



ugr

Universidad
de Granada

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA

PROGRAMA DE BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

MODELOS DE SARCOMAGÉNESIS BASADOS EN CÉLULAS MADRE

MESENQUIMALES: INFLUENCIA DE RB Y P53.

Memoria presentada por Ruth Rubio Amador para optar al grado de DOCTOR.

GRANADA, 2013



PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCIA
CENTRE FOR GENOMICS AND ONCOLOGICAL RESEARCH

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ruth María Rubio Amador
D.L.: GR 109-2014
ISBN: 978-84-9028-695-1

El doctorando Ruth Rubio Amador y los directores de la tesis Pablo Menéndez Bujan y René Rodríguez González Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 22 Abril de 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:



René Rodríguez González

Pablo Menéndez Buján

Ruth Rubio Amador

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Llegado este punto, es inevitable volver la vista atrás y hacer balance de lo que ha ocurrido en tu vida en los últimos años... Parece mentira que después de tanto tiempo trabajando en el mundo de la ciencia mi tesis doctoral se haya materializado finalmente. Desde que acabé mis estudios de biología y decidí dedicarme a esta vida, muchas han sido las dificultades que me he ido encontrando en el camino, que hicieron que el objetivo que tan claro tenía de “hacer una tesis” se convirtiera en prácticamente una “misión imposible”. Durante este periodo de 12 años he vencido la barrera del idioma, he aguantado cambios inesperados en la vida de los que te rodean que afectan profundamente a tu trayectoria laboral, he trabajado hasta el límite de mis fuerzas, he superado con éxito un linfoma y parece que finalmente he acabado la tesis. Por ello, me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que han pasado por mi vida (aunque sea por un periodo corto), me han ayudado a superar esas dificultades, y sobre todo me han animado a no abandonar nunca. Sin todos ellos, nunca hubiera llegado a ser la persona que soy hoy.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis Pablo Menéndez y René Rodríguez la oportunidad que me dieron de realizar la tesis en este laboratorio. Por enseñarme a investigar, por ayudarme a vencer mis miedos y comportarse realmente como amigos fuera del laboratorio cuando los he necesitado. De ellos no solo he aprendido una profesión, sino también valores académicos tan importantes como la capacidad de análisis, la autocrítica, la perseverancia y la humildad.

También me gustaría agradecer de forma muy especial la inestimable ayuda de Javi, mi jefe, mi psicólogo y mi amigo. Me devolvió el “gusanillo” por la ciencia, además de enseñarme mucho de mesenquimales; he tenido la suerte de haber compartido un tiempo estupendo contigo.

A la gran familia de Genyo, simplemente por eso, ¡por ser de verdad como mi familia!, por preocuparse en todo momento y tener palabras de aliento cuando eran necesarias. La tediosa vida en el laboratorio es mucho más llevadera rodeada de tan buena gente.

A todo mi grupo, no si se puede tener gente con más calidad humana: las Veros, mi guía espiritual y científica, Clara y Pedro, mis confidentes, mis niños Oscar y Damià, mi alegría del día a día, mi Rosi querida, mi compañera en la batalla, Mar, por su toque de humor diario y a Cristina, que tanto me ha ayudado en la última parte de la tesis, la más difícil, y que viene a tomar el relevo asturiano de René. Aquí además quiero incluir todos los miembros del antiguo Banco Andaluz de células madre, muy especialmente al grupo completo de Cholo, porque es mi grupo de adopción, son mis compañeros y mis amigos; particularmente a mi Angelina, porque “desde que estas en mi vida soy más feliz” *by IKEA*. Y por supuesto al grupo de Paco, ya que igualmente me han hecho sentir siempre una de ellos.

A todos mis amigos, realmente es difícil nombrarlos a todos porque tengo la suerte de tener tantos de tan buena calidad... Vladana y Marcella, Elena, Milan y Aitor, Criti y Carlos, Charli, Eli, Marie Laure y Fabian, al Cuass, a ese maravilloso *Polo Maldito* que tantas aventuras me ha dado, Javi, Cris y Rubén, y que espero que sea indestructible y le queden muchos *simposiums*..... y a tantos más..

A mis abuelos, que ha sido las personas que más me ha apoyado en todas mis decisiones y aventuras; de ellos tengo el carácter, el coraje y el empuje hacia adelante.

A mis padres por ser el pilar fundamental de todo lo que soy, de toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo a lo largo de toda mi vida y por su capacidad de adaptación a todos mis planes, por muy disparatados que fueran. Y por supuesto a mi hermaniti, porque sea como fuere y aunque estemos lejos, ella siempre ha estado en los momentos más difíciles dándome más alegrías que nadie.

A Barney, mi compañero en la vida, por su paciencia, su apoyo, por todo...

ÍNDICE

Índice

ABREVIATURAS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

Las Células Madre mesenquimales

I. Características de las células madre

II. Definición y descripción de Células Madre Mesenquimales

II.1 Definición

II.2 Revisión del término

III. Ontogenia de las MSCs

IV. Propiedades de las MSCs

IV.1 Capacidad de diferenciación a distintos linajes celulares

IV.1.1 Diferenciación osteogénica

IV.1.2 Diferenciación adipogénica

IV.1.3 Diferenciación condrogénica

IV.2 Carencia de inmunogenicidad

IV.3 Propiedades inmunomodulatorias

IV.4 Potencial de expansión in vitro

IV.5 Habilidad para migrar hacia sitios de daño tisular y tumores.

V. Aplicaciones clínicas

V.1 Tratamiento de la enfermedad injerto-contra-huésped (GVHD).

V.2 Rechazo de órganos.

V.3 Reparación tisular.

V.3.1 Reparación ósea

V.3.2 Reparación de cartílago

V.3.3 Reparación de tendón

V.3.4 Reparación muscular

V.3.5 Reparación de heridas crónicas

V.4 Tratamiento de enfermedades autoinmunes.

V.5 Liberación de drogas en terapias anti-cancer.

Cáncer

I. Introducción

I.1 Definición Inmortalización, transformación y metástasis

II. Modelos del cáncer

II.1 Modelo de Mutación o modelo de evolución clonal

II.2 Modelo de la célula de origen o modelo de célula madre tumoral

II.3 Célula madre tumoral (CSC)

II.3.1 Características

Modelo jerárquico

Modelo estocástico

II.3.2 Caracterización

II.3.2.1 Marcadores de CSCs

II.3.2.2 Ensayos con CSCs

II.3.3.3 Diferencias ente CSC y CIC

III. Oncogenes y antioncogenes

III.1 Proto-oncogen y Oncogen: mutación dominante

III.2 Genes supresores de tumores: mutación recesiva

III.3 p53

III.3.1 Características del gen

III.3.2 Función de p53

III.3.3 Mecanismo de regulación

III.3.4 Papel de p53 en cáncer

III.4 Rb

III.4.1 Características del gen

III.4.2 Función de Rb

III.4.3 Rb en cáncer

III.4.3.1 Iniciación del tumor

III.4.3.2 Progresión del tumor

III.5 p53 y Rb en sarcomas

III.5.1 Mutación de p53 en sarcomas

III.5.2 Mutación de Rb en sarcomas

IV. Sarcomas

IV.1 Tumores de tejidos blandos (STS)

IV.1.1 Tipos de tumor y localización

IV.1.2 Etiología

- IV.1.3 Alteraciones genéticas más frecuentes en STS.
- IV.2 Tumores de hueso primario
 - IV.2.1 Tipos de tumor y localización
 - IV.2.2 Etiología
 - IV.2.3 Alteraciones genéticas más frecuentes en tumores de hueso primario.
- IV.3 Clasificación de los sarcomas atendiendo a sus características genéticas
 - IV.3.1 Leiomyosarcoma
 - IV.3.1.1 Incidencia
 - IV.3.1.2 Aspectos clínicos
 - IV.3.1.2.1 Diagnóstico
 - IV.3.1.2.2 Histopatología
 - IV.3.1.3 Alteraciones genéticas más frecuentes
 - IV.3.1.3.1 Alteraciones citogenéticas
 - IV.3.1.3.2 Alteraciones moleculares
 - IV.3.2 Osteosarcoma
 - IV.3.2.1 Incidencia
 - IV.3.2.2 Aspectos clínicos
 - IV.3.2.2.1 Diagnóstico
 - IV.3.2.2.2 Histopatología
 - IV.3.2.2.3 Cirugía
 - IV.3.2.3 Alteraciones genéticas más frecuentes
- IV.4 Tratamiento

MATERIAL Y METODOS

- I. Establecimiento de los cultivos primarios
 - I.1 Cepas murinas
 - I.2 Extracción de las células madre mesenquimales del ratón.
 - I.2.1 Extracción de células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs)
 - I.2.2 Extracción de células madre mesenquimales de tejido adiposo (ASCs)
 - I.3 Escisión de las regiones flanqueadas por secuencias lox-P mediante la enzima Cre-recombinasa
 - I.3.1 Producción de Adenovirus
 - I.3.2 Infección de los cultivos con Adenovirus AdCre
 - I.4 Cultivo y mantenimiento de las células.
- II. Caracterización de los cultivos MSCs
 - II.1 Morfología
 - II.2 Análisis de ADN
 - II.2.1 Extracción de ADN genómico

II.2.2 PCR genómica

II.3 Análisis de ARN

II.3.1 Extracción de ARN

II.3.2 Retrotranscripción

II.3.3 PCR a tiempo real

II.4 Análisis de proteínas

II.4.1 Extracción de Proteínas

II.4.2 Electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa: Western blot

II.4.3 Detección y revelado

II.5 Inmunofenotipado de las MSCs y separación celular por citometría de flujo

II.6 Ensayos funcionales de MSCs: Diferenciación

II.6.1 Diferenciación adipogénica

II.6.2 Diferenciación osteogénica

III. Homeostasis de los cultivos de células madre mesenquimales (MSCs)

III.1 Curva de crecimiento a largo plazo

III.2 Análisis de cariotipo de bandas G

III.3 Análisis del ciclo celular

III.4 Incorporación de bromo-desoxiuridina

IV. Ensayos tumorigénicos con MSCs

IV.1 Ensayos in vitro: Crecimiento celular independiente de anclaje

IV.2 Ensayos in vivo: Inoculación en ratones inmunodeficientes

IV.2.1 Inoculación subcutánea (s.c.)

IV.2.2 Inoculación intratibia (i.b.)

VI.2.3 Inoculación perióstea (p.)

VI.2.4 Implantes de cerámica: preparación e implantación

IV.2.5 Establecimiento de líneas celulares tumorales

V. Análisis histo-patológico

V.1 Inclusión en parafina

V.2 Microdissección

V.3 Desparafinado y rehidratación de las muestras

V.4 Tinciones

V.4.1 Hematoxilina-eosina

V.4.2 Tricómico de Masson

V.5 Desenmascaramiento antigénico

V.6 Inmunotinción

VI. Tomografía micro-computerizada (μ CT)

VI. Análisis de microarrays: Perfil de Expresión Genica (GEP)

Modelos de Sarcomagénesis basados en MSCs

Artículo de revisión: “ Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells”. Cell Research, 2011

RESULTADOS

I. Primer artículo: “Deficiency in p53 but not Retinoblastoma induces the transformation of mesenchymal stem cells *in vitro* and indicate leyomyosarcoma *in vivo*”. Cancer Research, 2010

II. Segundo artículo: “The differentiation stage of p53-Rb-decient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development”. Oncogene, 2012

III. Tercer artículo: “Bone microenvironment signals are essecial for osteosarcoma development from p53-and Rb-defficient mesenchymal stem cells”. En revision en Stem Cells

DISCUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

Abreviaturas

Nombre en español, "english name"

aa	Aminoácidos
Ad-Cre	Adenovirus portando la cre-recombinasa
7-AAD	7-Amino-Actinomicina D
Alp	Fosfatasa alcalina, del inglés "Alkaline phosphatase"
APC/C	Complejo promotor de anafase
Aprox.	Aproximadamente
ARN	Ácido ribonucleico
ASCs	Células madre mesenquimales de tejido Adiposo
BASSP	Biobanco Andaluz del Sistema de Salud Público
BM-MSCs	Células madre mesenquimales de médula ósea
BMP	Proteína morfogénica ósea
bp	pares de bases, del inglés "base pairs"
BPMR-1A	Receptor de BMP tipo 1A
BPMR-1B	Receptor de BMP tipo 1B
BrdU	BromodesoxiUridina
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Albúmina de suero bovino, del inglés "bovine serum albumin"
Bsp	Sialoproteína de hueso, del inglés "bone sialoprotein"
cDNA	ADN complementario
CDK	Kinasa dependiente de ciclinas, del inglés "cyclin-dependent kinase"
CFUs	Unidades formadoras de colonias, del inglés "colony formation units"
CGH	Hibridación genómica comparativa, del inglés "comparative genomic hybridization"
CIC	Célula iniciadora del tumor, del inglés "cancer initiating cell"
Coll I	Colágeno tipo-I

CMV	Ciclotomegalovirus
CSC	Célula madre tumoral, del inglés "cancer stem cell"
CT	Ciclo umbral de cada muestra
CTLs	Linfocitos T citotóxicos, del inglés "cytotoxic T lymphocytes"
DAB	Diaminobencidina tetrahidrocloruro
DC	Células dendríticas
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dkk-1	Proteína Dickkopf-1
DMEM	Medio esencial modificado por Dulbecco
DNMT1	Metiltransferasa de ADN 1
dNTPs	Deoxiribonucleótidos
dUTPs	Deoxiuridina
DP-MSCs	Células estromales de la pulpa dental
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico, del inglés "Epidermal growth factor"
ESc	Células madre embrionarias
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico, del inglés "Fibroblastic growth factor"
FITC	Isocianato de fluoresceína
Fw	"Forward"
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación, del inglés "Growth and differentiation factor"
GFP	Proteína de fluorescencia verde, del inglés "Green fluorescence protein"
GMP	Manual de buena práctica, del inglés "Good manufacturing practice"

GVHD	Enfermedad injerto contra huésped, del inglés “Graft versus host disease”
GVL	Injerto contra leucemia
h	Hora
HA/TPC	Hidroxiapatita/fosfato tricálcico
HATs	
HDAC	Histona desacetilasa
HIF1 α	Factor inducido por hipoxia 1 α
HLA-G	Antígeno G leucocítico de histocompatibilidad
HP1A	Proteína de heterocromatina 1 ^a
HPV	Virus del papiloma humano, del inglés “Human papiloma virus”
HSCs	Células madre hematopoyéticas
hTERT	Telomerasa humana
HU	Hidroxiurea
IDO	indoleamina 2,3-dioxigenase
IL-1 β	interleuquina-1 β
IL-2	interleuquina-2
IL-12	interleuquina-12
INF- α	Interferon- α
INF- β	Interferon- β
INF- γ	Interferon- γ
IP	Ioduro de propidio
IVD	Disco intervertebral
Kb	Kilo-base
KDa	Kilo-Dalton
LEF	Factor de aumento de unión linfoide, del inglés “Lymphoid enhancer binding factor”
LSCs	Células madre leucémicas, del inglés “Leukimia stem cells”

mA	Mili-amperio
mASCs	Células madre mesenquimales murinas de tejido adiposo
MAPK	Kinasa activada por mitógeno, del inglés "Mitogen-Activated protein kinase"
mBM-MSCs	Células madre mesenquimales murinas de médula ósea
μCT	Tomografía micro-computerizada, del inglés "Micro Computered Tomography"
MCGS	suplementos de crecimiento de células mesenquimales, del inglés "mesenchymal cell growth supplement"
min	Minuto
MLS	Liposarcoma mixoide, del inglés "Myxoid liposarcoma"
mMSCs	Células madre mesenquimales murinas
MOI	Multiplicidad de infección, del inglés "Multiplicity of Infection"
mRNA	ARN mensajero
miRNAs	micro-ARNs, del inglés "micro-RNAs"
MSCs	Células madre mesenquimales
NF1	Neurofibromina 1
NK	Células naturales asesinas, del inglés "Natural killers"
NO	Óxido nítrico
NOD/SCID IL2Rγ ^{-/-} tmWjl/sj	Ratón inmunodeficiente NOD/SCID Cg-Prkdcscid IL2Rg
P/S	Penicilina / Estreptomocina
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés "Phosphate buffer saline"
PB-MSCs	Células Madre Mesenquimales derivadas de sangre periférica, del inglés "Peripheral blood-derived MSCs"
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés "polymerase chain reaction"
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario, del inglés "platelet-derived growth factor"
PE	Ficoeritrina
PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinasa, polipéptido alfa, catalítico

PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PGE ₂	Prostagalndina E ₂
PS	Fosfatidil-serina
Rb	Gen de Retinoblastoma
RT	Temperatura ambiente, del inglés "room trmperature"
Rev	Reverso
s.c.	Subcutaneo
seg	Segundo (unidad de tiempo)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDF-1 α	Factor 1 α derivado de células estromales, del inglés "stromal cell-derived factor 1 α "
SFB	Suero fetal bovino
SKP2	Kinasa 2 asociada a fase S
Ser	Serina
SMA	Actina de músculo liso, del inglés "Smooth muscle actin"
STS	Sarcomas de tejidos blandos, del inglés "Soft tissue sarcomas"
T ^a	Temperatura
TCF1	Factor de células T 1, del inglés "T-cell factor 1"
TH	Linfocitos T colaboradores, del inglés "Helper T-cells"
TNFs	Factor de necrosis tumoral, del inglés "Tumor necrosis factors"
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral, del inglés "TNF-related apoptosis-inducing ligand"
TGF- β	Factor de crecimiento transformante, del inglés "Transforming growth factor- β "
V	Voltio
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular A, del inglés "Vascular endotelial growth factor A"
WHO	Organización mundial de la salud, del inglés "World Health Organization"

Wt

Silvestre o sano, del inglés "wild type"

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y Objetivos

La aparición de cáncer se debe, a grandes rasgos, a la pérdida de control de la proliferación que produce un crecimiento descontrolado, junto con el bloqueo de la capacidad de diferenciación de la célula que sufren las mutaciones transformantes. En esta enfermedad tan heterogénea existen multitud de factores que influyen en la generación y el fenotipo del tumor. Entre los más importantes se hallan:

- el tejido de origen de célula en la que se origina
- el estado ontogénico de la célula en la que se origina: célula madre, células progenitoras o células diferenciadas
- el microambiente donde se desarrolla tumor

Dado que existen múltiples evidencias de que las MSCs podrían ser la célula de origen de muchos tipos de sarcomas, y que los reguladores del ciclo celular, que controlan la tanto la proliferación celular como el buen estado del genoma, están frecuentemente mutados en sarcomas, decidimos estudiar la influencia de la desregulación de genes cruciales en el control del ciclo celular en la transformación de las MSCs. El uso de este modelo inducido por la mutación de genes concretos en un contexto controlado nos permitirá estudiar los distintos factores que pueden afectar a la sarcomagénesis.

Los objetivos concretos del trabajo han sido los siguientes:

1.- Generación y caracterización de MSCs murinas de grasa y de médula ósea deficientes en p53, Rb o la combinación de ambos a partir de ratones que portan las secuencias de estos genes flanqueadas por secuencias lox-P.

2.- Determinación de la influencia de los reguladores del ciclo celular, p53 y Rb, en la transformación tumoral de las MSCs y de los diferentes factores que influyen en la sarcomagénesis:

2.1 Influencia del tejido de origen de la MSCs (tejido adiposo *versus* médula ósea) en el tipo de sarcoma generado.

2.2 Influencia del estadio de diferenciación de la célula que recibe las mutaciones transformantes (MSCs indiferenciada *versus* MSCs diferenciadas hacia linaje osteogénico) en el fenotipo tumoral.

2.3 Influencia del microambiente donde se encuentra la célula que ha recibido las mutaciones transformantes en la sarcomagénesis. Estudio del microambiente óseo mediante:

2.3.1 Estudio de la sarcomagénesis inducida por inoculación subcutánea *versus* inoculación en ambiente óseo.

2.3.2 Estudio del efecto de factores osteogénicos relevantes, BMP-2 y sustratos calcificados

3.- Estudio de los perfiles de expresión génica de los distintos modelos de sarcomas generados a partir de MSCs murinas deficientes en p53 y/o Rb.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las Células Madre mesenquimales

I. Características de las células madre

Las células madre se definen como aquellas células capaces de dividirse indefinidamente y a partir de las cuales se diferencian los distintos tipos celulares del organismo.

Independientemente del origen ontogénico y tisular, todas las Células Madre tienen dos características muy especiales: capacidad de autorenovación y potencial de diferenciación.

Figura 1

- Capacidad de autorenovación: las células madre son capaces de dividirse, mediante divisiones mitóticas, para generar una célula idéntica a sí misma, sin perder todas sus propiedades. Mediante este proceso se permite mantener el clon de células madre indiferenciado durante largos periodos de tiempo, actuando como reservorio, ante distintas necesidades fisiológicas u homeostáticas, de las células del tejido al que pertenecen.
- Potencial de diferenciación: capacidad de diferenciarse a otras células, siguiendo tras la división la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, producir células de uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciadas, en función de su grado de potencialidad. Esta potencialidad varía, existen células madre totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes, es decir, hay desde células capaces de diferenciarse a todos o muchos linajes celulares, hasta precursores directos de células somáticas del tejido en que se encuentran.

