLOGÍA

Aislamiento: la medula ósea fue diluida con solución de buffer de fosfatos (PBS) y se realizó la separación por diferencia de gradiente de densidad con Ficoll™ Hypaque (SIGMA), las células se recuperaron y se cultivaron con medio MSCBMTM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium Ploetics™, Lonza) por 7 días y después fue reemplazado por D-MEM-F12 más 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico (anti-anti) (GIBCO). El tejido adiposo se incubó con colagenasa tipo 2/PBS ($1\text{mg}\cdot 15\text{mL}^{-1}$) a 37°C en agitación constante, se recuperó el botón celular y se cultivó con medio DMEM-F12 más SFB al 10% y 1% de anti-anti. Del cordón umbilical se disecaron los vasos y el tejido restante fue seccionado e incubado con colagenasa tipo 2 y tripsina al 0.1% en PBS a 37°C , finalmente el sobrenadante se cultivó como se menciona antes. Todos los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con humedad saturada y 5% de CO_2 .

Caracterización: a) morfología fibroblastoide y adherencia; los cultivos se mantuvieron en observación con un microscopio Inverso y se realizó el registro fotográfico. b) pruebas de plasticidad celular; para la diferenciación osteogénica las células se cultivaron con medio Stempro® Osteogenesis Differentiation por 21 días y se verifico su diferenciación con una tinción con rojo de Alizarina S (1,2-dihidroxiantraquinona, Merck), 2) para la diferenciación adipogénica, las células se cultivaron en medio Stempro® Adipogenesis Differentiation por 21 días y la diferenciación se corroboró por una tinción con rojo oleoso (Sigma-Aldrich).

Citometría de flujo: los cultivos en pase 3 se desprendieron con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM y fueron incubadas con los anticuerpos anti-human; CD105, CD73, CD90 (Biolegend), CD34 (Santa Cruz Biotechnology) y CD45 (ThermoScientific), se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) y se leyeron en un citómetro de flujo FACScalibur (BectonDickinson).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La medicina regenerativa tiene por objetivo el desarrollo de órganos o tejidos in vitro mediante el empleo de andamios en 3D, factores de crecimiento y células [19], por lo que, las expectativas sobre esta área para el tratamiento de diferentes enfermedades son elevadas. El descubrimiento de las CTM durante el siglo pasado impulsó enormemente el desarrollo de esta área [4,5,20].

En un inicio, las CTM fueron descritas en cultivos derivados de médula ósea, sin embargo, posteriormente se demostró su presencia en la mayoría de los tejidos adultos, embrionarios y extraembrionarios, y que además compartían características, esto sirvió como base para que en el 2006 la ISCT propusiera los criterios básicos que actualmente rigen la caracterización de todas las CTM [4,5,18,21-24].