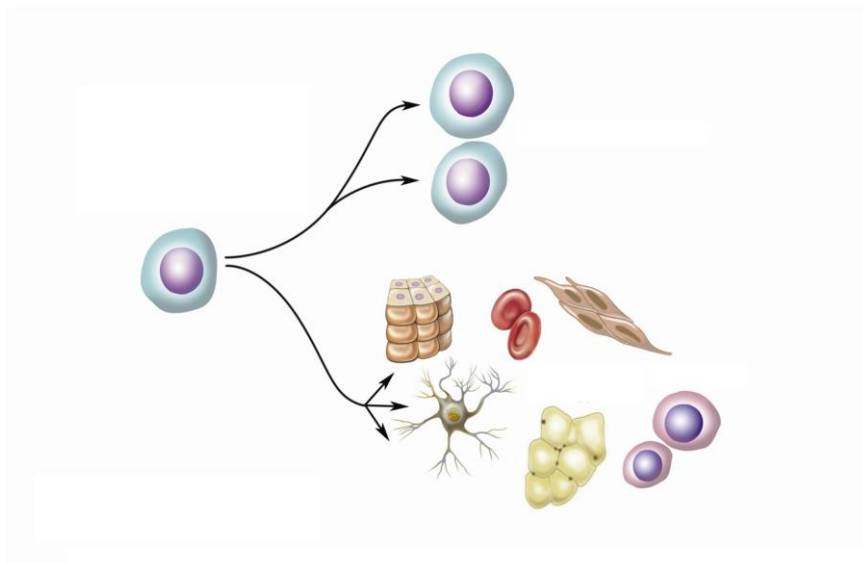


Figura 1. Características fundamentales de las células madre

II. Definición y descripción de Células Madre Mesenquimales

II.1 Definición

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotentes adultas que constituyen un grupo muy heterogéneo fuente de progenitores para los distintos tipos de tejidos mesodérmicos. El sistema estromal fue descrito por primera vez por Friedenstein basándose en la observación de que en la médula ósea existían células con capacidad de autorrenovación que además eran capaces de diferenciarse hacia varios linajes de tejido mesodérmicos, incluyendo el linaje osteogénico (Friedenstein, 1980; Friedenstein et al., 1966). Posteriormente, Owen y otros autores plantearon modelos similares basados en la similitud del sistema estromal con el sistema hematopoyético (Dexter, 1982; Owen, 1985; Owen, 1988; Pittenger et al., 1999).

A pesar del enorme esfuerzo que se ha hecho en el estudio de estas células, hasta la fecha no se conoce claramente el origen en el desarrollo ni la ubicación exacta en el cuerpo humano de las poblaciones más indiferenciadas de estas MSCs. Tampoco se ha conseguido encontrar un marcador único o específico que defina esta población de células. Por ello, dar una definición clara de las MSCs es difícil. En 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) definió 3 criterios mínimos que debían cumplir los cultivos primarios *in vitro* de MSCs (Dominici et al., 2006):

1.- El primero es que deben ser adherentes a plástico, y tener la capacidad de crecer sobre esta superficie en el medio de cultivo apropiado.

2.- Al no existir un marcador único para definir estas células, se propuso una combinación de marcadores de superficie, positivos para marcadores mesodérmicos y negativos para marcadores hematopoyéticos y endoteliales, concretamente: CD90⁺ (antígeno de diferenciación de los timocitos-1), CD73⁺ (ecto-5'-nucleotidasa), CD105⁺ (endoglin), CD44⁺ (receptor de hialuronato), CD14⁻ y CD11b⁻ (ambos marcadores expresados en monocitos y macrófagos), CD45⁻ (marcador pan-leucocítico), CD34⁻ (marcador de progenitor hematopoyético y endotelial primitivo) y CD31⁻ (marcador epitelial). También se han propuesto una serie de marcadores para identificar progenitores mesenquimales *in vivo* que parecen desaparecer en cultivo. Así, las MSCs son capaces de expresar SSEA-1, SSEA-4 (Stagg, 2008), marcador que hasta ahora se pensaba restringido para células madre embrionarias (ESc), STRO-1, marcador que se expresa en el desarrollo temprano de dichas células, declinando su expresión con la diferenciación, CD271, marcador neuronal (Jones et al., 2002), CD49a (Deschaseaux et al., 2003), CD146 (Corselli et al., 2013) o el ganglioxido neural GD2 (Martinez et al., 2007). Recientemente se ha publicado que células de la médula ósea que poseen el marcador Nestina *in vivo*, tienen características de MSCs y están en contacto directo con las células madre hematopoyéticas (HSCs); MSCs-Nes⁺ son las unidades formadoras de colonias fibroásticas, además de poder propagarse como mesenesferas no adherentes capaces de autorenovarse y de ser trasplantadas serialmente (Mendez-Ferrer et al., 2010). Además expresan bajos niveles del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I (Stagg, 2008) y de clase II (García-Castro et al., 2008; Pittenger et al., 1999).

Las MSCs murinas (mMSCs) se pueden caracterizar con un panel de marcadores de superficie similar al usado para la caracterización de las hMSCs: CD29⁺, Sca-1⁺, CD44⁺, CD14⁻, CD45⁻, CD11b⁻ y CD34⁻ (Nadri et al., 2007; Rodriguez et al., 2009; Sun et al., 2003).

3.- Por último, la propiedad biológica que mejor identifica las MSCs es su capacidad de diferenciación a células de tres linajes mesodérmicos: adipocitos, osteoblastos y condroblastos, bajo condiciones específicas de cultivo *in vitro* que inducen en cada caso la diferenciación adecuada (Castro-Malaspina et al., 1980). La capacidad de diferenciación de las MSCs también se ha ensayado *in vivo*, usando un modelo de rata donde células derivadas de CFU-F eran implantadas en los animales usando cámaras de difusión de células (Friedenstein et al., 1987).

A pesar de que en la última década se ha avanzado mucho en el conocimiento de las MSCs, todavía quedan muchas preguntas abiertas sobre la naturaleza e identidad de MSCs incluyendo su origen, localización y potencialidad (Bianco et al., 2008).

II.2 Revisión del término

Las MSCs se definieron originalmente como células derivadas únicamente de tejido mesenquimal que funcionalmente eran capaces de generar una progenie de células mesodérmicas diferenciadas, además de tener capacidad de autorrenovación (Friedenstein et al., 1970; Huang et al., 2011).

Actualmente, la falta de entendimiento de la biología básica de MSCs se refleja en los diferentes sistemas de cultivo establecidos y variada nomenclatura que existen. Las primeras MSCs identificadas procedían de médula ósea y fueron denominadas por diferentes autores “células madre osteogénicas”, “células mesenquimales estromales” o “células madre mesenquimales”. Este subconjunto de células de la médula ósea se distinguían de las células hematopoyéticas (HSCs) por su rápida adherencia a superficie de cultivo y por la apariencia fibroblástica de su progenie en los cultivos *in vitro*. Ya en los años 70 se estableció la hipótesis de que en el interior de la médula ósea existía una población de células madre no hematopoyéticas que constituía un estroma de soporte de la hematopoyesis al igual que contribuía a la regulación de la misma mediante una compleja red de señalización paracrina (Bianco et al., 2008; Orkin and Zon, 2008). Además de las células de médula ósea, otras células con propiedades mesenquimales han sido descritas en una amplia variedad de tejidos durante el desarrollo, aisladas tanto de tejidos embrionarios como adultos (no solo mesodérmicos), como por ejemplo del tejido adiposo, cordón umbilical, músculo, placenta, sangre periférica, pulpa dental, folículo piloso, cartílago articular, dermis, pulmón e hígado, entre otros (da Silva Meirelles et al., 2008; Kern et al., 2006). Todas estas células englobadas dentro del término “mesenquimales” tienen las mismas características *in vitro*, sin embargo, algunos estudios muestran que las MSCs derivadas de estos tejidos difieren en el potencial de diferenciación *in vivo* en comparación con las MSC de médula ósea (BM-MSCs) (Bianco et al., 2008).

En cuestiones semánticas, el término “células mesenquimales estromales” no es apropiado ya que hace alusión exclusivamente a células de tejido conectivo, como soporte, en lugar de referirse a la funcionalidad de las células. Por otra parte, el término “células madre mesenquimales” tampoco es adecuado, ya que existen células de tejidos no mesenquimales que muestran propiedades comparables a las ya citadas. Ninguno de

los términos parece suficientemente descriptivo y completo para abarcar todos los tipos de células que exhiben las características mencionadas anteriormente. Siguiendo las directrices de la ISCT, el término apropiado para estos precursores debería ser “Células Mesenquimales Estromales Multipotentes”, mientras que el término “células madre mesenquimales” debería ser usado únicamente para subpoblaciones que cumplen estrictamente con los criterios de células madre. Sin embargo, el acrónimo, MSCs, ha ganado tal popularidad y uso que sigue siendo el vocablo más utilizado como término general, por lo que podría ser mantenido.

Mientras se desarrollan métodos más apropiados para la derivación y caracterización de cultivos de MSCs, el consenso que prevalece es que en poblaciones mesenquimales no fraccionadas conviven subpoblaciones de células con diferente estadio de desarrollo mesodérmico y con distinta potencialidad de diferenciación, abarcando desde células madre multilinaje hasta unilinaje e incluso células completamente diferenciadas. Actualmente se considera que MSCs de diferentes tejidos de origen tienen características biológicas similares, aunque es probable que se empiecen a reportar diferencias en un futuro próximo. De hecho la ISCT ha propuesto nombres alternativos para los cultivos de MSCs derivados de otros tejidos distintos de médula ósea como el término Células madre/estromales adiposas (ASCs) para las MSCs derivadas de tejido adiposo.

III. Ontogenia de las MSCs

Mucho se ha especulado sobre el origen de las MSCs, sin embargo, ni el origen en el desarrollo ni la ubicación exacta en el cuerpo humano de las poblaciones más indiferenciadas de estas células madre mesenquimales se conoce aún claramente.

Hallazgos recientes demostraron que existen células derivadas de las crestas neurales en la médula ósea adulta, y que las BM-MSCs pueden ser diferenciadas a células neurales (Nagoshi et al., 2008). Posteriormente mediante un ensayo *in vivo* se demostró que la cresta neural era uno de los orígenes en el desarrollo de las BM-MSCs, ya que la primera ola de MSCs en el tronco embrionario se generaba a partir del neuroepitelio Sox⁺, y células derivadas de la cresta neural poseían características similares a MSCs de otros tejidos de origen (Morikawa et al., 2009; Takashima et al., 2007).

Probablemente la hipótesis más interesante y aceptada hasta el momento sea que las MSCs tienen su origen en los pericitos. Estas células son capaces de diferenciarse a los tres linajes mesodérmicos descritos, expresan marcadores mesenquimales de superficie, son capaces de migrar en respuesta a digestión de la matriz extracelular y otros estímulos quimiotácticos (Crisan et al., 2008), por tanto los precursores mesenquimales de cada tejido podrían tener un origen perivascular. Según esta teoría, las MSCs estabilizarían los vasos sanguíneos y contribuirían a la homeostasis de los tejidos y del sistema inmune, bajo condiciones fisiológicas, además de adoptar un papel más activo en la reparación de localizada de tejidos dañados (da Silva Meirelles et al., 2008).

Otro origen de las MSCs es el proceso que ocurre naturalmente durante el desarrollo, la transición epitelio-mesenquima, donde las células epiteliales pierden su polaridad, reorganizan su citoesqueleto y adquieren características morfológicas y funcionales parecidas a las de las MSCs: comienzan a expresar marcadores de superficie de MSCs y son

capaces de diferenciarse a los 3 linajes estándar mesodérmicos (Battula et al., 2010; Rubio et al., 2008).

Por tanto, el origen y la ontogenia de las MSCs es bastante complejo y aún conlleva una gran controversia. Parece que el origen perivascular de los precursores MSCs es la hipótesis más apoyada por los estudios realizados hasta ahora, sin embargo, los pericitos no serían la única fuente de MSCs, sino que también podrían derivar de células de otros tejidos.

IV. Propiedades de las MSCs

Las MSCs constituyen una gran promesa en el campo de la medicina regenerativa y la terapia celular. El enorme potencial clínico de estas células se basa en las propiedades tan especiales que poseen.

IV.1 Capacidad de diferenciación a distintos linajes celulares

Como se ha mencionado anteriormente, las MSCs exhiben alto grado de plasticidad; está sólidamente establecido que estas células tienen un potencial de diferenciación a linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico. Asimismo, se ha reportado que pueden diferenciarse a otros tejidos mesodérmicos como músculo esquelético, miocardio o tejido endotelial, y también a tejidos no mesodérmicos como hígado, páncreas y cerebro (Dezawa et al., 2004; Luk et al., 2005; Pittenger et al., 1999), aunque la diferenciación a linajes no mesodérmico no está apoyada en experimentos tan sólidos y sigue siendo enormemente contradictoria. Figura 2

La capacidad de diferenciación multilínea *in vitro* es una de las propiedades fundamentales de las MSCs, sin embargo, solo una subpoblación mantiene esa multipotencialidad cuando están en cultivo. La identificación de rutas de señalización y principales genes reguladores que dirigen la diferenciación mesenquimal hacia determinados linajes es necesaria para su eficiente aplicación clínica.

IV.1.1 Diferenciación osteogénica

La señalización de la diferenciación osteogénica no se conoce completamente, pero se sabe que las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) tienen un papel fundamental en su regulación. Así mismo, TGF- β y Wnt poseen una importante función moduladora en el proceso. Estas rutas convergen en la regulación del gen Runx2, que controla la diferenciación osteogénica de los precursores mesenquimales (Kolf et al., 2007).

Los BMPs promueven la diferenciación osteogénica de las MSCs durante el desarrollo, son esenciales para la maduración terminal de los osteocitos (matriz extracelular con depósitos minerales). La transducción de señales de BMP está mediada tanto por la vía canónica, dependiente de Smad, como por la vía no canónica, independiente de Smad. En concreto, BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7 participan muy activamente en osteogénesis (Abe et al., 2000; Friedman et al., 2006; Jeon et al., 2006). BMP-2 es un agente osteoinductivo presente en la matriz extracelular del hueso, con probada actividad sobre las MSCs, que induce la acetilación de Runx2 mediada por p300, lo que aumenta la capacidad transactivadora de Runx2. La desacetilación de Runx2 es específica de las

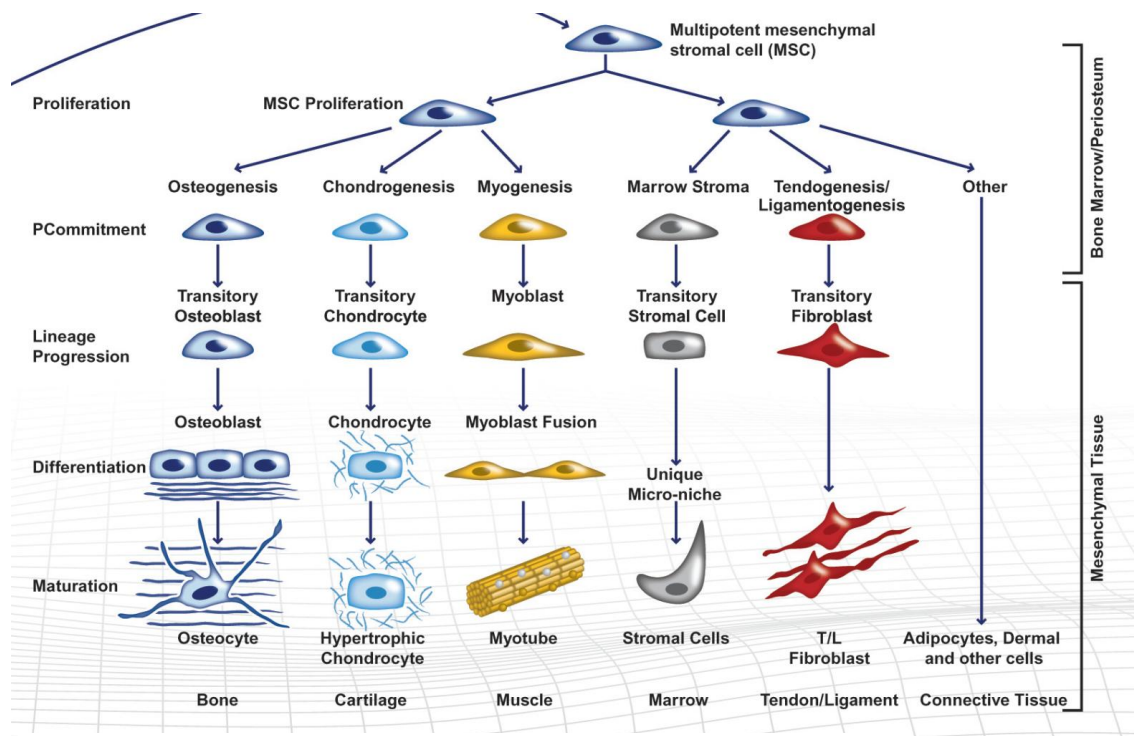


Figura 2. Diferenciación de MSCs a distintos linajes celulares

Histonas desacetilasas 4 y 5, promoviendo su degradación mediante Smurf1, Smurf2 y la ubiquitin ligasa E3 (Chen et al., 2012; Jeon et al., 2006; Luu et al., 2007). BMP-2 se expresa en la mayoría de las células relacionadas con la placa de crecimiento ósea y su inhibición previene la diferenciación osteogénica *in vivo* e *in vitro*. Igualmente, la pérdida de BMP-2 en los primordios de los tejidos mesenquimales lleva a la mala reparación de fracturas postnatales, y cuando se inactivan simultáneamente BMP-2 y BMP-4 resulta en la deficiencia de osteogénesis.

TGF- β participa en la regulación osteoblástica de una manera dual, por un lado estimula el desarrollo y la proliferación de osteoblastos tempranos, pero inhibe su maduración terminal. Wnt, en progenitores osteoides murinos parece tener una regulación positiva sobre Runx2 a través de la vía canónica de Wnt: el complejo β -catenin/LEF/TCF1 podría regular directamente la expresión de Runx2 (Gaur et al., 2005). Sin embargo, en hMSCs la vía canónica de Wnt regula negativamente la osteogénesis (Boland et al., 2004). La convergencia en Runx2 indica que debe haber una comunicación cruzada entre las distintas vías de señalización. También se ha propuesto la importancia del gen *tbx5*, un gen T-box que, gracias al reclutamiento de HATs y TAZ, media la apertura de la cromatina, incrementando su propia actividad transcripcional sobre FGF10, otro gen osteogénico, lo que debe ocurrir durante la osteogénesis de MSCs (Abe et al., 2000; Murakami et al., 2005).

IV.1.2 Diferenciación adipogénica

La diferenciación adipogénica está controlada también por TGF- β y BMP. Del conjunto de señales extra- e intra-celulares dependerá la diferenciación de las MSCs a osteoblastos o adipocitos. TGF- β inhibe la diferenciación adipocítica mediante la inactivación del factor de transcripción C/EBP por la interacción directa con Smad3 y de manera desconocida con

Smad6 y Smad7 (Choy and Derynck, 2003). Por el contrario, BMP-2 y BMP-4 estimulan el compromiso de las MSCs a linaje adipogénico y la diferenciación terminal de los adipocitos dependiente de Smad y mediante mecanismos dependientes de la MAP-quinasa (MAPK) p38 (Sottile and Seuwen, 2000; Tang et al., 2004).

Estas rutas convergen en la regulación del receptor de peroxisoma γ y activado por proliferación (PPAR γ), factor de transcripción crítico que potencia la adipogénesis mientras reprime la osteogénesis. A él se unen diferentes ligandos, como ácidos grasos de cadena larga y compuestos tiazolidinedione, entre otros, que regulan positiva o negativamente PPAR γ , bloqueando la diferenciación osteogénica en favor de la adipogénica o viceversa (Nuttall and Gimble, 2004).

IV.1.2 Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica de las MSCs *in vitro* imita el desarrollo del cartílago *in vivo* (Baksh et al., 2004; Song et al., 2004). Las vías de señalización específicas que inducen los genes de condrogénesis son desconocidas en su mayoría. Las principales moléculas inductivas identificadas incluyen TGF- β (TGF- β -1) (Massague et al., 2000), BMP (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-12, BMP-13), GDF (GDF-5) (Chen et al., 2004b) y determinados ligandos de Wnt (Wnt3a, Wnt7a) (Hartmann, 2006). La transducción de estas señales se internalizan a través de proteínas intracelulares Smad y cascadas de MAPK que acaban transactivando específicamente genes condrogénicos como resultado de la combinatoria y la comunicación cruzada entre las distintas vías.

IV.2 Carencia de inmunogenicidad

Una de las propiedades más interesantes de las MSCs es que son capaces de escapar al reconocimiento del sistema inmune de un organismo (Ringden et al., 2006). La baja inmunogenicidad de estas células hace que puedan ser usadas tanto en trasplantes autólogos como para terapias celulares alogénicas. Esta falta de inmunogenicidad se debe a varios motivos:

- 1.- En estado indiferenciado las MSCs no expresan en su superficie el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I (Stagg, 2008) ni clase II (García-Castro et al., 2008; Pittenger et al., 1999) y moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 o CD40 (Tse et al., 2003).
- 2.- Las MSCs son capaces de eliminar ligandos de CD3, CD28 y otras moléculas coestimuladoras, haciendo que se inhiba la activación de los linfocitos T y llevando a que se produzca la ignorancia inmunológica (Shi et al., 2011).

IV.3 Propiedades inmunomoduladoras

Las MSCs poseen una gran capacidad inmunosupresiva: inhiben la respuesta inmune generada en un organismo por otro evento, tanto *in vitro* como *in vivo*. Pueden inhibir la proliferación y función de la mayoría de las poblaciones de células del sistema inmune incluyendo las células T, células B, células NK y células presentadoras de antígeno. También modulan la actividad de las células dendríticas (DC) e inducen a los linfocitos T reguladores (Shi et al., 2011). Esta propiedad única convierte a las MSCs en un candidato ideal para su aplicación en clínica como inmunosupresores. El efecto inmunomodulador de

las MSCs está mediado por una acción anti-proliferativa no específica, que depende del contacto célula-célula o de la secreción de factores solubles tipo: indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), factor de crecimiento hepatocítico, prostaglandina E₂ (PGE₂), óxido nítrico (NO), antígeno G leucocítico de histocompatibilidad (HLA-G), factor de crecimiento transformante 1 (FGF-β-1), interferon-γ (INFγ) e interleucina-1β (IL-1β) (Shi et al., 2011; Stagg, 2007; Stagg, 2008).

Estas MSCs a su vez están influenciadas por otras células inmunocompetentes a través de la expresión de numerosos receptores de quimoquinas, como CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 y CXCR6; de citoquinas, como IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, INFγ (Stagg et al., 2006) y TNFα; así como de TLR-2 y otros receptores tipo-toll (Abarbanell et al., 2010). La respuesta de las MSCs a la señalización a través de estos receptores no solo afecta a su supervivencia, proliferación y capacidad de diferenciación, sino que también influye en el perfil de expresión de factores solubles que secretan estas células y que puede afectar finalmente al sistema inmune (principalmente en el microambiente).

IV.4 Potencial de expansión *in vitro*

La expansión de las MSCs *in vitro* es un pre-requisito para el uso de las terapias basadas en células, así como para la experimentación, ya que se requiere un alto número de células. Las células madre mesenquimales pueden ser extensivamente expandidas *in vitro*, aunque existen algunos problemas:

- Su frecuencia *in vivo* es intrínsecamente baja y además, las células madre adultas ciclan muy poco *in vivo*. Consecuentemente, la expansión *in vitro* de estas células madre debería ser contraria a su comportamiento natural esperado, y más aún la expansión de las mismas mientras mantienen su estadio de indiferenciación, es difícil. Por otro lado, las MSCs tienen diferentes puntos de control que regulan su periodo de vida en cultivo, resultando en una capacidad de crecimiento limitada *in vitro*.
- A medida que se incrementa el número de pases, la probabilidad de acumular eventos transformantes o aberraciones cromosómicas aumenta considerablemente; por ello es recomendable, transcurridos largos periodos de cultivo (por encima de 50 pases), verificar que todavía conservan un cariotipo normal. En el caso de MSCs murinas, la inestabilidad cromosómica y acumulación de mutaciones es mucho más frecuente, por ello es recomendable trabajar con células de pases comprendidos entre su derivación y pase 15.

A pesar de estos contratiempos, las hMSCs tienen una capacidad de expansión suficientemente buena como para poder ser usadas tanto en experimentación como en tratamientos. La producción de MSCs para intervenciones clínicas se debe dar bajo condiciones muy controladas (GMP), donde todos los pasos del proceso estén perfectamente definidos y exista una trazabilidad adecuada.

IV.5 Habilidad para migrar hacia sitios de daño tisular y tumores.

Muchas de las aplicaciones terapéuticas para las que se está pensando utilizar las MSCs se basan en su capacidad de migrar e injertar en zonas de inflamación o en tejidos dañados. Mediante un modelo de síndrome de fallo multiorgánico en primates, se demostró que

MSCs marcadas con la proteína verde (GFP) inyectadas por vía sistémica, eran capaces de llegar hacia los órganos dañados, tras la irradiación de los animales (Chapel et al., 2003). Sin embargo, los mecanismos de migración de estas MSCs no están completamente caracterizados, en parte debido a que en cultivos *ex vivo* estas células a menudo pierden la expresión de muchas moléculas de superficie, incluyendo los receptores de quimoquinas y moléculas de respuesta a quimoquinas.

En condiciones de daño o inflamación crónica los tejidos liberan señales endocrinas y paracrinas que promueven la movilización y el reclutamiento de MSCs hacia la zona afectada. La forma en que las MSCs trasvasan el endotelio vascular y la membrana basal se asemeja a la quimiotaxis de los leucocitos, compartiendo muchas de las quimoquinas y receptores de moléculas de adhesión. En el desarrollo de tumores sólidos, las células tumorales son capaces de infiltrar y destruir el tejido normal, creándose un microambiente con gran cantidad de células inflamatorias. Este microambiente tumoral promueve la atracción de MSCs por la liberación de señales vía varios factores solubles, secretados tanto por las células inflamatorias como por las tumorales. Estos factores incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor 1α derivado de células estromales (SDF- 1α), IL-8, IL-6, factor de estimulación de colonias granulocíticas (GM-CSF), proteína de quimioatracción de monocito 1 (MPC-1), factor de crecimiento hemaropoyético (HGF), factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), activador plasminogenico tipo urokinasa (uPA), entre otros (Honczarenko et al., 2006). Las MSCs de bajo pase también expresan receptores de quimoquinas CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1 y c-met, que además de permitir la inmunomodulación de estas MSCs, podrían ser los responsables del proceso de movilización hacia la zona dañada o hacia el tumor (Feng and Chen, 2009; Stagg, 2008). En este sentido se ha descrito que las MSCs migran en respuesta a CXCL12, CXCL13, CXCL16, CCL19, CCL5 y CCL25 (Honczarenko et al., 2006).

Durante la migración de MSCs hacia el tumor la ruta de administración, la naturaleza del tumor, la localización del tumor primario y el tipo de MSCs inyectadas parecen ser determinantes en la movilización. Diferentes estudios *in vivo* sugieren que las MSCs son capaces de migrar a distintos tipos de tumores, tanto primarios como metastáticos, incluyendo carcinomas de mama, de ovario y de colon, gliomas, melanomas y sarcoma de Kaposi (Honczarenko et al., 2006; Hung et al., 2005; Khakoo et al., 2006; Komarova et al., 2006; Nakamizo et al., 2005; Nakamura et al., 2004; Studeny et al., 2004). Este proceso de migración no es completamente específico, ya que en la mayoría de los casos las MSCs se distribuyen también a órganos y tejidos no afectados por la enfermedad como pulmones, riñones, hígado y bazo. Hasta la fecha, no hay un ensayo para determinar la eficiencia de migración de las MSCs hacia el tumor o los posibles efectos colaterales en los órganos no afectados (Feng and Chen, 2009).

V. Aplicaciones clínicas

El reconocimiento del potencial terapéutico de las MSCs es uno de los avances más fascinantes en terapia celular. Basándose en las propiedades anteriormente mencionadas, las MSCs están siendo explotadas en todo el mundo en un amplio rango de potenciales aplicaciones clínicas. De hecho, estas células actualmente están siendo usadas en más de 200 ensayos clínicos como agentes terapéuticos, que incluyen estrategias de

reemplazamiento celular, prevención y tratamiento de enfermedad injerto-contrahuésped (GVHD) resistente a las terapias convencionales, prevención y tratamiento del rechazo de órganos sólidos trasplantados, reparación tisular, tratamiento de enfermedades inflamatorias, neurológicas y autoinmunes, así como la utilización de estas células como vectores para liberar drogas en terapias anti-cáncer. Además, debido a su baja inmunogenicidad, las MSCs pueden ser usadas para facilitar las terapias de reemplazamiento celular alogénicas, independiente del grado de compatibilidad HLA entre donador y paciente receptor (Wang et al., 2012).

V.1 Tratamiento de la enfermedad injerto-contrahuésped (GVHD).

Debido a la mencionada capacidad inmunomoduladora de las MSCs, se ha propuesto el cotrasplante de estas células como tratamiento para la GVHD. Esta enfermedad, causada porque los linfocitos T del donador reconocen antígenos del paciente, es una de las mayores complicaciones de los trasplantes de células madre hematopoyéticas en el tratamiento de enfermedades hematológicas. En casos de pacientes con GVHD refractarios para los tratamientos habituales, se desarrollaron diferentes ensayos clínicos en los que se les trasplantaron MSCs de varios tejidos de origen. En un alto porcentaje de estos pacientes con GVHD severa (grado III-IV) la enfermedad desapareció completamente y se mantuvieron libres de enfermedad residual mínima de la leucemia que padecían (Le Blanc et al., 2004). Además del efecto inmunosupresivo, el co-trasplante de MSCs junto con las HSCs aumenta el injerto hematopoyético, hace que la recuperación hematopoyética sea más rápida y se reduce el riesgo de sufrir GVHD (Battiwalla and Hematti, 2009). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que, a pesar de que el co-trasplante con MSCs producía una prevención eficiente de GVHD, también se relacionaba con una alta recaída de pacientes con leucemia, lo que puede ser un resultado de un efecto inmunosupresivo no específico de las MSCs que afectaría al efecto del injerto contra la leucemia (GVL) (Ning et al., 2008; Vianello and Dazzi, 2008).

V.2 Rechazo de órganos.

La capacidad inmunomoduladora de las MSCs también ha servido de base para explorar el uso de estas células para prevenir el rechazo de los trasplantes de órganos sólidos, siendo cotrasplantadas con isletas pancreáticas, riñón, corazón e hígado. En la actualidad existen ensayos clínicos en los cuales MSCs del propio paciente son infundidas previamente al trasplante de hígado, riñón u otros órganos, siendo los resultados preliminares bastante prometedores (<http://clinicaltrials.gov/>).

V.3 Reparación tisular.

Existen muchos estudios que muestran como células MSCs poseen una capacidad intrínseca para migrar hacia los sitios de daño y participar activamente en la reparación de los tejidos dañados. Se ha reportado, que esta reparación puede venir dada por la diferenciación de MSCs en las células del tejido, por fusión celular o mediante la secreción de citoquinas y factores de crecimiento (Spees et al., 2003). El potencial clínico de las MSCs en la reparación de tejidos incluye: hueso, cartílago y tendón, tejido hepático, pulmonar, cardíaco y dermis, así como daños en el sistema nervioso central o la médula espinal (Krampera et al., 2006). Los miembros de la familia TGF- β , como TGF- β 1/2/3, activins y BMPs, así como la señalización de Wnt, juegan un papel muy importante en la reparación tisular mediada por MSCs (Massague et al., 2000; Mishra et al., 2005). Además mediante

técnicas de ingeniería tisular se pueden producir estructuras con una morfología definida a partir de la combinación de MSCs con un biomaterial y factores bioactivos adecuados.

V.3.1 Reparación ósea

Una de las principales aplicaciones clínicas de las MSCs consiste en la reparación de hueso. Esta potencialidad se ha demostrado en modelos *in vivo* de ratón, rata y cánidos, con defectos cráneo-faciales y en los huesos largos (Bruder et al., 1998a; Bruder et al., 1998b; Kadiyala et al., 1997; Krebsbach et al., 1998).

Mediante la aplicación de MSCs se ha mejorado la aparición de hueso, pero para garantizar la formación de hueso maduro, se ha sugerido que es necesario el uso de biomateriales, como por ejemplo el uso de matrices de Hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TPC), estructuras donde las células se adhieren lentamente, mostrando resultados satisfactorios especialmente cuando la administración de las células se realiza *in situ* (Kon et al., 2000; Krebsbach et al., 1997; Marcacci et al., 2007). También se ha demostrado que la exposición de MSCs a determinados factores de crecimiento o proteínas morfógenas como bFGF y BMP-2, aumentan de forma sinérgica la formación de hueso *in vivo* (Kuznetsov et al., 1997).

El trasplante de MSCs autólogas combinadas con cerámicas están dando buen resultado, se ha confirmado la seguridad del producto y demostrado la integración de esas estructuras en el hueso. Actualmente existen ensayos clínicos donde se está intentando recuperar fracturas de huesos largos con dificultades para unirse de nuevo, así como tratar la osteogénesis infantil imperfecta o la osteonecrosis (Gangji and Hauzeur, 2010; Horwitz et al., 1999; Quarto et al., 2001).

V.3.2 Reparación de cartílago

Se ha reportado la formación de cartílago a partir de precursores mesenquimales ensayos de diferenciación *in vitro* y de implantación de células *in vivo* (Fortier et al., 1998; Shakibaei, 1998). Para ello se usan nuevas estructuras basadas en micropartículas de ácido poliláctico o análogos sintéticos de agreganos, que poseen mayor fuerza de compresión de la matriz extracelular y menor degradación de ácido hialurónico y colágeno (Bernhard and Panitch, 2012; Salerno et al., 2012). Otra aproximación es el uso de matrices biosintéticas que promueven la regeneración tisular, acompañado de la incorporación de agreganos sintéticos y de una distribución alineada de fibras de colágeno. Existe una sinergia entre las moléculas de la matriz y la organización espacial de la mismas (Bernhard and Panitch, 2012; Sharma et al., 2012).

El procedimiento de reparación cartilaginosa que se ha estado utilizando hasta ahora es el implante autólogo de cartílago. Sin embargo, el trasplante autólogo de BM-MSc es mucho menos invasivo y no daña ningún cartílago sano y, combinado con matrices de colágeno-tipo-I o alginato se aumenta la diferenciación condrogénica de las células (Kurth et al., 2007).

V.3.3 Reparación de tendón

En lesiones de tendón, la reparación puede fallar hasta en un 40% de los casos. La inyección de MSCs autólogas tras la operación incrementa considerablemente la

recuperación del mismo. Para mejorar la regeneración de la interfase entre hueso y tendón, se propone la combinación de factores de crecimiento, terapia génica y una estructura de soporte adecuada. A este respecto se han usado matrices tridimensionales con colágeno y de polímeros tipo poliacrílico (PAC), poliestireno (PEs) y polietilenglicol (PEG), siendo el PEG el que genera mayor diferenciación condrogénica (Guo et al., 2008; MacLean et al., 2012)

V.3.4 Reparación muscular

Otra aplicación muy interesante es la reparación de tejidos musculares, tanto esquelético como cardíaco (Fuster and Sanz, 2007; Mazhari and Hare, 2007), aunque se ha investigado mucho más en enfermedades cardíacas. Lo más estudiado hasta ahora es la inoculación de BM-MSCs a través de la arteria coronaria en infartos agudos de miocardio, tras la operación (Menasche, 2011). Los resultados obtenidos hasta ahora no son muy alentadores, la mejora de la función cardíaca es muy moderada y la diferenciación de MSCs a cardiomiocitos no es completa, sin embargo el trasplante de MSCs si debería tener un efecto positivo, al menos, por el reclutamiento de progenitores endoteliales que ayudan a la neo-microvascularización, y el efecto paracrino sobre los cardiomiocitos supervivientes del paciente.

V.3.5 Reparación de heridas crónicas

Existe un gran interés tanto científico como clínico por estudiar el potencial de las MSCs para estimular la reparación de heridas crónicas. En ellas, el orden en la progresión de los eventos biológicos y moleculares necesarios para la recuperación está alterado. La capacidad de las MSCs para migrar a zonas dañadas e inflamadas para estimular la proliferación y diferenciación de los progenitores residentes, su capacidad inmunomoduladora y anti-inflamatoria, pueden claramente ayudar a la cicatrización. De hecho, recientes publicaciones muestran como el tratamiento con BM-MSCs acelera la cinética de curación de la herida, aumentando la epitelización y angiogénesis (Wu et al., 2007), sugiriendo que las MSCs aumentan la reparación mediante, al menos, dos mecanismos: diferenciación e interacción paracrina. Esta aplicación ha mostrado excelentes resultados en quemaduras y fístulas perianales, aunque también se han propuesto numerosos ensayos para enfermedades digestivas (Rodriguez et al., 2012).

V.4 Tratamiento de enfermedades autoinmunes.

El efecto de las MSCs en los procesos autoinmunes ha sido estudiado en modelos animales pre-clínicos, que han reportado efectos beneficiosos, aunque no curativos. En la actualidad se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos basándose en la capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora de estas células. Se han usado MSCs de diferentes tejidos de origen para tratar enfermedades del sistema nervioso, como la esclerosis múltiple; problemas ortopédicos, como la artritis reumatoide; enfermedades pulmonares, como el asma; enfermedades crónicas, como la pancreatitis crónica o enfermedad de Crohn (<http://clinicaltrials.gov/>).

V.5 Liberación de drogas en terapias anti-cancer.

La capacidad de las MSCs para migrar hacia sitios de crecimiento tumoral ha sido usada en terapias anti-cáncer para liberar drogas antitumorales de forma más localizada. Por

ejemplo, se han utilizado MSCs como vehículo para liberar eficientemente virus oncolíticos en sitios tumorales y metastáticos en modelos xenógrafos de cáncer de mama (Stoff-Khalili et al., 2007), ovario (Komarova et al., 2006), glioma (Sonabend et al., 2008; Yong et al., 2009) y en pacientes infantiles de neuroblastoma refractarios para las terapias convencionales (Garcia-Castro et al., 2010).

Además, se ha mostrado que MSCs que sobre-expresan diferentes citoquinas (INF- α , INF- β , INF- γ , IL-2, IL-12), quimoquinas (CX₃CL-1) y factores de crecimiento (NK4), retrasan o paran el crecimiento tumoral en diferentes modelos de tumores y metástasis (Loebinger and Janes, 2010). Igualmente, la sobre-expresión del ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral (TRAIL) en MSCs inhibe el crecimiento de distintos tipos de tumores mediante la inducción selectiva de apoptosis de las células tumorales, a través de la Caspasa 8.

Por último, las MSCs también pueden producir enzimas modificadoras que convierten una pre-droga, suministrada al paciente en una forma inocua, en la droga antitumoral correspondiente de forma localizada. Un ejemplo claro de esta aplicación es la Timidin-quinasa del virus del herpes, capaz de transformar la pre-droga administrada sistemáticamente, Ganciclovir, en su forma tóxica. Esta estrategia parece haber dado muy buen resultado tanto en gliomas como en cáncer pancreático. Otra enzima usada es la citosina-desaminasa, que transforma la 5-fluorocitosina, inocuo, en 5-fluorouracilo, tóxico, en el tumor (Cavarretta et al., 2010; Kucerova et al., 2007).

Cáncer

I. Introducción

Cáncer es un término que se usa para denominar no una enfermedad única, sino un heterogéneo conjunto de complejas enfermedades, donde una determinada célula comienza a dividirse sin control, formando un tumor (leucémico o sólido), que puede llegar a invadir otros tejidos (Dick, 2008).

Dentro de un mismo tipo de cáncer, diferentes pacientes muestran una enorme heterogeneidad (intertumoral) en cuanto a morfología, marcadores, lesiones genéticas, cinética de proliferación celular y respuesta a la terapia, lo que lleva a clasificarlos en subtipos. Incluso dentro de un mismo tumor, iniciado por la expansión clonal de una única célula tumoral, podemos encontrar heterogeneidad (intratumoral). Distintas poblaciones adquieren variaciones genéticas y epigenéticas que llevan a que diferentes zonas del tumor muestren distintos fenotipos (Ma et al., 2003; Weigelt et al., 2003).

Cuestiones claves a resolver en la biología del cáncer son las bases moleculares y celulares de la heterogeneidad intratumoral, si los diferentes subtipos de cáncer tienen distintas células de origen, y por extensión, que perfil de mutaciones genéticas contribuye al fenotipo del tumor (Clevers, 2011; Dick, 2008; Visvader, 2011).

1.1 Definición Inmortalización, transformación y metástasis

Conceptos como inmortalización, transformación tumoral y metástasis son fundamentales en el estudio del cáncer.

1.1.1 Inmortalización: proceso en el que existe una alteración del material genético celular que lleva a la ganancia de inmunidad ante las limitaciones normales del crecimiento o del tiempo de vida de una célula, la célula escapa a un número finito de ciclos de divisiones. Células inmortalizadas crecen *in vitro* indefinidamente e *in vivo* producen los llamados “tumores benignos”.

1.1.2 Transformación neoplásica: proceso en el que la alteración genética que sufre la célula lleva a la modificación del patrón normal de crecimiento (aumentando su potencial de proliferativo), la alteración de su perfil de expresión en superficie, su morfología, metabolismo y adquiere otros atributos que le confieren capacidad para invadir, vascularizar y metastatizar. Células transformadas crecen *in vitro* indefinidamente, cambiando mucho su morfología y tamaño, e *in vivo* producen los llamados “tumores malignos”.

1.1.3 Metástasis: tumor secundario producido a partir de la liberación de una célula del tumor original que viaja por el cuerpo, a través del torrente sanguíneo o linfático, para depositarse en otro lugar del cuerpo donde genera el nuevo tumor.