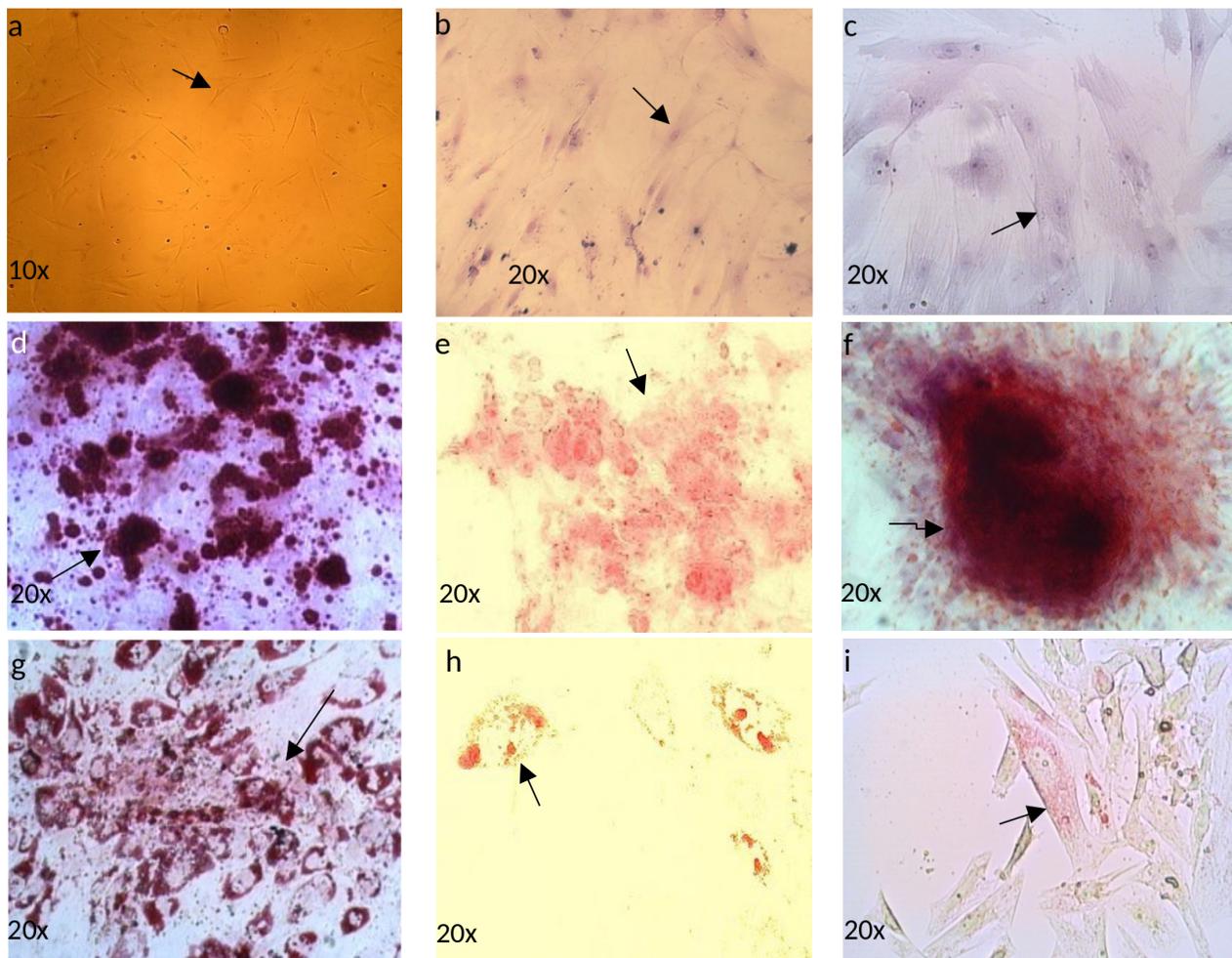


FIGURA 1: CTM de médula ósea. (a), tejido adiposo (b) y gelatina de Wharton (c) con morfología alargada (flecha) núcleo céntrico, semejante a fibroblastos, por la similitud con este tipo de células. (d, e, f), formación de depósitos extracelulares en CTM de médula ósea, tejido adiposo y gelatina de Wharton respectivamente, las cuales fueron cultivadas con medio osteogénico, donde se puede apreciar la positividad para el colorante rojo de Alizarina (flechas), donde la distribución fue mayor en las CTM de médula ósea. En g, h, i, se observan CTM de médula ósea, tejido adiposo y gelatina de Wharton respectivamente, en donde el medio adipogénico indujo la formación de vesículas lipídicas intracelulares positivas para la tinción con rojo oleoso (flechas). En este caso, se presenta una mayor formación de vesículas lipídicas en las células derivadas de médula ósea.

Aunque en un principio las CTM de MO han constituido el “estándar de oro”, el contar con ellas es limitado debido a que: a) la obtención es invasiva y dolorosa, b) no todas las muestras son adecuadas, c) la capacidad de diferenciación y proliferación es menor, si se comparan con otros tejidos menos desarrollados como la gelatina de Wharton, d) las probabilidades de que los pacientes afecten sus características, principalmente la de autorenovación y diferenciación y e) el tiempo necesario para disponer del número adecuado de células para trasplante autólogo es elevado (>2 meses). Por otro lado, independientemente de la fuente, todas las CTM deben ser cultivadas en base a las buenas prácticas de manufactura para asegurar un producto inocuo [21,25-37]. En el presente trabajo, se aislaron las CTM de MO, TA y GW y se caracterizaron de acuerdo a los criterios de la ISCT. Las células obtenidas de los tres tejidos adquirieron morfología alargada con citoplasma prominente y núcleo céntrico o fibroblastoide, ya que comparten similitud a los fibroblastos [27]. Por otro lado, la plasticidad celular es un elemento clave para el desarrollo de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos, por ello, se comprobó mediante la inducción osteogénica y adipogénica. Las células de los tres tejidos cultivadas con medio osteogénico mostraron positividad para la tinción con rojo de Alizarina (tinción específica para evidenciar acúmulos Ca^{++} y fosfatos extracelulares), de manera que se manifiestan como estructuras extracelulares que se observan al microscopio. En cuanto a la diferenciación osteogénica, las células presentaron vesículas lipídicas intracelulares en presencia de medio adipogénico durante 21 días; estas vesículas fueron evidentes cuando se tiñeron con rojo Oleoso, por lo tanto, ambos experimentos confirman la capacidad de las CTM para diferenciarse hacia otros tipos celulares, en este caso osteoblastos y adipocitos, respectivamente (Figura 1).