II. Modelos del cáncer

El cáncer lleva intrínsecamente asociada la heterogeneidad a distintos niveles, interenfermedad, intertumoral e intratumoral. Las bases moleculares y celulares de esta

heterogeneidad son una de las cuestiones claves a resolver en la biología del cáncer. Esto podría explicarse por las diferencias genéticas y microambientales entre las poblaciones celulares, así como por el grado de diferenciación de las células individuales (Heppner, 1984).

Hasta hace unos años los tumores se han tratado como entidades genéticamente homogéneas. De hecho, casi todas las terapias utilizadas en clínica actualmente están enfocadas a tratar el tumor como un todo, formado por células con las mismas características, usando drogas que matan células con una alta tasa de división, citoestáticos, que dañan también tejidos sanos con alta tasa de renovación. Por ello, habría que desarrollar terapias más eficientes que puedan evitar las recaídas observadas después de los tratamientos con quimioterapia convencional que acaban con la mayoría de la masa tumoral, pero no afectan a las células quiescentes del mismo.

Se han propuesto dos modelos que intentan explicar la génesis y el desarrollo del cáncer: el modelo de evolución clonal o de mutación y el modelo de la célula madre tumoral o célula de origen.

II.1 Modelo de Mutación o modelo de evolución clonal

Este concepto fue formulado por primera vez por Nowell en 1976. Proponía que las neoplasias surgían a partir de una única célula y la progresión del tumor resultaba de la adquisición de variabilidad genética dentro del clon original de células, permitiendo la selección secuencial de los clones más agresivos de todos los generados (Nowell, 1976). Diferentes mutaciones, genéticas o epigenéticas, ocurren dentro de una misma célula diana, resultando que esa combinación específica de mutaciones confiere al clon una ventaja proliferativa que hace que se seleccione y determine los diferentes fenotipos tumorales. Existe una selección de la célula con la combinación de mutaciones más apropiada y favorecedora para proliferar sin límite en el ambiente en que se encuentre (Vermeulen et al., 2008; Visvader, 2011). Figura 3 (A)

II.2 Modelo de la célula de origen o modelo de célula madre tumoral

En este modelo, las diferentes mutaciones se van acumulando sucesivamente durante el proceso de diferenciación de la célula, por tanto los diferentes subtipos tumorales derivan de distintas células dentro del tejido, que sirven como células de origen. Dependiendo del estadio de diferenciación que tenga la célula que sufre la mutación transformante final, ocurrirá la aparición de un tipo de tumor u otro. En otras palabras, diferentes poblaciones celulares dentro de la jerarquía de los linajes celulares sirven como célula de origen para diferentes subtipos de cáncer. Figura 3 (B)

Actualmente está bien establecido que el cáncer es una enfermedad esencialmente genética. La acumulación secuencial de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, que llevan a la aparición de un clon maligno, es un paradigma ampliamente usado en la investigación oncológica (Vermeulen et al., 2008). De la misma forma, está también aceptado que todas las células de un tumor no son iguales en su potencial de proliferación y capacidad tumorogénica. Por tanto, estos dos modelos no son mutuamente excluyentes, podrían actuar conjuntamente para determinar la histopatología y el comportamiento del tumor. Además otros mecanismos extrínsecos también deben estar

involucrados en la generación de la heterogeneidad del tumor: la interacción entre las células del tumor y el microambiente estromal que le rodea es crucial para determinar el fenotipo y crecimiento maligno del tumor.

Tanto el modelo de evolución clonal como el de la célula madre tumoral han sido muy considerados a la hora de explicar la heterogeneidad y comportamiento del tumor. Por ello, vamos a discutir más ampliamente sobre algunos aspectos de estos modelos.

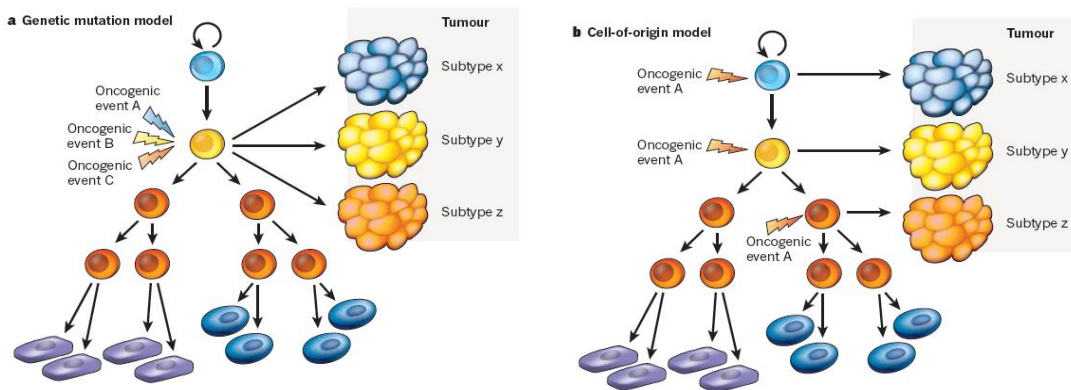


Figura 3. Modelos de cáncer

II.3 Célula madre tumoral (CSC)

No todas las células dentro de un mismo tumor son iguales. La célula madre tumoral (CSC) es un concepto creado a partir de la observación del parecido existente entre una célula madre y determinadas poblaciones de células tumorales, que son esenciales para el inicio y crecimiento del tumor (Pierce and Speers, 1988). Las propiedades que hemos descrito anteriormente que hacen a las células madre únicas, se ven reflejadas en la CSC: capacidad de autorrenovación, habilidad para generar todo el repertorio de células del tumor (tumorogénicas y no-tumorogénicas) y el potencial para proliferar que dirige la expansión de la población de células malignas. Además, parecen tener marcadores específicos, ser más resistentes a agentes químicos y electromagnéticos, pueden permanecer quiescentes durante largos periodos y pueden colonizar otras partes del cuerpo. Figura 4

II.3.1 Características

Hasta ahora se ha considerado que el subconjunto de CSC es una población relativamente escasa difícil de caracterizar dentro del tumor (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Se sabe que son células con capacidad de **autorrenovación** que están diseñadas para proliferar indefinidamente. Sin embargo, pueden permanecer largos periodos en **quiescencia**, característica propia de CSC que podría explicar la resistencia de estas células a quimioterapia, así como las recurrencias locales y metástasis tras largos periodos libre de enfermedad. La existencia de CSCs quiescentes en tumores no se ha explorado directamente. Mediante los ensayos xenógrafos que se realizan actualmente, se podría restringir la detección de CSC únicamente a las células más proliferativas. Existen otros ensayos indirectos que muestran la quiescencia de CSCs en leucemias y con estudios de su perfil genético comparativo, pero para demostrar definitivamente la existencia de células

quiescentes en tumores primarios sólidos habría que modificar el ensayo, trasplantando una única CSC en estado quiescente (Pece et al., 2010). Figura 4 A

Además de la quiescencia, existen otros mecanismos que hacen a las CSCs resistentes a quimioterapia, como la expresión de bombas de drogas ABC y de proteínas tanto antiapoptóticas como de resistencia a daño en ADN (Zhou et al., 2009). Existen algunos estudios que han observado el potencial metastático de la CSC (Hermann et al., 2007).

Es evidente que los tratamientos existentes hasta ahora para eliminar el cáncer fallan en la erradicación de esta CSC, lo que permite el recrecimiento del tumor. Con quimioterapia se puede eliminar la mayor parte de la masa tumoral, pero al no destruir completamente la CSC o la CIC, el tumor se reproduce de nuevo, provocando una recaída en la enfermedad del paciente. Es obvio, que el diseño de nuevas estrategias dirigidas específicamente a la completa erradicación de estas CSC, combinadas con quimioterapia eliminarían más eficientemente los tumores y reducirían el riesgo de recaídas y metástasis (Jordan et al., 2006).

Para explicar las bases moleculares y celulares de la heterogeneidad intratumoral, que genera diferentes subpoblaciones de tumorales, así como el origen y desarrollo del tumor, se han propuesto dos modelos: el modelo jerárquico y el modelo estocástico (Dick, 2008).

Modelo jerárquico

Muchos autores comparan lo que ocurre en el tumor con el desarrollo de tejidos sanos. El tumor mimetiza la estructura un tejido y mantiene una organización jerárquica donde la CSC estaría en la cúspide. El tumor crece gracias a este reducido número de “células tipo-madre” que son capaces, mediante un proceso de división asimétrica, de autorrenovarse y generar la progenie completa de la masa tumoral, manteniendo el tumor a largo plazo.

Modelo estocástico

Otra alternativa sería que todas las células del tumor fueran biológicamente equivalentes y la heterogeneidad viniera dada por una influencia extrínseca o intrínseca que resulta en una respuesta estocástica o aleatoria de las células, que adquieren finalmente características y potencialidades diferentes. Este modelo contempla la posibilidad de que las células tumorales fluctúen entre estadio de CSC y no-CSC, según la señalización a la que estén sometidas.

La **plasticidad** de la CSC debe ser estudiada en profundidad, ya que si el fenotipo de las células del tumor fluctúa, no tiene sentido el diseño de tratamientos que acaben con estas CSC. Existen varias publicaciones encaminadas a estudiar esta plasticidad en las CSC. En ellas, basándose en supuestos marcadores de CSC, ven como cualquier célula del tumor, con y sin esos supuestos marcadores específicos de CSC, es capaz de recapitular el tumor inicial y generar los distintos fenotipos de marcadores celulares. Según esto, el mantenimiento del tumor se debe ver como un proceso dinámico mediado por distintas subpoblaciones de células tumorales temporales.

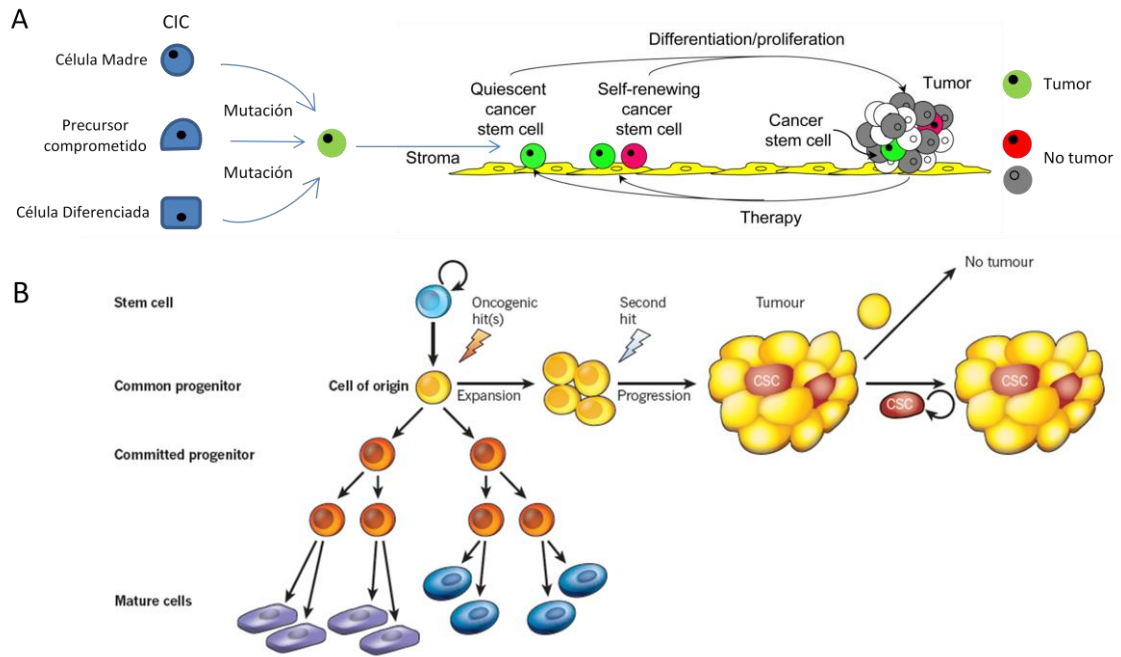


Figura 4. Célula madre tumoral (CSC) y Célula iniciadora de tumor (CIC).

II.3.2 Caracterización

II.3.2.1 Marcadores de CSCs

Aunque todavía no existan marcadores que definan claramente las CSC, en los últimos años se han ido identificando estas células en muchos tipos de tumores. La adecuada identificación y caracterización de este conjunto de células podría proporcionar una gran ayuda para el desarrollo de nuevas terapias anti-cáncer.

Los primeros estudios de este tipo se realizaron en leucemias, donde se han identificado marcadores fidedignos de células madre hematopoyéticas (HSC) y células madre leucémicas (LSC), como por ejemplo $CD34^+CD38^-$. Sin embargo, en la mayoría de los tejidos sólidos a partir de los que se genera cáncer, no están tan bien caracterizadas las células madre y la jerarquía de los progenitores a lo largo del desarrollo. Esto hace que prácticamente no se disponga de marcadores de CSC en tumores sólidos. Los marcadores, o combinación de ellos, identificados hasta ahora, han sido elegidos por expresarse diferencialmente dentro de la masa del tumor (lo que permite sortear distintas poblaciones) y no por el conocimiento que se tiene de la biología de los distintos tejidos. En algunas publicaciones se han descrito CD133, CD44, CD24, CD271 como marcadores de CSC en distintos tipos de cáncer (Bao et al., 2006; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Singh et al., 2004).

II.3.2.2 Ensayos con CSCs

La aproximación más frecuente usada para definir la CSC es el enriquecimiento en una subpoblación tumoral aislada por citometría de flujo gracias a marcadores específicos de superficie. Una vez aisladas se estudia su capacidad de autorrenovación y de generar

nuevos tumores. El mejor ensayo *in vivo* para mostrar la presencia de CSC es inyectando un subconjunto de células en xenógrafos que desarrollan, tras un periodo de latencia, un tumor. Este tumor puede ser trasplantado serialmente, mostrando que entre las células de la subpoblación reinoculada se encuentra la/las células capaces de generar nuevamente el mismo tipo de tumor con todos sus diferentes tipos celulares.

Existen otros ensayos *in vitro* muy usados que involucran sistemas de cultivo tridimensionales como son las tumoroesferas. Estas esferas se crecen en sustratos que emulan la matriz extracelular (ECM), como el matigel, que gracias a su composición modela la interacción que ocurre entre la CSC y la ECM en el microambiente tumoral. Estos estudios han sido especialmente relevantes en estudios recientes que muestran el papel del microambiente en el mantenimiento del nicho de la CSC (Bissell and Hines, 2011; Borovski et al., 2011; Medema and Vermeulen, 2011).

Clevers sugirió, como prueba de la capacidad metastática de la CSC, una interpretación extrema de los ensayos de xenógrafos, ya que las células que dan lugar al tumor pueden ser consideradas colonizadoras extremas de tejidos completamente diferentes al propio (Clevers, 2011).

II.3.3 Diferencias ente CSC y CIC

La célula iniciadora del cáncer (CIC) es un término que se ha estado usando de forma intercambiable con el de CSC. Pero en realidad, la CIC es la célula que adquiere la primera mutación que promueve la aparición de cáncer. Esta célula iniciadora no tiene porque ser necesariamente la CSC. El concepto entre ellas es diferente, la CIC se refiere a la célula da origen al tumor, mientras que la CSC hace referencia a células que sostienen el crecimiento maligno del tumor (Visvader, 2011).

La CIC podría ser cualquier tipo de célula dentro de la jerarquía del tejido que recuperan su habilidad de autorenovación mediante la adquisición de nuevas mutaciones, convirtiéndose así en CSC (Berman et al., 2008; Krivtsov et al., 2006). Así, la célula de origen puede corresponder en algunos casos a la célula madre normal del tejido, explotando su capacidad intrínseca de autorrenovación, o a progenitores muy tempranos. Esto se puede aplicar particularmente a tejidos con una tasa de renovación muy alta, como el intestino, ya que los progenitores no suelen tener una vida tan larga como para adquirir el conjunto adecuado de mutaciones necesarias para transformarse; esto ocurre en determinada leucemias, glioblastomas, cáncer de próstata e intestino. En otros tipos de cáncer la célula de origen está restringida a progenitores, que retienen un potencial proliferativo muy alto, o incluso en células maduras; esto sucede en meduloblastomas, carcinomas de célula basal y cáncer de mama asociado a mutaciones de BRCA1. Figura 4

La relación entre CIC y CSC no está todavía del todo clara. El estudio comparativo de estadios pre-neoplásicos y neoplásicos de los diferentes tipos y subtipos de tumores podría ayudar a comprender finalmente qué papel desempeña cada una de ellas.

La identificación de la CIC tiene importantes implicaciones para nuevas aproximaciones terapéuticas preventivas que supriman o reviertan la enfermedad en su fases iniciales. Una de las mayores aplicaciones de este avance sería el uso de terapias quimiopreventivas en individuos que pertenecen a familias con factores de riesgo de sufrir cáncer. Los

marcadores de superficie y kinasas proto-oncogénicas que se expresan diferencialmente en distintos subgrupos de células tejidos pre-neoplásicos podrían servir como marcadores de pronóstico y ser usados como dianas terapéuticas para erradicar o modificar el comportamiento de las células aberrantes en enfermedades pre-neoplásicas o ya establecidas (Lim et al., 2009a). Figura 4 (B)

III. Oncogenes y antioncogenes

III. Proto-oncogen y Oncogen: mutación dominante

Un **oncogén** es un gen anormal o activado que procede de la mutación de un alelo de un gen normal llamado protooncogén. Los proto-oncogenes codifican proteínas que colaboran en la regulación del crecimiento celular y la diferenciación, y están a menudo involucrados en transducción de señales y ejecución de señales mitógenas. Este tipo de mutaciones son dominantes, es decir, la sola activación de uno de los alelos hace que se active el proto-oncogen convirtiéndose en oncogen. Esto puede ocurrir con una pequeña modificación de la función original del gen, que puede venir dada por el aumento de la actividad o la pérdida de la regulación del mismo. Existen tres formas básicas de activación:

- Una mutación en el proto-oncogen que cause cambios en la estructura de la proteína que produzca el aumento de la actividad de la proteína o la pérdida de la correcta regulación de la proteína.
- Un aumento en la concentración final de la proteína causado por el aumento de la expresión de dicha proteína por una regulación errónea; por el aumento de la estabilidad de la proteína o de su ARN mensajero, prolongando su existencia y por tanto su actividad en la célula; o por duplicación del proto-oncogen.
- Una traslocación cromosómica que cause el aumento o disminución de la expresión del gen en la célula equivocada en el momento erróneo o que cause la expresión constitutiva de la proteína híbrida.

Un **oncogen** es por tanto, un gen con potencialidad para producir cáncer. La proteína resultante de un oncogen se denomina oncoproteína. Cuando estos genes están activados las células en lugar de sufrir apoptosis y morir, sobreviven y proliferan. Sin embargo, la sola activación de un oncogen no transforma a la célula en tumoral, son necesarios pasos adicionales, como mutaciones en otros genes para que la transformación maligna ocurra.

Ejemplos de proto-oncogenes son Ras, Wnt, Myc, PI3K, RAS, Erk y Trk.

III.2 Genes supresores de tumores: mutación recesiva

Un **gen supresor tumoral** es un gen que reduce la probabilidad de que una célula se transforme en una célula cancerígena, inhibiendo la proliferación celular excesiva. Una mutación o una delección de un gen supresor tumoral, aumentará la probabilidad de que se produzca un tumor.

En las células silvestres, las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores detienen la progresión del ciclo celular en respuesta a un daño en el ADN o a señales de supresión del crecimiento provenientes del medio extracelular. Sin embargo, cuando se producen mutaciones en estos genes, las células no responden a los puntos de control del

ciclo celular, no puede valorar el daño producido, y cuando la lesión genética resultante en la célula es demasiado grande, son incapaces de realizar el programa de apoptosis o muerte celular programada. En estos casos, las células continúan ciclando, con lo cual se siguen acumulando aberraciones que llevan finalmente a la transformación tumoral de la célula.

Al contrario que lo oncogenes, los genes supresores de tumores intervienen en el proceso tumoral si sufren mutaciones que los inactivan, es decir, si se produce una pérdida de función; este tipo de mutación tiene un efecto recesivo, ya que para eliminar la actividad, ambos alelos tienen que estar mutados. Actualmente se conocen tres formas de inactivación de estos genes:

- Mutaciones puntuales que conducen a cambios en el marco de lectura del gen, a codones de parada (codones STOP) o al cambio de uno o varios aminoácidos.
- Delecciones de un fragmento del gen.
- Por metilación del promotor del gen, que no permita su expresión y por tanto, en la práctica es como si el gen no estuviese o estuviese mutado.

Los genes supresores de tumores pertenecen a distintos tipos de proteínas, como factores de crecimiento, de adhesión celular, control del ciclo celular, factores de transcripción, reparación del ADN, etc. Ejemplos de genes supresores de tumores son Rb, p53, PTEN, p16, BRCA.

III.3 p53

P53 es uno de los genes supresores de tumores más estudiados a lo largo de la historia. Fue descubierto por primera vez en 1979, pero no fue hasta más de diez años después cuando se reparó en su verdadera importancia tras la observación de que más de la mitad de los tumores humanos tienen p53 mutado. Figura 5

III.3.1 Características del gen

El gen humano de p53 está localizado en el cromosoma 17 (17p13), una región que está frecuentemente mutada en cáncer. Consta de 22.000 pares de bases (bp) en los que se incluyen 22 exones que codifican para un mRNA de 2,2 Kilobases (Kb). El procesamiento alternativo del gen genera al menos 8 isoformas diferentes, cuyas diferencias funcionales aún son desconocidas. La forma silvestre (wt) de la proteína de longitud completa tiene 393 residuos de aminoácidos y 43,7KDa, pero su masa molecular aparente en electroforesis de poliacrilamida es de 53KDa, de ahí su nombre. Contiene 5 dominios estructurales y funcionales:

- 1.- El extremo amino-terminal (1-42 aa) contiene un dominio de transactivación, necesario para la activación de la proteína, y el sitio de unión para MDM2. Es una región altamente conservada.
- 2.- El segundo dominio (61-94 aa) contiene series repetidas de residuos de prolina, igualmente muy conservados. También contiene un segundo dominio de transactivación.

3.- La región central (102-292 aa) contiene el dominio de unión a ADN que facilita la unión específica a secuencia del ADN que responden a p53.

4.- El dominio de oligomerización (324-355 aa) facilita la interacción entre los monómeros de p53, que forman dímeros, y la interacción de los dímeros forma el tetrámero final, forma esencial para la regulación de la expresión de los genes modulados por p53. Este dominio también contiene una señal de exportación del núcleo.

5.- El extremo carboxi-terminal contiene tres señales de localización nuclear y un dominio de unión a ADN no específico, que se une al ADN dañado.

p53 tiene dos proteínas homólogas, p63 y p73, que también expresan gran cantidad de isoformas debido al uso de diferentes promotores y a "splicing" alternativos. Las isoformas de larga longitud transactivan los mismos genes que p53 e inducen apoptosis; las isoformas cortas tienen una actividad opuesta, mediante mecanismos dominantes negativos. Figura 5

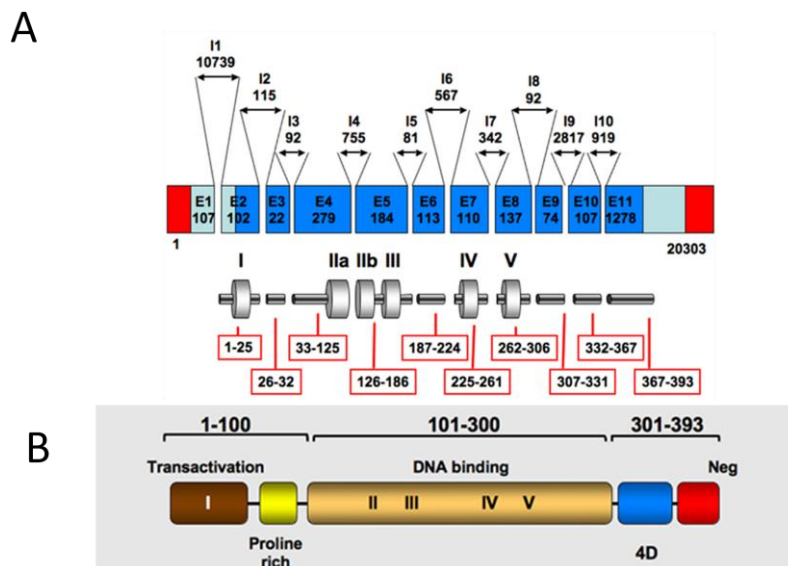


Figura 5. Estructura del gen p53

III.3.2 Función de p53

p53 es un factor de transcripción que se encuentra en la encrucijada de varias vías de señalización y es esencial para la regulación del destino celular entre proliferación y apoptosis. A grandes rasgos, esta proteína detecta el daño en el ADN producido por diversos tipos de agentes y promueve la reparación o la apoptosis, cuando el daño producido es tan grande que la reparación no es posible. Las principales funciones de p53 son (Figura 6):

1.- Parada del ciclo celular en los puntos de control G1/S o G2/M cuando se reconoce el daño en ADN para evitar la replicación de la célula. La parada en G1/S está principalmente mediada por la activación de p21, que inhibe los complejos CDK/ciclina, evitando así la fosforilación de Rb, que permanece unido a E2F, e impide la progresión del ciclo a la fase S. La pausa es aprovechada por los mecanismos celulares de reparación de ADN.

2.- Activación de enzimas de reparación de ADN, como p53R2, endonucleasa AP y la ADN polimerasa, implicados en la reparación por escisión, entre otras proteínas. Si el daño producido se repara correctamente, p53 estimula la síntesis de MDM2, promoviendo su propia degradación, lo que permite la progresión del ciclo. Si el daño no puede ser reparado, la célula entrará en apoptosis o senescencia mediada por p53.

3.- Entrada en senescencia, que requiere la activación de p53 y/o pRb y la expresión de mediadores como inhibidores de CDK. Suele ser un proceso irreversible. Los cambios que se producen no se comprenden aún en su totalidad, pero parecen implicar modificaciones epigenéticas que llevan a la heterocromatinización de determinados loci.

4.- Activación de la apoptosis, p53 induce transcripcionalmente un gran número de genes pro-apoptóticos como Bax, Puma y NOXA. Además, regula negativamente la transcripción de genes que suprimen la apoptosis incluyendo BCL-2, MCL-1 y Survivin, así como MDR-1, gen que confiere a la célula un fenotipo de resistencia multidroga (Stein, 1997). La entrada en apoptosis es el último mecanismo protector que tiene la célula, si el daño en el ADN generado es irreparable, se activa esta respuesta para evitar la propagación de células con aberraciones genéticas.

Los mecanismos bajo los que subyace la decisión celular de reparación celular o entrada en apoptosis permanecen desconocidos. Parece que p53 presenta mayor afinidad por los promotores de los genes de reparación del ADN que por los promotores de los genes pro-apoptosis, de manera que primero se activa la reparación del ADN. Pero si ésta no es efectiva y p53 continúa acumulándose, se activarían los genes pro-apoptosis. Figura 6

III.3.3 Mecanismo de regulación

En células normales no estresadas, el nivel de p53 se mantiene bajo mediante la unión a MDM2 principalmente, aunque también se une a COP1, PIRH2 o JNK, que promueven la degradación de p53 vía ubiquitinación en proteosomas. La mayoría de estos genes están regulados positivamente por p53, lo que lleva a un bucle que mantiene la expresión de p53 a muy bajo nivel. Bajo condiciones de estrés genotóxico o no-genotóxico, se produce en primer lugar una inhibición entre la interacción de p53 con MDM2 y los otros reguladores negativos, tras lo cual ocurren una serie de modificaciones post-transcripcionales en p53 que contribuyen a su estabilización, seguida de una acumulación nuclear y posterior activación bioquímica mediante una serie de kinasas y acetilasas (AKT, ATM, etc.).

En resumen, p53 enlaza los procesos de daño en el ADN con reparación, parada en el ciclo celular y apoptosis, por ello que recibe el nombre de "guardián del genoma". Si una célula pierde la función de p53, el daño en el ADN no se repara, se acumula en la progenie celular que se vuelve susceptible de sufrir una transformación tumorigénica. Figura 6

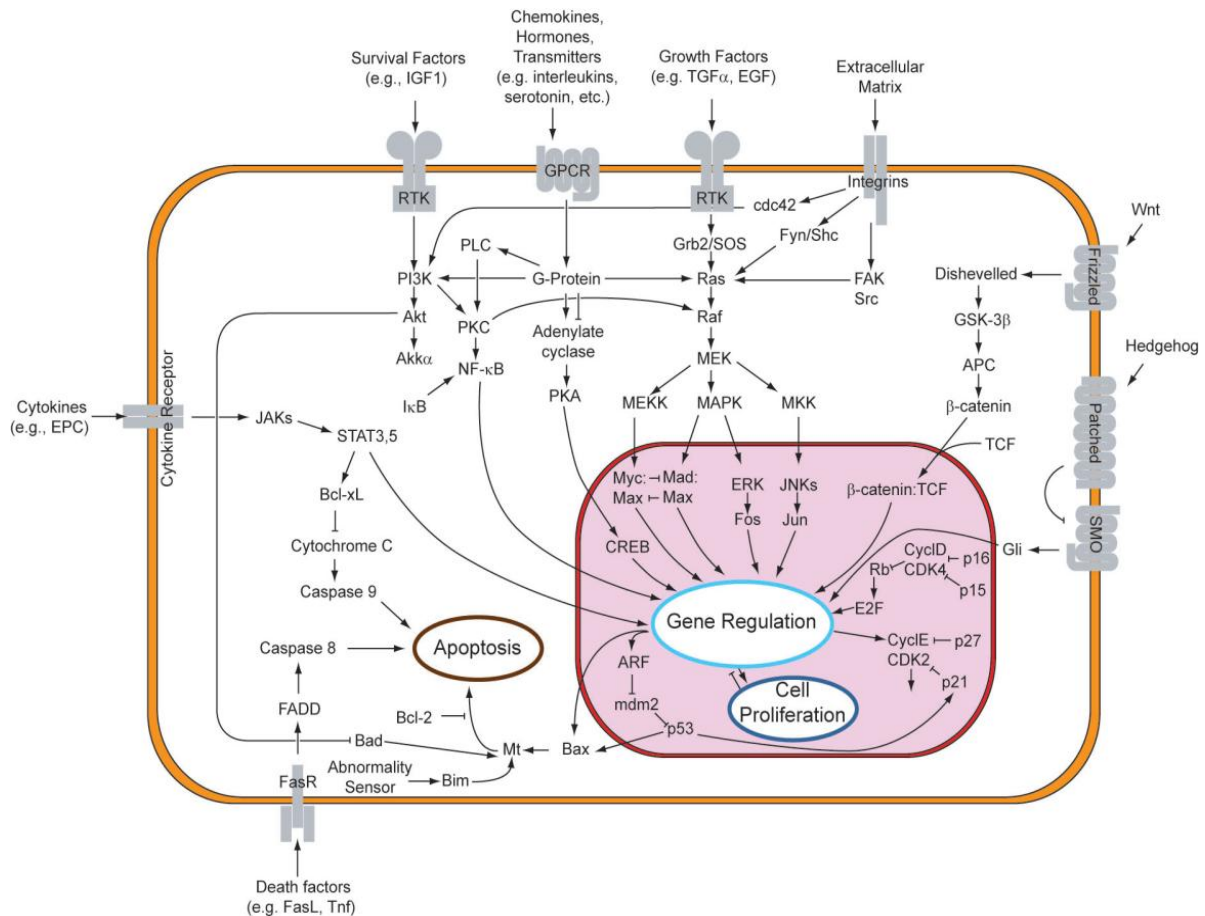


Figura 6. Función de p53

III.3.4 Papel de p53 en cáncer

La mutación del gen p53 es uno de los cambios genéticos más frecuentes en cáncer. Está implicado en la mayoría de los tipos de cáncer: de piel, mama, cabeza y cuello, pulmón estómago, hígado, colorrectal, vejiga, cervical, próstata, ovario y en glioblastomas. La mayoría de las mutaciones se localizan en el dominio central de unión a ADN, donde existen determinados puntos con una alta tasa de mutación llamados puntos caliente o "hot spots".

P53 se inactiva mediante mutaciones sin sentido o cambios de pautas de lectura que llevan a la desaparición del producto del gen o a la síntesis de proteínas aberrantes no funcionales. La función de p53 se suele eliminar durante el desarrollo de los tumores y la desaparición del alelo silvestre ocurre típicamente por mecanismos cromosómicos como grandes deleciones, recombinaciones mitóticas o una mala disyunción cromosómica, más que por una mutación puntual. Una particularidad de p53, a diferencia de otros genes supresores de tumores, es que cuando se producen mutaciones de pérdida de sentido se

pueden sintetizar proteínas con funciones diferentes a la del gen silvestre, que presentan una marcada heterogeneidad en sus actividades. Muchas de estas proteínas resultantes aumentan su vida media y se piensa que interfieren con la actividad de la proteína silvestre expresada en la misma célula, eliminando aparentemente su actividad silvestre residual. Además la pérdida contribuye positivamente a la proliferación celular incluso en ausencia de actividad silvestre de p53 (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994).

A pesar de que en determinados tipos de cáncer se ha descrito la pérdida de expresión de p53, en más del 80% de los casos, las mutaciones de p53 llevan a la síntesis de una proteína estable, en la que se elimina la especificidad de unión a ADN (Soussi and Beroud, 2001). Esto puede tener dos consecuencias: un papel dominante negativo, al oligomerizar el p53 mutante con el p53 expresado por el alelo wt, o una ganancia de función de la proteína mutante de p53. Estas mutaciones promueven las señales de supervivencia y tumorigénesis (Lim et al., 2009b; Mogi and Kuwano, 2011; Oren and Rotter, 2010).

La localización subcelular de la proteína mutante es crítica para la biología de la enfermedad. La mayoría de las mutaciones específicas de cáncer de p53 llevan a la localización nuclear de la proteína mutante, cuya vida media es más larga y adquiere la habilidad de activar transcripcionalmente genes que p53 wt no induce. Entre los genes inducidos por la ganancia de función de las formas mutantes de p53 se encuentran EGF (Deb et al., 1994), c-Myc (Frazier et al., 1998), Fos (Preuss et al., 2000) y MDR-1 (Sampath et al., 2001). El efecto de la ganancia de función de p53 no se limita a la modificación de la expresión de determinados genes, se ha demostrado que aumenta las propiedades promigratorias, proinvasivas y prometastáticas de TGF- β (Adorno et al., 2009). Asimismo puede inactivar los genes supresores de tumores relacionado como p63 y p73, que tiene un importante papel en la estabilización del genoma y en la supresión de aneuploidias y poliploidias en células deficientes para p53 (Oren and Rotter, 2010; Strano et al., 2000; Talos et al., 2007).

III.4 Rb

El gen del retinoblastoma (Rb) fue el primer gen supresor de tumores descrito en 1976 por Weinberg y recibe el nombre de la enfermedad en la que se descubrió. Rb es considerado actualmente como un co-regulador transcripcional que puede unirse a numerosos factores de transcripción, antagonizando o potenciando la actividad de los mismos (Macaluso et al., 2006; Morris and Dyson, 2001). Se ha demostrado que puede unirse a más de cien proteínas asociadas, al igual que es capaz de mediar la regulación transcripcional de cientos de genes diana. Estas proteínas asociadas podrían ser las responsables de mediar muchas de las funciones celulares de Rb. Figura 7

III.4.1 Características del gen

Se localiza en el cromosoma 13 (13q14.1-q14.2) y su producto es una proteína de 928 aa y 110 KDa que no tiene dominios específicos de unión a ADN ni de interacción con otras proteínas. Las proteínas asociadas se unen a una región central (llamada "pocket") o a residuos específicos, con lo que parece que diferentes estructuras del gen pueden tener funciones concretas. Durante la progresión del ciclo celular puede sufrir varias modificaciones post-transcripcionales, como acetilaciones o fosforilaciones. Pertenece a una familia de proteínas llamadas "pocket proteins" que están relacionadas estructural y

funcionalmente. Los miembros de esta familia son Rb, p107 y p130, siendo las dos últimas proteínas más parecidas entre ellas. Todas parecen estar implicadas en el control del ciclo celular en fase G1, aunque se han descrito diferencias en regulación y funciones entre ellas: tienen diferentes patrones de expresión a lo largo del ciclo; Rb es la única más o menos estable en todas las fases y en quiescencia, mientras que p107 se acumula cuando la célula entra en ciclo y p130 disminuye su expresión cuando hay señales de estimulación de crecimiento. Además, interactúan con distintos miembros de la familia E2F y con distintos complejos ciclina-quinasa dependientes (CDKs). La función concreta que desempeña cada una de estas proteínas permanece aún desconocida, aunque se sabe que tienen funciones, celulares y en el desarrollo, solapantes y propias de cada una de ellas (Classon and Dyson, 2001; Claudio et al., 2002; Cobrinik, 2005; Dannenberg and te Riele, 2006; Wikenheiser-Brokamp, 2006). Figura 7

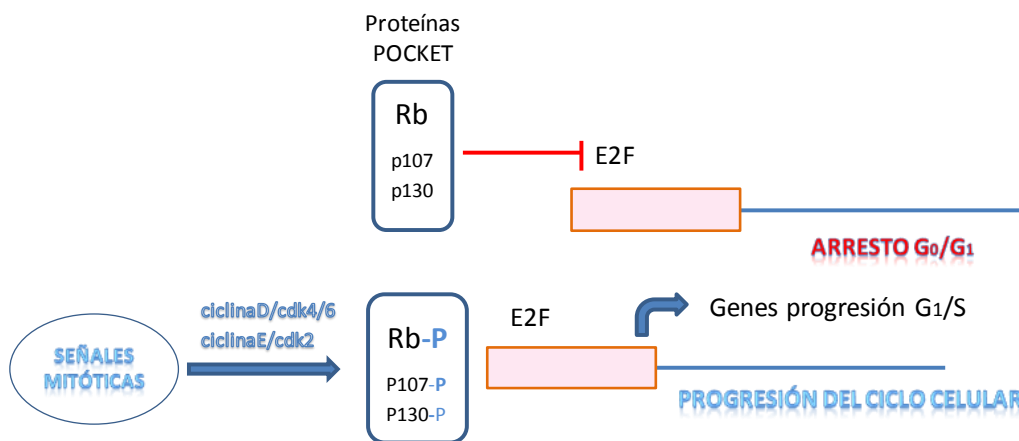


Figura 7. Función de Rb

III.4.2 Función de Rb

A este gen se le han atribuido multitud de funciones, pero la más destacada es la de regulador central del ciclo celular. También participa otros procesos celulares como en el control de la diferenciación celular durante la embriogénesis y en tejidos adultos, la regulación de la muerte celular por apoptosis, el mantenimiento transitorio y permanente del arresto del ciclo celular y la preservación de la estabilidad cromosómica. Las principales funciones son:

1.- Regulador central del ciclo celular. Controla la progresión del ciclo de G1 a S (G1/S "checkpoint"). Rb, como gen supresor de tumores, puede encontrarse en dos estados: hipofosforilado e hiperfosforilado. En el estado hipofosforilado, Rb es activo y bloquea la progresión del ciclo celular en el límite entre las fases G1 Y S, permitiendo que la célula pueda valorar el estado del material genético que se va a replicar. La inhibición del inicio de la fase S se realiza mediante su unión, y consecuente bloqueo, a factores de transcripción, como determinados miembros de la familia E2F, que estimulan la síntesis de

DNA. A medida que la proteína se va fosforilando, pierde su capacidad de unión a proteínas, liberando a los diferentes factores E2F, facilitando así el inicio de la fase S en la célula. Durante el transcurso del ciclo celular Rb sufre una desfosforilación progresiva que hace que vuelva a bloquear el inicio de la fase S en el siguiente ciclo celular. Cuando la célula va a dividirse, determinados complejos de CDKs y ciclinas fosforilan Rb inhibiendo su actividad. La fosfatasa PP1 es la encargada de desfosforilar Rb, devolviéndolo a su estado hipofosforilado y activo, evitando así que la célula entre en un nuevo proceso de división. La pérdida de este gen priva a las células además de un punto de control mitótico importante y permite la proliferación incontrolada (M "checkpoint"). De esta forma, Rb impide que células con daño en el ADN progresen en el ciclo celular, repliquen su ADN y se dividan, evitando así que se perpetúen los daños genéticos producidos.

2.- Remodelamiento de la cromatina. Rb actúa también como una proteína adaptadora que recluta enzimas remodeladoras de la cromatina, controlando así la expresión de determinados genes diana y modificando la estructura de la cromatina a nivel cromosómico (Brehm and Kouzarides, 1999; Gonzalo and Blasco, 2005). El complejo Rb-E2F recluta histona desacetilasas (HDACs), produciendo la unión entre estas últimas y la cromatina. También se une a la DNMT1, la HP1A y SUV39H1, que reprime la transcripción de factores que promueven la entrada en fase S, amplificando así la inhibición de la síntesis de ADN. Además, Rb es co-activador transcripcional de otros factores de transcripción de forma independiente de E2F, como HIF1 α , MYOD y SP1. También sirve como adaptador de proteínas no asociado a cromatina, como por ejemplo el complejo promotor de anafase (APC/C) y la kinasa 2 asociada a fase S (SKP2). Figura 7 Estudios recientes han sugerido que Rb podría promover la condensación cromosómica a través de la unión directa con una proteína de condensación (Longworth et al., 2008).

3.- Control de la diferenciación celular. Rb provoca la salida del ciclo en fase G1, necesaria para que se produzca la diferenciación y especificación celular. Esto ocurre tanto durante el desarrollo embrionario como en tejidos adultos, donde promueve la diferenciación de múltiples linajes celulares mediante la unión y regulación de factores de crecimiento específicos de tejido (Morris and Dyson, 2001; Skapek et al., 2006) e inhibidores de la diferenciación como ID2 y EDI (Iavarone et al., 2004; Lasorella et al., 2000; MacLellan et al., 2000; Miyake et al., 2000), así como otros factores de transcripción generales (Benevolenskaya et al., 2005; Krutzfeldt et al., 2005).