Lo anterior confirma que las CTM utilizadas se apegaron al segundo de los criterios de la ISCT [16,22,38-46]. El tercer criterio evaluado fue la expresión de CD90, CD73 y CD105. El análisis por citometría de flujo

mostró que las células derivadas de MO, TA y GW eran positivas para los antígenos CD73 y CD90 en similares proporciones, mientras que CD105 fue variable, con mayor expresión en las CTM-GW. Sin embargo, la expresión de los tres marcadores fue significativamente mayor en GW. Para el caso de CD34 y CD45, en CTM-TA y CTM-GW la presencia de estos marcadores fue menor al 20% o ausentes, aunque en las CTM de médula ósea, la expresión fue cercana al 0% (Figura 2);

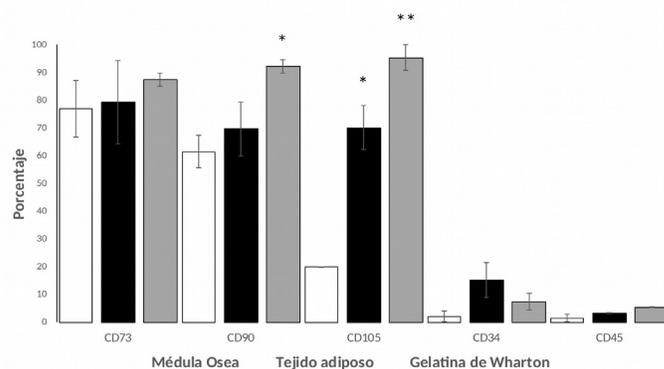


FIGURA 2: Expresión de antígenos CD73, CD90 y CD105 en las CTM de los diferentes tejidos evaluado mediante citometría de flujo. Donde las CTM de médula ósea presentaron el menor porcentaje y por otro lado, los valores de los antígenos hematopoyéticos CD34 y CD45 permanecieron bajos. n = 3. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía. *Diferencia significativa con respecto al control. **Diferencia significativa con respecto a todas las condiciones.

nosotros creemos que esta variación es originada desde el proceso de obtención celular, como se ha comentado en diferentes trabajos, donde los resultados varían de acuerdo al método de obtención [41,47,48]. Con los resultados anteriormente mencionados, se comprueba que existen fuentes alternativas a la MO, que se apegan a los criterios de la ISCT y que cuentan con potencial terapéutico donde la Medicina Regenerativa puede disponer de ellos para su aplicación en diferentes padecimientos. Sin embargo, se propone que las CTM-GW pueden ofrecer grandes ven-

tajas en comparación con las que provienen de médula ósea o tejido adiposo, ya que además de que su obtención no es riesgosa y el tejido es considerado de desecho, el estudio y aplicación de CTM-GW no ocasiona problemas éticos, médicos o legales [23,32,38,45,49,50].

CONCLUSIONES

Las poblaciones celulares obtenidas de las tres fuentes de CTM a través de los métodos convencionales en nuestro laboratorio, mostraron que sus características se apegan a los criterios establecidos por la ISCT [18], ya que cuentan con la morfología, adherencia, plasticidad y por último los marcadores de superficie. Aunque las

células de médula ósea se han reconocido como una alternativa terapéutica, las CTM derivadas de gelatina de Wharton representan una mejor opción, ya que éstas provienen de una fuente más accesible y pudieran ser de uso potencial en Medicina Regenerativa en base a los marcadores de superficie y a la plasticidad. Esto significa que, en un futuro no lejano se puedan estar utilizando para la ingeniería de tejidos en nuestro país, como lo hacen en las naciones de gran desarrollo.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece al M. en C. Héctor Díaz García, por su contribución a la elaboración del escrito.