Un claro ejemplo de regulación del linaje celular se puede observar en la regulación de la diferenciación a osteoblastos y adipocitos a partir de MSCs. En este caso, Rb parece jugar un papel en la elección del destino celular entre estos dos linajes: al unirse a Runx2 potencia su habilidad para promover la diferenciación osteogénica, mientras que el complejo Rb-E2F impide la activación de PPAR- γ , principal activador de la adipogénesis, sugiriendo que dependiendo del estado en el que se encuentre Rb favorecerá la diferenciación hacia uno u otro linaje. De hecho, la pérdida de Rb, *in vivo*, favorece la adipogénesis frente a osteogénesis, hasta el extremo de que reduce los niveles de hueso calcificado y aumenta los niveles de grasa parda. Además, en líneas de osteosarcoma deficientes para p53 se ha visto como la pérdida de Rb hace que se regulen negativamente determinados marcadores de hueso (Bsp, Coll I y Alp) y positivamente marcadores adipogénicos como el mencionado PPAR- γ , resultado que se revierte completamente mediante la recuperación funcional de Rb. Por tanto, la eliminación o reintroducción de Rb parece suficiente para cambiar la especificación del linaje (Calo et al., 2010).

4.- Senescencia. La senescencia celular sirve para evitar la aparición de tumores *in vivo* en respuesta a estrés oncogénico. En células senescentes existe un arresto permanente e irreversible del ciclo celular, que puede desaparecer mediante la pérdida de Rb. También se ha mostrado que Rb participa y modula la formación de heterocromatina específica de células senescentes, cooperando en la heterocromatinización de los *loci* de genes del ciclo celular (Beausejour et al., 2003; Collado et al., 2007; Courtois-Cox et al., 2008; Narita et al., 2003). Además interviene en el mantenimiento de la longitud de los telómeros, mediando señales celulares que inducen senescencia en caso de telómeros significativamente acortados (García-Cao et al., 2002; Kong et al., 2006; Wei et al., 2003).

5.- Muerte celular y apoptosis. En ausencia de Rb, E2F1 media específicamente la inducción de la apoptosis activando genes necesarios como Apaf1 y Trp73 (Inoue et al., 2007). E2F3 también puede producir muerte celular en células deficientes para Rb (Saavedra et al., 2002; Ziebold et al., 2001).

6.- Preservación de la estabilidad cromosómica. Rb actúa como controlador del ciclo celular, no solo en la transición G1/S, como se mencionaba anteriormente, sino también a lo largo de la fase S y en la transición G2/M. La pérdida de estos puntos de control contribuye a la acumulación de defectos durante la replicación del ADN (S) y a la segregación cromosómica anormal durante la mitosis (M), permitiendo la proliferación de células con graves anomalías genómicas. Estas anomalías pueden ir desde alteraciones del patrón de expresión de determinados genes, hasta alteraciones cromosómicas, aneuploidías, poliploidías, etc. El mecanismo por el que se produce esta aneuploidía no está completamente claro, se sabe que los complejos Rb-E2F modulan negativamente la expresión de MDM2, componente del punto de control del uso mitótico; cuando Rb está mutado, los niveles de MDM2 aumentan, al no tener esta inhibición, y se producen segregaciones cromosómicas aberrantes que generan finalmente inestabilidad cromosómica.

III.4.3 Rb en cáncer

A pesar de que se han identificado multitud de funciones celulares y proteínas de unión a Rb, todavía no está completamente claro cuáles de esas funciones son necesarias o imprescindibles para la prevención del cáncer. Diferentes funciones de Rb podrían tener particular importancia en los distintos pasos de la tumorigénesis (iniciación, progresión e invasión), o ser necesarias para suprimir la formación de tumores en distintos tipos celulares, como células madre o diferentes tipos de células diferenciadas. Mutaciones del gen Rb contribuyen al desarrollo de una parte importante de los cánceres humanos más comunes, están asociadas con un aumento de la angiogénesis y aumentan el potencial metastático.

III.4.3.a Iniciación del tumor

Rb está funcionalmente inactivado en un amplio rango de tipos de cáncer tanto pediátricos como adultos. Este gen está mutado en un tercio de los tumores humanos. Se sabe que es el evento que inicia el retinoblastoma y que aumenta el riesgo de osteosarcoma infantiles y adolescentes. (Bookstein and Lee, 1991; Burkhart and Sage, 2008; Deshpande and Hinds, 2006; Friend et al., 1986) En adultos, el gen Rb se inactiva en carcinomas de vejiga, mama y pulmón. Por ejemplo, en carcinomas de célula pequeña de pulmón Rb esta

inactivado en el 90% de los casos (Meuwissen et al., 2003). Además, la proteína Rb es una diana importante de las proteínas oncogénicas de varios virus tumorales de ADN, como el virus del papiloma humano (HPV) capaz de iniciar el cáncer de cérvix y el carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello, en parte mediante la inactivación de Rb (Doorbar, 2006; Perez-Ordóñez et al., 2006). Mecanismos similares están probablemente involucrados en el cáncer de hígado inducido por virus (Munakata et al., 2007).

La mutación tiene distintas consecuencias dependiendo en qué tipo de células ocurra, célula madre, progenitor o célula madura. Figura 8

En células madre que tienen capacidad de autorrenovación y diferenciación, pero suelen estar quiescentes, parece que en los modelos estudiados la pérdida de Rb provoca la salida de la quiescencia e incluso un incremento de la proliferación o pérdida de la capacidad de diferenciación, lo cual aumenta la probabilidad de desarrollo de cáncer (Daria et al., 2008; Ruiz et al., 2004; Walkley and Orkin, 2006; Walkley et al., 2007; Wildwater et al., 2005).

Por otro lado, existen evidencias que indican que la pérdida de Rb podría permitir que las células diferenciadas entren de nuevo en el ciclo e inicien cáncer. Parte de las modificaciones necesarias podrían ser el remodelamiento de la cromatina que permitiría la expresión de genes del ciclo, resultando en una desdiferenciación de la célula mutante (Ferreira et al., 2001; Sage et al., 2003; Skapek et al., 2006).

A pesar de que la transformación tumoral es posible en células madre y maduras, parece que es más probable que la pérdida de Rb produzca cáncer a partir de progenitores que ciclan. En estas células, la pérdida de Rb puede acelerar la proliferación y evitar la salida habitual del ciclo en G1, bloqueando de esta forma muchos procesos de diferenciación. Esto se puede observar en cáncer de cérvix, donde el tumor se produce a partir de progenitores de la capa basal del epitelio (Doorbar, 2006). En progenitores cerebrales, donde Rb se acumula antes de la salida de ciclo, su pérdida lleva al retraso en la salida del ciclo (Callaghan et al., 1999; Ferguson and Slack, 2001; Ferguson et al., 2002; Slack et al., 1998), igualmente en progenitores de retina murinos, donde además del mencionado retraso, se observan defectos en diferenciación específica y aumenta la muerte celular. Sin embargo, en ninguno de estos progenitores, la pérdida de Rb es suficiente para el desarrollo de cáncer en cerebro o retinoblastoma, aunque es la mutación que hace a la célula susceptible de transformación (Chen et al., 2004a; Dyer and Bremner, 2005; MacPherson et al., 2004; Pacal and Bremner, 2006; Zhang et al., 2004).

III.4.3.b Progresión del tumor

En general, Rb previene la iniciación de retinoblastoma, osteosarcoma y cáncer de pulmón de célula pequeña. En los demás tipos de cáncer su mutación es un evento oncogénico colaborador.

En la gran mayoría de los tumores solo aparecen las alteraciones de Rb en las fases tardías, observación que sugiere que la pérdida temprana de Rb podría suponer una desventaja durante el desarrollo del tumor, en algunos contextos, ya que la presencia de Rb en células tumorales podría evitar la apoptosis mediada por E2F1 en respuesta al daño en el ADN. El papel de Rb en respuesta al daño en ADN depende significativamente del tipo celular, pero parece que, en determinadas circunstancias, aumenta la supervivencia (Burkhart and Sage,

2008; Halazonetis et al., 2008). Sin embargo, si las células tumorales portan ya mutaciones que la protegen de la apoptosis, como la pérdida de p53, el tumor se beneficiará de la pérdida de Rb y su función como gen supresor de tumores. Figura 8

La presencia de Rb en células tumorales podría en teoría prevenir la progresión del cáncer:

- promoviendo su diferenciación y restringiendo, por tanto, su potencial proliferativo. Además, esto explicaría porque la pérdida de Rb durante la progresión del tumor hace que aumente su agresividad, pasando de diferenciado a pobremente diferenciado.
- evitando la segregación cromosómica aberrante y la consecuente inestabilidad cromosómica.
- manteniendo la correcta regulación de las enzimas modificadoras del ADN, como DNMT1, evitando así la modificación del patrón epigenético.
- impidiendo que, durante la progresión del cáncer, se eludan los programas celulares asociados a senescencia, bien sean inducidos por replicación del ADN o por estrés oncogénico.

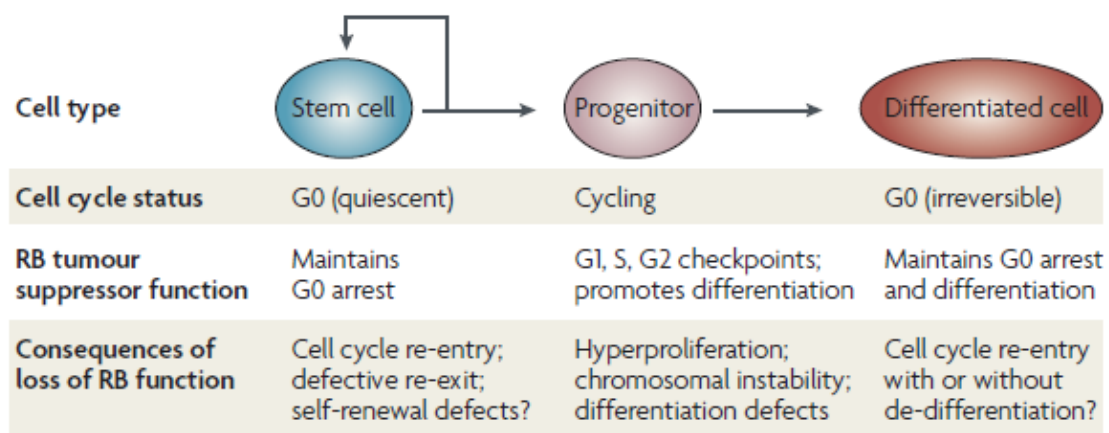


Figura 8. Rb en cáncer

III.5 p53 y Rb en sarcomas

III.5.1 Mutación de p53 en sarcomas

Los sarcomas representan un 25% de los tumores que portan la mutación p53. Este amplio grupo de tumores se caracterizan por una enorme inestabilidad genética, lo que correlaciona con la pérdida de p53.

La frecuencia de mutación de p53 en sarcomas humanos oscila entre el 6% aproximadamente en liposarcomas bien diferenciados y des-diferenciados, y el 23% en osteosarcomas [12]. La disrupción de la vía de señalización de p53 parece ser un evento oncogénico clave en muchos tipos de sarcoma. Así por ejemplo, la expresión del gen de fusión EWS-FLI-1 podría silenciar la actividad de p53 a través de la formación de un complejo EWS-FLI-1/p53 [115] o inhibiendo la activación de p53 inducida por NOTCH [116]. También

se ha observado la sobreexpresión de Mdm2, inhibidor de p53, en Sarcomas de tejidos blandos (STS) [117]. Las vías de señalización de p53, p16 y p14 están frecuentemente desmantelados en MLS[118 Cell Res nuestro]. La mutación de p53 en la línea germinal es la única mutación consistente en el síndrome de Li-Fraumeni. Este es un síndrome que confiere al individuo una predisposición a sufrir distintos tipos de cáncer en edades tempranas e involucra frecuentemente a varios miembros de la familia todos ellos afectados en p53 en las células germinales. De todos los tipos de cáncer que ocurren en este tipo de síndrome, el 17,4% son sarcomas y la proporción aumenta al 36,8% en pacientes menores de 20 años. Los tipos de sarcoma más frecuentes son, ordenados de mayor a menor frecuencia: Osteosarcomas, rhabdomiosarcoma, leiomiomasarcoma, liposarcoma, histiocitoma y otros tipos de sarcoma esporádicamente. En pacientes menores de 5 años el rhabdomiosarcoma es el más común. Los sarcomas que se establecen a una edad temprana (<20 años) se asocian con mutaciones de pérdida de sentido en exones que pertenecen al dominio de unión al ADN. Mutaciones nulas de p53 (por cambio de pauta de lectura, sitios de "splicing" o sin sentido) y otras mutaciones fuera del dominio de unión al ADN, se han asociado con leiomiomasarcoma (Ognjanovic et al., 2012).

III.5.1 Mutación de Rb en sarcomas

Rb esta frecuentemente mutado en Osteosarcoma y es requerido para la diferenciación osteogénica (Thomas et al., 2001) Pacientes con mutación de Rb en la línea germinal, tienen un riesgo especialmente elevado de desarrollar sarcomas tras la irradiación terapéutica, habitualmente osteosarcomas.

En STS de cariotipo complejo, Rb está frecuentemente alterado (Gibault et al., 2011). Diversos genes de la vía Rb-Ciclina D están implicados en leiomiomasarcoma, como la pérdida de Rb o la sobreexpresión de p16 ó CDKN2A, CCND1 y CCND3 (Dei Tos et al., 1996).

IV. SARCOMAS

Los sarcomas comprenden un grupo muy heterogéneo de tumores malignos de origen mesodérmico, que pueden clasificarse de diferentes formas atendiendo a sus características histológicas o genéticas. El diagnóstico se basa en el examen de cortes del tejido tumoral teñidos con hematoxilina-eosina y en la observación de las alteraciones genéticas. Las variables de pronóstico más utilizadas son: grado del tumor, tamaño y localización del mismo.

Histológicamente, según la organización mundial de la salud (WHO) los sarcomas se pueden agrupar en dos tipos: sarcomas de tejidos blandos (STS) y sarcomas de hueso primario. Los STS comprenden tumores adipocíticos, fibroblásticos o miofibroblásticos; tumores de músculo liso y músculo esquelético; tumores fibrohistocíticos, perivascular o perivasculares, vasculares, musculares con diferenciación condro-ósea y de diferenciación indefinida. Los tumores de hueso, por su parte, incluyen tumores de cartílago, de hueso, fibrogénicos y fibrohistocíticos de hueso, tumor primitivo neuroectodermal o sarcoma de Ewing, tumores hematopoyéticos, de célula gigante, tumores con neoplasias de origen desconocido y de síndromes heredados y congénitos. Una nueva clasificación alternativa incluye una caracterización del comportamiento biológico de los tumores en cuanto a su

agresividad, dividiendo cada tipo de tumor en tres grupos: benignos, intermedios (subdivididos a su vez en localmente agresivos o raramente metatastizables) y malignos.

IV.1 Tumores de tejidos blandos (STS)

La gran mayoría de estos STS son benignos y tienen una alta tasa de curación total tras la escisión de los mismos. Este tipo de tumores son difíciles de diagnosticar, ya que existen más de 50 subtipos histológicos y pueden ser muy agresivos.

IV.1.1 Tipos de tumor y localización

Existe una relación entre el tipo de tumor, los síntomas, la localización y la edad del paciente. Su incidencia en la población aumenta con la edad, siendo la media de edad de aparición los 65 años. Dentro de los tumores benignos, el 99% son superficiales (Myhre-Jensen, 1981). Sin embargo, en el 75% de los STS malignos están localizados en el interior de las extremidades, mayoritariamente en el muslo (Skubitz and D'Adamo, 2007). En general, el 10% de los pacientes con STS padecen ya metástasis detectables (comúnmente en los pulmones) durante el diagnóstico del tumor primario; aproximadamente el 33% de estos pacientes mueren por la enfermedad, siendo la mayoría debido a las mencionadas metástasis de pulmón.

El 75% de los STS se clasifican histológicamente como sarcomas altamente pleiomórficos, liposarcoma, leiomiomasarcoma, sarcoma sinovial y tumores de la vaina de nervios periféricos. La distribución de los distintos tipos histológicos varía en el tiempo y de unos autores a otros, debido probablemente a cambios en las definiciones de los diferentes tipos histológicos de sarcomas.

IV.1.2 Etiología

El origen de la mayoría de los STS, bien sean benignos o malignos, es hasta ahora desconocido. En algunos casos concretos se ha relacionado el desarrollo de tumores malignos con determinados factores genéticos y exposición a determinados factores ambientales:

- Agentes carcinógenos; como herbicidas fenoxiacéticos, clorofenoles o contaminación con dioxina (Eriksson et al., 1990).
- Radiación; en un número de casos inferior al 1%, aparecen STS como consecuencia de la radioterapia coadyuvante en los tratamientos de tumores primarios, por ejemplo en cáncer de pecho. El riesgo de aparición aumenta con la dosis de la irradiación (Karlsson et al., 1998) y la media de aparición de estos tumores secundarios es de 10 años, tras el tratamiento radiológico.
- Infecciones virales; el virus del herpes humano juega un papel importante en el desarrollo del sarcoma de Kaposi (Boshoff and Weiss, 1998; Weiss et al., 1998); el virus de Epstein-Barr se asocia con tumores de músculo liso en pacientes con inmunodeficiencias (McClain et al., 1995).
- Cicatrices; También se han reportado algunos casos en los que los STS aparecen en tejido cicatrizante, fracturas o cerca de implantes quirúrgicos (Kirkpatrick et al., 2000).
- Base genética familiar heredable; los tumores que aparecen por esta causa son casos muy aislados de sarcomas benignos en su mayoría. No obstante, en

pacientes con síndrome Li-Fraumeni causado por mutaciones en la línea germinal del gen p53, más de la mitad desarrollan tumores malignos antes de cumplir los 30 años, siendo el 50% de ellos STS y tumores óseos. Mutaciones germinales de Rb también están asociadas al desarrollo de sarcomas.

IV.1.3 Alteraciones genéticas más frecuentes en STS.

El 30% de los sarcomas llevan asociados traslocaciones específicas que dan lugar a proteínas de fusión. Estas proteínas de fusión pueden actuar de dos formas: como factores de transcripción, desregulando determinados genes cuya alteración contribuye al crecimiento del tumor, o bien traslocando un promotor muy activo delante de un oncogén, lo cual lleva también, irremediablemente, al desarrollo de un tumor (Ye et al., 2010).

Diversos estudios han realizado análisis moleculares de tumores de pacientes para tener una idea de lo que ocurre en ellos a nivel genómico. El análisis de Barretina et al., de 2010, integró en su estudio la secuenciación de ADN, “arrays” de expresión y número de copias de ARN mensajero (mRNA), en un abultado número de muestras de los subtipos más frecuentes de STS. Con esto se determinó una serie de genes con una elevada tasa de mutación:

- p53, gen supresor de tumores, está mutado en el 17% de liposarcomas pleiomórficos.
- NF1, gen supresor de tumores, sufre mutaciones puntuales o deleciones en el 10,5% de mixofibrosarcomas y 8% de liposarcomas pleiomórficos.
- PIK3CA está mutado en el 18% de liposarcomas mixoides o de célula redonda. Cuando se asocia a la activación de AKT tiene un pronóstico clínico malo.
- Liposarcomas desdiferenciados con mutaciones en CDK4 y YEATS4 muestran una alta proliferación celular.

El análisis de “arrays” de CGH y transcriptoma realizado por Gibault et al. en muestras de STS (Gibault et al., 2011) reveló también algunos genes de potencial interés:

- Rb está frecuentemente alterado en STS de cariotipo complejo; también puede llevar asociado a la pérdida del gen de la misma familia p130.
- PTEN está a menudo delecionado.
- Dkk1, inhibidor de la vía canónica de Wnt suele estar a menudo regulado positivamente en STS.
- Las vías de señalización aguas debajo de Wnt y PTEN también suelen estar alteradas en STS de cariotipo complejo.

También se han descrito STS que presentan translocaciones cromosómicas específicas como FUS-CHOP en liposarcoma mixoide (MLP), PAX3-FKHR o PAX7-FKHR en rhabdomyosarcoma alveolar o SS18-SSX genes en sarcoma sinovial.

En conclusión, las alteraciones en genes supresores de tumores y moléculas de adhesión y la sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores, son muy frecuentes en STS.

IV.2 Tumores de hueso primario

Los sarcomas de hueso suponen un 0,2% de las neoplasias humanas, lo que significa un décimo de la incidencia de los STS (Dorfman and Czerniak, 1995; Mack, 1995). Dentro de este tipo de tumores óseos, los osteosarcomas son los más comunes seguidos del sarcoma de Ewing e histiocitoma fibroso maligno. La frecuencia específica de edad así como la tasa de incidencia de los sarcomas de hueso tiene una distribución claramente bimodal. El primer pico bien definido ocurre en torno a la segunda década de vida, mientras que la segunda ocurre en pacientes mayores de 60 años. El riesgo de sufrir sarcomas a los 20 años es muy parecido al de desarrollarlo a los 60 años. Este patrón bimodal de tasa de incidencia es claramente diferente al de los STS, es los cuales la incidencia aumenta con la edad.

IV.2.1 Tipos de tumor y localización

Los sarcomas óseos comprenden también un gran número subtipos de tumores: existen tumores de cartílago, como el condroblastoma, el fibroma condromixoide o el condrosarcoma; óseos, como el osteoblastoma o el osteosarcoma, con todas sus variantes; tumores fibrogénicos o fibrohistocísticos de hueso; tumores neuroectodermales primitivos o sarcoma de Ewing, de célula gigante, notocnrales, neurales, varculares, misceláneos y hematopoyéticos, entre otros.

Los Osteosarcomas son los tumores de hueso más frecuentes. Ocurren mayoritariamente en niños y pacientes jóvenes, menores de 20 años, en pacientes con el esqueleto todavía inmaduro. Aparecen en los huesos largos de las extremidades en el 80% de los casos, siendo muy frecuente su desarrollo en la región de la rodilla. En un reducido número de casos aparecen distribuidos por otras partes del esqueleto: en los huesos craneofaciales, en la pelvis o en la columna vertebral. En pacientes mayores de cincuenta años, sólo en el 50% de los casos los tumores aparecen en huesos de las extremidades, un tercio menos que en pacientes jóvenes. Y en el 20% de los casos se desarrollan en la pelvis o en los huesos craneoancefálicos.

Los Condrosarcomas tienen tasas de incidencia y frecuencias específicas de edad, aumentando progresivamente hasta los de 75 años, existiendo pequeñas diferencias entre géneros y razas. Mas del 50% de los estos tumores aparecen en los huesos largos de las extremidades, siendo también relativamente frecuentes la pelvis y las costillas o muy rara mente, aunque de alto riesgo, el esternón.

El sarcoma de Ewing tiene una epidemiología parecida al osteosarcoma, pero tiende a aparecer en la diáfisis, con preferencia sobre la metáfisis, de los huesos largos. La mayor frecuencia relativa ocurre en torno a los veinte años; a partir de esta edad decrece, aunque podemos encontrar casos de esta enfermedad en todos los grupos de edad. Parece que este tipo de neoplasia ocurre casi exclusivamente en población blanca.

IV.2.2 Etiología

Para la mayoría de los tumores de hueso no se ha establecido una etiología específica. Se han identificado algunos factores de predisposición a la enfermedad como:

- Radiación; algunos tumores de hueso pueden ser consecuencia del tratamiento con radioterapia del tumor primario. Se desarrollan en el área que ha recibido la radiación y en la mayoría de los casos se desarrollan osteosarcomas que suelen aparecer después de un periodo de latencia largo, de al menos 3 años (Fuchs and Pritchard, 2002; Huvos et al., 1985; Mark et al., 1994; Tucker et al., 1987; Weatherby et al., 1981).
- Quimioterapia; la administración de algunos agentes alquilantes y antraciclinas parecen influir en el desarrollo de neoplasias secundarias malignas, principalmente osteosarcomas.
- Inflamación crónica; se ha conseguido reproducir la sarcomagénesis en un modelo experimental donde se produjo una inflamación continuada mediante la inyección del virus *Rous Sarcoma* en heridas del animal. No obstante, parece que en pacientes la inflamación por sí sola no es la causa de la neoplasia.
- Base genética familiar heredable; Pacientes infantiles con Retinoblastoma familiar tienen mayor riesgo de sufrir osteosarcomas. El síndrome Li-Fraumeni, que resulta por la pérdida del gen p53, se relaciona con el aumento del riesgo de sufrir sarcomas óseos, entre otros tipos de cáncer. Además, una historia clínica de cáncer de mama o melanoma en la línea materna, se considera un factor de riesgo.
- Por último, estos tumores pueden aparecer como consecuencia de tumores benignos u otras enfermedades ya existentes en el paciente: los osteosarcomas pueden aparecer asociados a la enfermedad de Paget y raramente asociados a tumores de hueso benignos, como por ejemplo la displasia fibrosa; los condrosarcomas se pueden desarrollar en la parte cartilaginosa de un osteocondroma o en pacientes con encondromatosis.

IV.2.3 Alteraciones genéticas más frecuentes en tumores de hueso primario.

Los osteosarcomas se caracterizan por una enorme inestabilidad genómica que lleva a una complejidad genética tal, que hace difícil identificar a que insulto genético se debe aparición del clon transformante, responsable de la formación del tumor. La anuploidización, determinadas traslocaciones o la pérdida homocigótica de algunos genes, contribuye a la transformación final. Lo que se conoce hasta ahora de genes involucrados tanto en la inestabilidad genética, como en la transformación, se comentará en la sección específica de osteosarcomas.

Por otra parte, el sarcoma de Ewing está asociado a la presencia de translocaciones recíprocas que involucran al gen EWS localizado en el cromosoma 22 y a un miembro de la familia de genes de transcripción ETS, fundamentalmente FLI-1 o ERG. La translocación más común [t(11;22)(q24;q12)] genera la proteína de fusión EWS-FLI-1 que actúa como factor de transcripción aberrante favoreciendo el proceso tumorigénico.

IV.3 Clasificación de los sarcomas atendiendo a sus características genéticas

Atendiendo a las características genéticas de los sarcomas, se puede clasificar también en dos amplias categorías, una donde los cambios citogenéticos son alteraciones específicas, moleculares y genéticas. Este grupo está compuesto por sarcomas con traslocaciones recíprocas y mutaciones oncogénicas específicas, que tienen un cariotipo relativamente sencillo y suponen un 30% de todos los tumores mesenquimales. Este tipo de tumores está representado por el liposarcoma mixoide, el sarcoma sinovial, el rhabdomyosarcoma alveolar o el sarcoma de Ewing. El otro grupo, mayoritario, son los sarcomas de cariotipo

complejo, que no tienen un patrón citogenético definido. Los modelos de sarcoma generados en este trabajo, leiomioma y osteosarcoma, son de cariotipo complejo, sin ninguna alteración molecular específica, donde es típica una enorme inestabilidad cromosómica.

IV.3.1 Leiomyosarcoma

El Leiomioma es un tumor maligno compuesto por células con características de músculo liso. Existen tres tipos de leiomioma: el predominante es el proveniente de vasos sanguíneos, vena cava inferior y otras venas principales de las extremidades inferiores, siendo el 10% de ellos sarcomas de primordios de extremidades (Berlin et al., 1984; Kynaston et al., 1993; Leu and Makek, 1986; Varela-Duran et al., 1979); el segundo grupo significativo son sarcomas retroperitoneales incluido, el pélvico (Hashimoto et al., 1985; Rajani et al., 1999; Ranchod and Kempson, 1977; Shmookler and Lauer, 1983; Wile et al., 1981); y el tercer tipo es más heterogéneo, suelen ser sarcomas de extremidades inferiores que se desarrollan a partir de venas más pequeñas, aunque pueden producirse en cualquier otro tejido, como la dermis (Dahl and Angervall, 1974; Farshid et al., 2002; Hashimoto et al., 1986).

IV.3.1.a Incidencia

Este tipo de sarcoma suele producirse en todo tipo de pacientes, niños y adultos, siendo la frecuencia mayor en personas de edad avanzada (de Saint Aubain Somerhausen and Fletcher, 1999; Swanson et al., 1991). La incidencia según género depende la localización del tumor, en mujeres es más frecuente la aparición de leiomiomas de vena cava inferior y retroperitoneales, que en otros tejidos blandos.

IV.3.1.b Aspectos clínicos

IV.3.1.b.1 Diagnóstico

Esta lesión se presenta normalmente como una masa tumoral. Los estudios de imágenes solo ayudan a localizar esta masa y muestra la relación entre el tejido tumoral y las estructuras adyacentes. La masa carnosa presenta habitualmente zonas de hemorragias, necrosis, cambios císticos y suele estar bien delimitado, aunque puede haber zonas que infiltran tejidos contiguos. Los estudios histopatológicos son los más importantes en el diagnóstico de este tipo de sarcoma.

IV.3.1.b.2 Histopatología

Los cortes histológicos de estos tumores teñidos con H-E muestran un patrón de grupos de células elongadas que forman fascículos y que se disponen en los tres ejes del espacio intersectando entre ellos. La patología normalmente muestra una masa celular compacta, aunque pueden aparecer zonas fibrosas o mixoides de aspecto reticular, zonas de necrosis o hialinización, cuando se trata de tumores de gran tamaño, o cambios abruptos hacia zonas del tumor más pleiomórficas. Raramente se pueden encontrar zonas de inflamación (Merchant et al., 1995). Los núcleos de las células tumorales están frecuentemente hipercondensados y son característicamente alargados con extremos romos o acabados "en punta de cigarro". A menudo aparecen células en mitosis y mitosis atípicas. Los citoplasmas pueden variar de muy eosinofílicos a pálidos, conteniendo gran cantidad de

vacuolas, que se observan claramente en los cortes transversales de las células. También se pueden encontrar células con morfología epitelioide y células gigantes multinucleadas (Mentzel et al., 1994). Ocasionalmente estos sarcomas pueden contener áreas poco diferenciadas no específicas de apariencia pleiomórfica (Oda et al., 2001).

Los leiomiomas, en general, son positivos para actina de músculo liso (SMA), desmina y caldesmón, aunque ninguno de estos marcadores es específico de tejido de músculo liso, por ello se consideran leiomioma cuando son positivos para al menos dos de los tres marcadores mencionados. También pueden ser positivos, al menos localizadamente, para queratina, EMA, CD34 y s-100. El diagnóstico de este tipo de sarcoma no debería basarse en el inmunofenotipo sin estar acompañado de las características morfológicas.

IV.3.1.c Alteraciones genéticas más frecuentes

IV.3.1.c.1 Alteraciones citogenéticas

Este tipo de sarcoma muestra, en la mayoría de los casos, un cariotipo complejo aneuploide donde no se encuentran aberraciones consistentes. Existen pérdidas cromosómicas que implican frecuentemente las regiones 3p21-23, 8p21-pter, 13q12-13, 13q32-qter. Mediante técnicas de CGH se confirmaron pérdidas de material genético en los cromosomas 1q, 2, 4q, 9p, 10, 11q, 13q y 16. Las ganancias cromosómicas suelen darse en la región 1q21-31; por CGH se encontraron ganancias en los cromosomas 1, 15, 17, 19, 20, 22 y X, y también zonas de amplificación en las regiones 1q21, 5p14-pter, 12q13-15, 13q31, 17p11 y 20q13 (Mandahl et al., 2000; Wang et al., 2001). También se ha relacionado la ganancia de determinadas regiones con el tamaño del tumor: 16p y 17p ocurre tumores más pequeños, y 6q y 8q se relaciona con tumores de mayor tamaño (El-Rifai et al., 1998).

IV.3.1.c.2 Alteraciones moleculares

Se han encontrado algunos cambios significativos en la expresión de determinados genes:

- La pérdida de Rb u otros genes de la vía Rb-Ciclina D están implicados en leiomioma, así como la sobreexpresión de p16 ó CDKN2A, CCND1 y CCND3 (Dei Tos et al., 1996).
- También se encuentran cambios en la expresión de p53 y MDM2, y la desregulación de estos genes parece correlacionar con un pronóstico pobre de la enfermedad (Patterson et al., 1994).
- En las regiones donde suelen darse las amplificaciones mapean genes candidatos como MDM2, GLI, CD4, SAS, FLF, PRUNE y la región crítica del cromosoma 17 (17p11.2) que al deleccionarse produce el síndrome de Smith-Magenis (Elkahloun et al., 1996; Florenes et al., 1994; Forus et al., 1998; Forus et al., 2001; Forus et al., 1993; Otano-Joos et al., 2000).

IV.3.2 Osteosarcoma

El Osteosarcoma convencional es un tumor intramedular maligno de alto grado, con células neoplásicas que producen sustancia osteoide. Dentro de este grupo de sarcomas existen una gran variedad de subtipos dependiendo del tipo de tejido intracelular que produzcan: osteoide, cartílago o tejido fibroso. Según esto podemos encontrar

osteosarcomas no específicos, condroblásticos, fibrobásticos y centrales, que a su vez pueden ser convencionales centrales, intramedulares e intracorticales.

IV.3.2.a Incidencia

Los osteosarcomas son el tipo de sarcoma de hueso primario más frecuente. La incidencia estimada es de 4-5 casos por millón de habitantes. Representa aproximadamente el 20% de los tumores óseos y un 5% de todos los tumores pediátricos. De hecho, es la quinta enfermedad más común en individuos comprendidos entre 15 y 19 años, y la segunda enfermedad más común en jóvenes, después del linfoma. Se sabe que existe una incidencia ligeramente superior de esta enfermedad en adolescentes africanos-americanos (Marina et al., 2004; Sandberg and Bridge, 2003). Aunque esta enfermedad tiene una incidencia general muy baja, debido al tipo de paciente al que principalmente afecta, a su propia agresividad y la falta de tratamientos adecuados que proporcionen una mayor supervivencia libre de enfermedad, es relevante su estudio.

IV.3.2.b Aspectos clínicos

Las características clínicas de este tipo de tumor son muy poco específicas, por ello en la mayoría de los pacientes no se diagnostica en las fases iniciales de desarrollo de la enfermedad. Suelen descubrirse como consecuencia de un traumatismo o por roturas espontáneas en el hueso, en los casos más extremo. Los síntomas más comunes son el dolor intenso y la inflamación generados en la zona de desarrollo del tumor, acompañados de fiebre, pérdida de peso y agotamiento (Marina et al., 2004).

IV.3.2.b.1 Diagnóstico

El diagnóstico se realiza mediante un estudio radiológico y se confirma mediante una biopsia. Mediante rayos X convencionales se determina la localización, el tamaño, el tipo de matriz y la reacción perióstica de la lesión; todos estos sencillos parámetros dan una primera idea de la malignidad, límites y subtipo de tumor. Seguidamente, para determinar el estadio del mismo, se utiliza la tomografía computerizada y la resonancia magnética. Posteriormente, se toma una muestra del tejido tumoral y se realiza un estudio histopatológico del tumor. En este tipo de sarcomas la forma en que se tome la biopsia es fundamental para el tratamiento posterior, ya que una mala escisión puede diseminar las células transformadas hacia tejidos sanos.

IV.3.2.b.2 Histopatología

El osteosarcoma convencional, de forma simplificada, es un tumor altamente anaplásico y con escasa diferenciación celular. Suele estar compuesto de células elongadas, en aunque también podemos encontrar en él células tipo epitelioides, plasmacitoides, ovoides, células pequeñas redondeadas, células claras y células gigantes mono- o multinucleadas. En la mayoría de los casos existe una compleja mezcla de al menos 2 tipos celulares.

En los cortes se puede observar un amplio espectro de características histológicas, pero el diagnóstico viene determinado por la adecuada identificación de la producción celular de sustancia osteoide o incluso zonas de hueso maduro de neoformación alrededor de las células del tumor (Gorlick et al., 2003). El osteoide es un material intracelular amorfo, denso, eosinófilo y refringente. A diferencia con otras matrices extracelulares compuestas

de colágeno, la matriz osteoide no presenta estructura fibrilar. Las células neoplásicas quedan atrapadas en la matriz osteoide que producen, como pequeñas células picnóticas, mínimamente atípicas, con una condensación nuclear del material genético propia de células que acaban muriendo.

Este tipo de tumores suele metastatizar en los pulmones y las metástasis tienden a mimetizar el fenotipo del tumor primario.

IV.3.2.b.3 Cirugía

Tras el diagnóstico, el tipo de cirugía que se emplee dependerá del grado histológico del tumor, la localización y las metástasis. Determinar el margen de seguridad de la resección es complicado a la vez que imprescindible para asegurar la curación del paciente; se busca un equilibrio entre la funcionalidad de la extremidad o articulación y un alto nivel de seguridad de no recaída. Existen tres tipos de cirugía:

- Intraósea o intracompartimental, para tumores benignos y operables.
- Extracompartimental, cuando el tumor supera una barrera que lo tenía encapsulado, por tanto hay que buscar nuevas barreras naturales para la resección. Se usa en tumores benignos pero altamente agresivos o malignos de grado bajo.
- Resección amplia o radical, en ella se elimina el compartimento completo donde se encuentra alojado el tumor. Los casos más extremos implica en la amputación de un miembro completo.

IV.3.2.c Alteraciones genéticas más frecuentes

Como se comentaba anteriormente, los osteosarcomas de alto grado se caracterizan por una extensiva inestabilidad genética que lleva a la aparición de un cariotipo enormemente complejo. La mayoría de los osteosarcomas parecen no presentar patrones familiares, aunque si se asocian con ciertas predisposiciones genéticas (Hansen, 2002; Hayden and Hoang, 2006; Helman and Meltzer, 2003; Kansara and Thomas, 2007; Marina et al., 2004; Sandberg and Bridge, 2003; Wang, 2005; Whelan, 1997). Para estudiar las aberraciones genéticas involucradas en este tipo de cáncer, se han desarrollado diversos modelos murinos basados en sistemas de células madre mesenquimales que reproducen el osteosarcoma. Estudios funcionales y análisis del fenotipo también han contribuido a la identificación de moléculas implicadas en osteosarcomagénesis. Hasta ahora no se han identificado alteraciones genéticas y epigenéticas consenso en los osteosarcomas aunque existen varios genes y rutas de señalización que parecen jugar un papel en su etiología y/o podría ayudar en su diagnóstico:

- La pérdida homocigótica de CDKN2/p16 parece mediar en la transformación maligna de las células; la expresión de la proteína se usó como marcador sensible de pronóstico en 88 pacientes con osteosarcoma (Mohseny et al., 2009).
- GLI2, factor de transcripción clave de la ruta de señalización Hedgehog, está sobreexpresado en muestras de osteosarcoma humano. La eliminación o "knockdown" completo del gen previene el crecimiento del osteosarcoma y evita el crecimiento independiente de anclaje, una de las propiedades de la transformación celular. Por el contrario, la sobreexpresión de este factor en MSCs

lleva al aumento de proliferación y la aceleración del ciclo celular de estas células (Nagao et al., 2011).

- En los osteosarcomas la expresión de micro-ARNs (miRNAs) se encuentra alterada, modificándose, por tanto, la regulación de los genes diana de estos miRNA y modificando finalmente el patrón de expresión en el Osteosarcoma. En un estudio llevado a cabo comparando la expresión de 723 miRNAs en 7 osteosarcomas, 23 de los miRNAs diferencialmente expresados estaban íntimamente relacionados entre sí, situados en la citobanda 14q23. Los genes dianas de estos miRNA están relacionados con vías de señalización importantes en osteosarcoma como Notch, Ras/p21, MAPK, Wnt y Jun/FOS (Maire et al., 2011)
- USP1, es una enzima deubiquitinizante e inhibidor de proteínas de unión a ADN que se encuentra sobreexpresado en un subgrupo de osteosarcomas. Durante la diferenciación de los tejidos, ocurre la ubiquitinización de los inhibidores de proteínas de unión a ADN, seguida de una degradación proteolítica de los mismos. Sin embargo, la desubiquitinización constitutiva de dichos inhibidores previene la diferenciación y lleva al mantenimiento del estadio de indiferenciación, lo que favorece el desarrollo del cáncer y potencia su agresividad. La sobreexpresión de USP1 en MSCs apoya los datos anteriores, estabiliza los inhibidores de proteínas de unión a ADN, inhibe la diferenciación osteoblástica y aumenta la proliferación celular (Williams et al., 2011).
- MAGEA, familia A del antígeno de melanoma, tiene su expresión aumentada en algunos osteosarcomas; se usa como factor predictivo de metástasis y supervivencia, pasando de una tasa de supervivencia del 80% cuando no se expresa al 39,6% únicamente, cuando se detecta por inmunohistoquímica. También son factores predictivos el miembro 2 de la familia de genes asociado a condrosarcoma (CSAG2) y el antígeno preferencialmente expresado en melanomas (PRAME).
- La participación de p53 y Rb en sarcomas se comenta en sus respectivos apartados específicos.

IV.4 Tratamiento

El tratamiento de los sarcomas no ha evolucionado en los últimos 20 años. En general, sarcomas con células elongadas como primera terapia se elimina el tumor primario mediante una operación quirúrgica acompañado de radioterapia. Para los sarcomas de célula pequeña redondeada, con morfología epitelioides, como por ejemplo las del sarcoma de Ewing, se usa la quimioterapia como agente adyuvante (Antonescu, 2011; Young et al., 2011). La enorme diversidad en los tipos de sarcomas mencionada anteriormente, podría servir como incentivo para intentar llegar a alcanzar tratamientos personalizados para el cáncer. Por ejemplo, con técnicas de secuenciación se podrían generar perfiles genómicos de sarcomas con los que comparar las muestras clínicas de pacientes, (Macconnaill et al., 2011; Tschöp et al., 2007). Actualmente, los sarcomas se clasifican por el tipo de anomalía que da lugar a la patogénesis, sin embargo la mayoría de ellos se siguen tratando con modalidades terapéuticas tradicionales. El desafío desarrollar terapias con nuevas dianas terapéuticas accesibles.