REFERENCIAS

- [1] Atala A, Kurtis FK, and Mikos AG, "Engineering Complex Tissues", *Sci. Transl. Med.* vol. 4, no. 160, p. 160rv12, Nov. 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004890 2. DOI: [10.1126/scitranslmed.3004467](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004467)
- [2] Laurencin CT, and Khan Y, "Regenerative engineering" *Sci. Transl. Med.* vol. 4, p. 160ed9, 2012.
- [3] Qing W, Guang-Xing C, Lin G, and Liu Y, "The Osteogenic Study of Tissue Engineering Bone with BMP2 and BMP7 Gene-Modified Rat Adipose-Derived Stem Cell", *Jour of Biom. and Biot.* 2012. DOI: [10.1155/2012/410879](https://doi.org/10.1155/2012/410879)
- [4] Friedestein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, and Frolova GP, "Heterotopic Transplants of Bone Marrow", *Transplantation.* vol. 6, no. 2, pp. 230-247, 1968.
- [5] Fridenshtein AJ, Deriplazova YF, and Kulagina, "Cloning of precursor cells for fibroblasts in monolayer cell cultures", *Bull. Exp. Biol. Med.* vol. 76, no. 4, pp. 1212-1215, 1973. DOI: [10.1007/bf00803314](https://doi.org/10.1007/bf00803314)
- [6] Owen M, and Friedenstien AJ, "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors", *Ciba Foundation symposium.* vol. 136: pp. 42-60, 1988. DOI: [10.1002/9780470513637.ch4](https://doi.org/10.1002/9780470513637.ch4)
- [7] Verfaillie CM, Pera MF, and Lansdorp PM, "Stem cells: Hype and reality", *Hematology.* vol. 1, pp.369-391, 2002. DOI: [10.1182/asheducation-2002.1.369](https://doi.org/10.1182/asheducation-2002.1.369)
- [8] Meruane M, and Rojas M, "Células troncales mesenquimales de tejido adiposo", *INT J MORPHOL.* vol. 28, no. 3, pp. 879-889, 2010. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000300035>
- [9] Oh J, Lee YD, and Wagers AJ, "Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities", *Nat Med.* vol. 20: pp. 870-880. 2004. DOI: [10.1038/nm.3651](https://doi.org/10.1038/nm.3651).
- [10] Herzog EL, Chai L, and Krause DS, "Plasticity of marrow-derived stem cells", *Blood.* vol. 102: pp. 3483-3493, 2003. DOI: [10.1182/blood-2003-05-1664](https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1664)
- [11] Walker MR, Patel K, and Stappenbeck TS, "The stem cell niche", *J. Pathol.* vol. 217, no. 2, pp. 169- 180. Jan 2009. DOI: [10.1002/path.2474](https://doi.org/10.1002/path.2474)
- [12] Cáceres-Cortés JR, "The Stem Cell Niche as the Key to Early Cancer Development". *Cytol. Histol.* vol. 4, no. 4, 2013. DOI: [10.4172/2157-7099.1000188](https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000188)
- [13] Rossant J, "Stem Cells from the Mammalian Blastocyst", *Stem Cells* vol. 19, pp. 477-482, 2001. DOI: [10.1634/stemcells.19-6-477](https://doi.org/10.1634/stemcells.19-6-477)
- [14] Chaparro O, and Beltrán O, "Reprogramación nuclear y células pluripotentes inducidas", *Rev. Fac. Med.* vol. 17, no. 2, pp. 252-263, 2009.
- [15] Romeo F, Costanzo F, and Agostini M, "Embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells: two faces of the same coin?" *Aging.* vol. 4: no. 12, pp. 878-886, 2012. DOI: [10.18632/aging.100513](https://doi.org/10.18632/aging.100513)
- [16] Gimble JM, Katz AJ, and Bunnell BA, "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine" *Circ. Res.* May 11; vol. 100 no. 9, pp.1249-1260, may 11 2007. DOI: [10.1161/01.RES.0000265074.83288.09](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09)
- [17] Aktas M, Buchheiser A, Houben A, Reimann V, Radke T, Jeltsch K, et al, "Good manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood", *Cytotherapy.* vol. 12 no. 3, pp. 338-348, 2010. DOI: [10.3109/14653241003695034](https://doi.org/10.3109/14653241003695034)
- [18] Dominici M, Le-Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, et al, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement", *Cytotherapy.* vol. 8, no. 4, pp. 315-317, 2006. DOI: [10.1080/14653240600855905](https://doi.org/10.1080/14653240600855905)
- [19] Haseltine WA, "The Emergence of Regenerative Medicine: A New Field and a New Society" *The Journal of Regenerative Medicine.* vol. 2, pp. 17-23, 2001. DOI [10.1089/152489001753309652](https://doi.org/10.1089/152489001753309652)
- [20] Hernández P, and Dorticós E, "Medicina regenerativa Células madre embrionarias y adultas" *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* vol. 20, no. 3, 2004.
- [21] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al, "Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*" vol. 91, no. 8, pp. 1017-1026, 2006.
- [22] Baksh D, Yao R, and Tuan RS, "Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow" *Stem Cells.* vol. 25 no. 6, pp.1384-1392. Jun 2007. DOI: [10.1634/stem-cells.2006-0709](https://doi.org/10.1634/stem-cells.2006-0709)
- [23] Flores FE, Montesinos JJ, and Mayani H, "Células Troncales Mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica". *Rev. de inv. clín.* vol. 58, no. 5, pp. 498-511, Sep-oct 2006.
- [24] Castro ME, Montesinos JJ, "Células troncales mesenquimales: biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas", *Rev Med UV.* Ene-Jun 2015.
- [25] Brooke G, Rossetti T, Pelekanos R, Ilic N, Murray P, Hancock S, et al, "Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials", *BJH.* vol. 144: pp. 571-579, 2008. DOI: [10.1111/j.1365-2141.2008.07492.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07492.x)
- [26] Lee S, . Park BJ, Kim JY, Jekarl D, Choi HY, Lee SY, et al, "The effect of fibroblast growth factor on distinct differentiation potential of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem/stromal cells", *Cytotherapy.* vol. 17 no. 12, pp. 1723- 1731, dec 2015. DOI: [10.1016/j.jcyt.2015.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.09.007)
- [27] Conconi MT, Burra P, Di-Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al, "CD105+ cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenetic differentiative potential", *Int J Mol Med.* vol. 18, no. 6, pp. 1089- 1096, 2006. DOI: [10.3892/ijmm.18.6.1089](https://doi.org/10.3892/ijmm.18.6.1089)
- [28] Bieback K, and Brinkmann I, "Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy", *World J Stem Cells.* vol. 2 no. 4, pp. 81-92, aug 26 2000. DOI: [10.4252/wjsc.v2.i4.81](https://doi.org/10.4252/wjsc.v2.i4.81)
- [29] Can A, and Karahuseyinoglu S, "Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells", *Stem Cells.* vol. 25, pp. 2886-2895, 2007. DOI: [10.1634/stemcells.2007-0417](https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0417)
- [30] Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, et al, "Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue", *Stem Cells and Development.* vol. 17, pp. 761-774. 2008. DOI: [10.1089/scd.2007.0217](https://doi.org/10.1089/scd.2007.0217)

- [31] Lee HC, An SG, Lee HW, Park JS, Cha KS, Hong TJ, et al, "Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study", *Circ J*. vol. 76, no. 7, pp.1750- 1760, 2012. DOI: [10.1253/circj.CJ-11-1135](https://doi.org/10.1253/circj.CJ-11-1135)
- [32] Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, and Gambardella S, "Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art", *Int J Clin Exp Med*. vol. 3, no. 4, pp. 248-269, 2010.
- [33] Chen L, Tredget EE, Liu C, and Wu Y, "Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice", *PLoS One*. vol. 4, pp. e7119, 2009. DOI: [10.1371/journal.pone.0007119](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007119)
- [34] Minter D, Marra KG, and Rubin JP, "Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications", *Adv Biochem Eng Biotechnol*. vol. 129, pp. 59-71, 2013. DOI: [10.1007/10_2012_146](https://doi.org/10.1007/10_2012_146)
- [35] Sensebé L, Gadelorge M, and Fleury-Cappellesso S, "Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review", *Stem Cell Res Ther*. vol. 4, no. 3, pp. 66. Jun 7 2013. DOI: [10.1186/scrt217](https://doi.org/10.1186/scrt217)
- [36] Sensebé L, and Fleury-Cappellesso S, "Biodistribution of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in a Preclinical Setting", *Stem Cells International*. ID 678063. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/678063>
- [37] Verbeek R, "Generation of mesenchymal stem cells as a medicinal product in organ transplantation". *Curr Opin Organ Transplant*. vol. 18, no. 1, pp. 65-70. Feb 2013. DOI: [10.1097/MOT.0b013e32835c2998](https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32835c2998)
- [38] Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, and Hass R, "Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells", *J Cell Commun Signal*. vol. 8, no. 18, 2010. DOI: [10.1186/1478-811X-8-18](https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-18)
- [39] Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al, "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord", *Stem Cells*. vol. 22, no. 7, pp.1330-1337, 2004. DOI: [10.1634/stemcells.2004-0013](https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0013)
- [40] Dicker A, Le-Blanc K, Aström G, van-Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L, et al, "Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue", *Exp Cell Res*. vol. 308, no. 2, pp. 283-290, aug 15 2005. DOI: [10.1016/j.yexcr.2005.04.029](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.04.029)
- [41] Wagner W, Weina F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al, "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood", *Exp Hematol*. vol. 33, pp. 1402-1416, 2005. DOI: [10.1016/j.exphem.2005.07.003](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.07.003)
- [42] Schilling T, Nöth U, Klein-Hitpass L, Jakob F, and Schütze N, "Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells", *Mol Cell Endocrinol*. vol. 271, no. 1-2, pp. 1-17. Jun 15 2007. DOI: [10.1016/j.mce.2007.03.004](https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.03.004)
- [43] Ishige I, Nagamura-Inoue T., Honda MJ, Harnprasopwat R, Kido M, Sugimoto M, et al, "Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord", *Int J Hematol*. vol. 90, no. 2, pp. 261-269, sep 2009. DOI: [10.1007/s12185-009-0377-3](https://doi.org/10.1007/s12185-009-0377-3)
- [44] Secco M, Moreira YB, Zucconi E, Vieira NM, Jazedje T, Muotri AR, et al, "Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: cord is different from blood", *Stem Cell Rev*. vol. 5, no. 4, pp. 387-401. Dec 2009. DOI: [10.1007/s12015-009-9098-5](https://doi.org/10.1007/s12015-009-9098-5)
- [45] Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, and Khan WS, "Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature", *Open Orthop J*. vol. 5, pp. 253-60, 2011. DOI: [10.2174/1874325001105010253](https://doi.org/10.2174/1874325001105010253)
- [46] Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, and Bongso A, "Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly", *Reprod Biomed Online*. vol. 15, no. 6, pp. 708-718, Dec 2007. DOI: [10.1016/S1472-6483\(10\)60539-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60539-1)
- [47] Orbay H, Tobita M, and Mizuno H, "Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications", *Stem Cells Int*. vol. 2012, p. 461718, 2012. DOI: [10.1155/2012/461718](https://doi.org/10.1155/2012/461718)
- [48] Acevedo-Olvera LF, Diaz-Garcia H, Rodriguez-Cortes O, Campos-Rodriguez RR, Caceres-Cortes J, Araujo-Alvarez JM, et al, "Effect of dehydroepiandrosterone on expression of BMP2, SPARC and RUNX2 in human bone marrow mesenchymal stem cells", *Rev Mex Ing Qui*. vol. 15, no. 1, pp. 39-49. 2016. DOI: [10.1002/term.1612](https://doi.org/10.1002/term.1612)
- [49] Tsagias N, Koliakos I, Karagiannis V, Eleftheriadou M, and Koliakos GG, "Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes", *Transfus Med*. vol. 21, no. 4, pp. 253-261. aug 2011. DOI: [10.1111/j.1365-3148.2011.01076.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2011.01076.x)
- [50] Bongso A, Fong CY, and Gauthaman K, "Taking stem cells to the clinic: Major challenges", *J Cell Biochem*. vol 105, no. 6, pp. 1352-1360. Dec 15 2008. DOI: [10.1002/jcb.21957](https://doi.org/10.1002/jcb.21957)