MATERIAL Y MÉTODOS

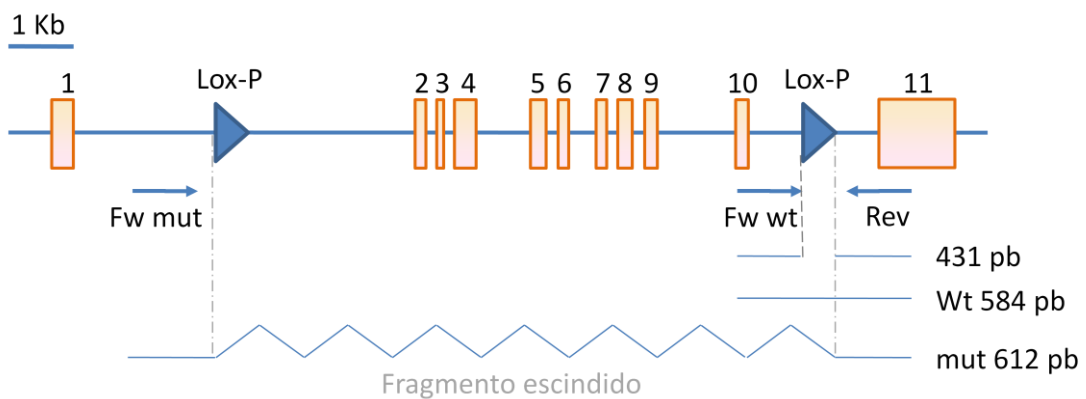
MATERIALES Y MÉTODOS

I. Establecimiento de los cultivos primarios

I.1 Cepas murinas

Los cultivos primarios de células madre mesenquimales (MSC) se obtuvieron a partir de ratones modificados genéticamente cedidos por el Dr. Jesús Paramio del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) de Madrid. Estos ratones tienen un fondo genético FVB y portan los dos alelos de Rb, p53 o ambos genes, flanqueados por secuencias loxP (Marino et al., 2000; Ruiz et al., 2004). Figura 9

A. Gen p53



B. Gen Rb

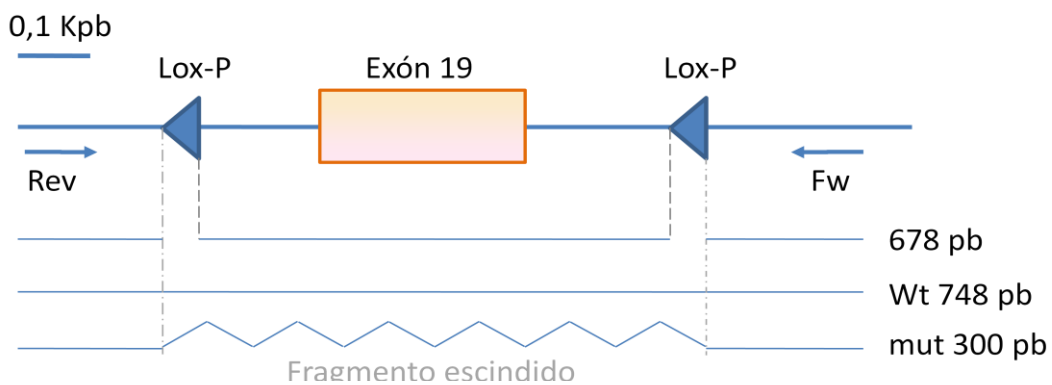


Figura 9. Estructura de los genes p53 y Rb

I.2 Extracción de las células madre mesenquimales del ratón.

I.2.1 Extracción de células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs)

Tras sacrificar el ratón se retiraron completamente la piel de las extremidades después de cortar los ligamentos y el tejido muscular. A continuación se separaron el fémur y la tibia y se introdujeron en PBS (Gibco) con 1% de Penicilina (100U/ml) y 1% de Estreptomicina (0,1mg/ml) (P/S). Para extraer la médula ósea del interior de los huesos, se cortaron los extremos de dichos huesos y ayudándose de una jeringa de 21G se extrajo el contenido medular del interior del hueso con medio DMEM con 1% de P/S. Las médulas obtenidas fueron disgregadas usando la propia jeringa hasta obtener una solución de células individuales que fueron lavadas dos veces con DMEM + 1% de P/S centrifugando a 400xg durante 5 minutos (min). Posteriormente, las células se sembraron a una densidad de $1-2 \times 10^5$ células/cm² con medio comercial específico de expansión de células mesenquimales murinas (mMSCs) (nº Cat# 05411, StemCell Technologies Inc).

I.2.2 Extracción de células madre mesenquimales de tejido adiposo (ASCs)

De los mismos ratones sacrificados, además de obtener las médulas óseas, se extrajo la grasa adherida a la piel que cubre el vientre, la que rodea el aparato reproductor interno y la que se localiza junto a los riñones y se recogió en PBS con 1% P/S. Este tejido adiposo se disgregó mecánicamente con ayuda de bisturí y tijeras y seguidamente se trataron los trozos resultantes con Colagenasa B (1mg/ml DMEM) (Roche, Basel Suiza) durante 2 horas (h) a 37°C, con agitación periódica. Una vez disgregado completamente el tejido, la solución de células se lavó dos veces con medio de cultivo completo, centrifugando a 400xg durante 5 min y se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/cm², con el mismo medio comercial de expansión de mMSCs.

I.3 Escisión de las regiones flanqueadas por secuencias lox-P mediante la enzima Cre-recombinasa

I.3.1 Producción de Adenovirus

Los Adenovirus que portan la enzima Cre-recombinasa (Ad-Cre) fueron cedidos por el Dr. Miguel Chillón del Departamento de Terapia Génica, del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica de la Universidad Autónoma de Barcelona (TEGEN-UAB). Son Adenovirus de serotipo 5, no replicativos y defectivos para E1-a y E1-b, y pueden replicarse en células de la línea de riñón embrionario humano 293 (obtenidas de la ATCC) donde expresan sus proteínas. La enzima Cre-recombinasa se encuentra bajo el promotor del citomegalovirus

(CMV). Estos virus fueron expandidos en nuestro laboratorio siguiendo el siguiente protocolo: se plaquearon células 293 a una confluencia del 40-50% y se infectaron con una suspensión viral de multiplicidad de infección 10 (MOI=10) durante 2 h a 37°C. Posteriormente, se retiró el medio de infección y se añadió medio DMEM Advanced con 3% de suero fetal bovino (SFB), 1% de P/S y 1% de Glutamax. Los adenovirus son secretados al medio de cultivo por las células 293 a medida que se producen en su interior. Tras 2 días de cultivo se pudo observar un claro efecto citopático debido a los adenovirus: las células se despegaron parcialmente del plástico y adquirieron una morfología típica multilobulada. En este punto, se recogió el medio de cultivo conteniendo las células que se despegaron fácilmente y se centrifugó a 400xg durante 5 min. El sobrenadante fue filtrado a través una malla de nylon de 0,45µm de diámetro de poro (BD Bioscience, San José, CA) y congelado a -80°C. El pellet fue resuspendido de nuevo en medio sin suero, congelado a -80°C y descongelado a 37°C, 3 veces seguidas, para romper las membranas celulares y liberar las partículas virales de su interior. Después se centrifugó a 400xg durante 5 min, para eliminar los restos celulares, se filtró por una malla de nylon de 0,45µm y el sobrenadante se congeló a -80°C. No fue necesario concentrar los virus, el sobrenadante obtenido tenía una concentración de virus suficientemente alta como para infectar las MSCs con alta eficiencia, como indicamos a continuación.

1.3.2 Infección de los cultivos con Adenovirus AdCre

Se sembraron las MSCs para obtener una confluencia de entre el 50 y 70% y se incubaron con los sobrenadantes virales previamente preparados durante 2 h a 37°C. Después se eliminaron los virus, se añadió medio de cultivo con 3% de SFB y se dejó a las células recuperarse durante la noche. Tras el proceso de infección, se generaron las MSCs mutantes para los genes deseados debido a la acción de la recombinasa Cre que produjo la escisión de las secuencias flanqueadas por las regiones lox-P. Las células silvestres (wt) también fueron infectadas, a pesar de que no poseían ninguna secuencia lox-P, para que sufrieran el mismo proceso que las células de genotipos mutantes. Figura 2

1.4 Cultivo y mantenimiento de las células.

Las MSCs se mantuvieron a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Para el establecimiento de los cultivos primarios se utilizó un medio específico comercial de expansión (nº Cat# 05411, Stem Cell Technologies Inc). Después de tres pases las células se cultivaron en medio Advanced DMEM suplementado con 10% (v/v) SFB (lote especialmente seleccionado por su capacidad para promover la proliferación de los cultivos de mMSCs), inactivado previamente por calor (56°C durante 20 min), 1% P/S y 1% de Glutamax. Las células en cultivo forman una monocapa adherida a la superficie del frasco de cultivo. Cuando se alcanza el 70-80% de confluencia se subcultivan de la siguiente forma: se lavan

con PBS para eliminar los restos de suero del medio de cultivo. A continuación se añade una cantidad de Tripsina/EDTA (0,25% tripsina/0,002% EDTA; Gibco) suficiente para que cubra la superficie de las células y se incuba a 37°C, de 2 a 5 min, para permitir que las células se despeguen del plástico. Una vez que las células se levantan se añade medio con suero para neutralizar la actividad de la tripsina y se centrifugan a 300xg durante 5 min a temperatura ambiente (RT). Tras eliminar el sobrenadante, el pellet de células se resuspendió en medio de cultivo nuevo y se sembraron en un nuevo frasco aproximadamente 5.000 células/cm² después de determinar la concentración celular mediante contajes en una cámara de Neubauer.

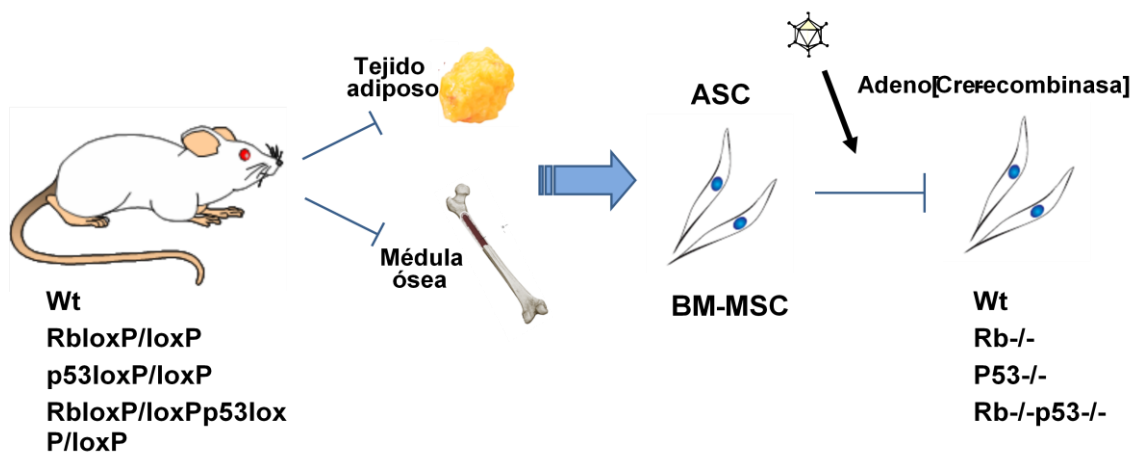


Figura 10. Esquema de generación de cultivos de MSCs con distintos genotipos

II. Caracterización de los cultivos MSCs

II.1 Morfología

Las MSCs son células de gran tamaño en forma de huso, adherentes a plástico y que presentan una gran cantidad de eucromatina nuclear y abundantes lisosomas en el citosol. Los distintos cultivos de MSCs fueron observados al microscopio óptico directamente para comprobar su morfología y reflejar los cambios observados durante el cultivo. Se tomaron fotos de las células con distintos genotipos, procedentes de distintos tejidos y en diferentes momentos de los cultivos. Figura 3

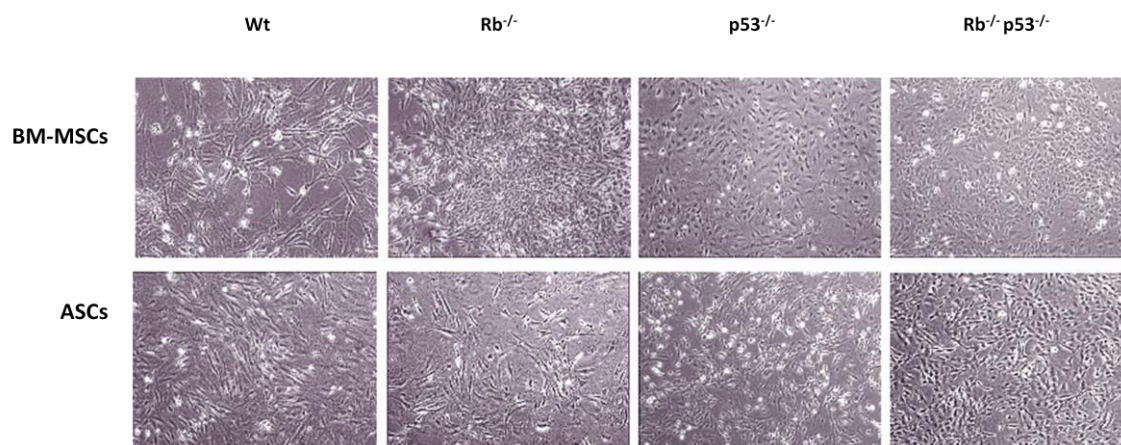


Figura 11. Morfología de cultivos mesenquimales

II.2 Análisis de ADN

II.2.1 Extracción de ADN genómico

La correcta escisión de los genes de interés, Rb y p53, fue chequeado por PCR convencional. El ADN total fue extraído con el kit DNeasy de Qiagen, siguiendo el protocolo recomendado en sus instrucciones. La cuantificación del ADN se realizó usando un NanoDrop (Thermo Scientific) leyendo la absorbancia a 260-280nm. Una unidad de absorbancia a 260nm corresponde a 50µg/ml de ADN.

II.2.2 PCR genómica

200ng de ADN de cada muestra fueron utilizados para esta PCR. La mezcla de reacción consistía en:

- Tampon de polimerasa 1x
- MgCl₂ 2,5mM
- dNTPs 0,2mM
- Oligonucleótidos 0,5µM
- 0,1 µM Taq polimerasa

Las condiciones fueron las siguientes: pre-desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de 29 ciclos en los que hay una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos (seg), un alineamiento (62°C para p53, 60°C para Rb y 67°C para β-actina) durante 30 seg y una extensión a 72°C durante 50 seg. Finalmente, se inactivó la polimerasa a 72°C durante 10 min. Para el gen p53 se diseñaron distintos pares de primers para detectar el gen wt y el mutado, ya que se escinde casi todo el gen, desde el exón 2 al 10, ambos incluidos. Por otra parte, para el gen Rb un mismo par de primers amplifica ambos genotipos, resultando

en fragmentos de distintos tamaños, ya que en este caso sólo se escinde el exón 19 (Figura 1). La expresión del gen β -actina se usó como normalizador. Los oligonucleótidos usados se describen en la Tabla 1.

Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa/TAE comercial (nº Cat# 161-0743, BioRad) al 1,5% y 1 μ g/ml de Bromuro de Etidio (nº Cat# E7637, Sigma). 15 μ l de producto de PCR se mezclaron con 1 μ l de buffer de carga 10x y se corrieron en el gel a 90 V durante 1 h aproximadamente. Los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad).

II.3 Análisis de ARN

II.3.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó con Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se levantaron con tripsina como se describen en el apartado I.4 y se lavaron una vez con PBS. Sobre un pellet de 1-5x10⁶ células, se añadió 1ml de Trizol y se pipeteó varias veces hasta su correcta homogeneización. Tras 5 min a RT, se añadieron 200 μ l de cloroformo-isoamílico (24:1), se mezcló en un agitador y se centrifugó a 16.000xg durante 15 min. La fase superior (fase acuosa) que contiene el ARN, se pasó a un tubo limpio y se le añadió 1ml de isopropanol, para iniciar la precipitación del ARN. A continuación se mezcló por inversión varias veces y se incubó 10 min a RT o varias horas a -80°C, tras lo cual se centrifugó de nuevo a 16.000xg. El ARN precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) en agua DEPC (nº Cat# AM9922, Ambion), se dejó secar a RT y se resuspendió en 30-50 μ l agua DEPC. La cuantificación del ARN se realizó en un NanoDrop leyendo la absorbancia a 260-280nm. Una unidad de absorbancia a 260nm corresponde a 40 μ g/ml de ARN.

II.3.2 Retrotranscripción

Para la reacción de retrotranscripción se usó el First strand cDNA synthesis kit (nº Cat# 27-9261-01, GE Healthcare). Se partió de 2 μ g de ARN total en un volumen de 8 μ l agua DEPC, que fueron desnaturalizados previamente mediante una incubación a 65°C durante 10 min. En este tiempo de incubación se preparó la pre-mezcla de reacción que contenía por muestra:

Pre-mezcla de reacción:

- 5 μ l First strand reaction mix
- 1 μ l de DTT
- 1 μ l de primers de secuencia aleatoria (random primers)

A esta pre-mezcla se añadieron los 8µl de ARN desnaturalizado y se incubaron durante 1 h a 37°C. Terminada la reacción, el ADN complementario (cDNA) resultante se diluyó 5 veces con H₂O miliQ.

II.3.3 PCR a tiempo real

Esta técnica se usó para analizar la expresión de genes del proceso de diferenciación osteogénica a partir de MSCs. Se estudiaron BMP4, osterix, osteocalcina y osteontina. Partimos de 2,5µl del c-DNA, previamente diluido, al que añadimos:

Mezcla de reacción:

- 0,2µM de cada uno de los primers
- 12,5µl del tampón comercial de PCR a tiempo real, 2x Brilliant III SYBR Green QPCR Master mix (el cual contiene SYBR Green, fluoróforo que se une al ADN de doble cadena, dNTPs con dUTP, tampón de reacción y ADN polimerasa; nº Cat# 600882-51, Agilent)
- 8,5µl de H₂O miliQ.

Todas las muestras se analizaron por triplicado. La expresión del gen β-actina se tomó como normalizador. Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo Mx3005P (Stratagene) usando las condiciones estándar: un primer paso de desnaturalización de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos con 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C, y un último paso de curva de disociación con 1 min a 95°C, 30 seg a 55°C y 30 seg a 95°C. Los oligonucleótidos usados se describen en la Tabla 1.

Los resultados fueron analizados con el software Mx3005P (Stratagene). El programa procesa el nivel de fluorescencia emitida por las muestras para generar un ciclo umbral de cada muestra (Ct), siendo éste el ciclo de la PCR en el cual se detecta un incremento de la fluorescencia por encima de la señal basal. La cuantificación del nivel de expresión relativo se realizó en tres pasos:

- 1.- Cuantificación de ΔCt para cada muestra, $\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \beta\text{-actina}$
- 2.- Cálculo del $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$, siendo el calibrador el control de la cinética, es decir, el valor con respecto al que queremos saber si nuestro gene problema tiene mayor o menor nivel de expresión; en nuestro caso MSCs indiferenciadas.
- 3.- Nivel de expresión del gen para cada muestra según: $2^{-\Delta \Delta Ct}$

En todos los casos se analizó la curva de disociación para comprobar que se amplificó el mensajero de nuestro gen, apareciendo siempre un único pico de disociación.

II.4 Análisis de proteínas

II.4.1 Extracción de Proteínas

Las células se levantaron con tripsina como se describió anteriormente (apartado I.4) y se lavaron una vez con PBS. Entre 5×10^5 y 2×10^6 células se resuspendieron en un volumen de entre 100 y 400 μ l de tampón RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,4, 1% NP40, 0,1% SDS, 150mM NaCl y 0,25% Na-deoxicholate), suplementado en el momento de ser usado con: un coctel de inhibidores de proteasas Complete (1x) (nº Cat# 11697498001, Roche), inhibidores de fosfatasa-2 y -3 (1x) (nº Cat# P5726 y # P0044, Sigma), PMSF (1mM) y β -Mercaptoetanol (0,3%), y se incubaron en hielo durante 15 min para homogenizar los lisados celulares y estabilizar las proteínas. A continuación se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C y se recogió el sobrenadante. Finalmente, la cantidad de proteína se cuantificó mediante un ensayo Bradford con Protein Assay Dye Reagent Concentrate (nº Cat# 500-0006, BioRad).

II.4.2 Electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa: Western blot

Se prepararon geles compuestos de una parte analítica inferior, al 10% y 12%, de acrilamida/bisacrilamida (37,5/1) y una parte de empaquetamiento superior al 4%, donde se cargaron 40 μ g de extractos celulares totales de cada muestra, previamente mezclados con el tampón de carga Laemmli Sample buffer 4x (nº Cat# 161-0737, BioRad) e incubadas a 99°C durante 5 min. Igualmente se cargó una calle con marcadores de pesos moleculares pre-teñidos (nº Cat# 161-0374, BioRad). La electroforesis se realizó usando el sistema mini-protean III (Bio-Rad) aplicando una intensidad de corriente de 20-25mA por gel durante aproximadamente 90 min.

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) utilizando un sistema de transferencia semi-seca Trans-Blot (Bio-Rad) con un tampón que contiene: Tris 48mM, glicina 39mM, metanol al 20% (v/v) y SDS 0,05%. La transferencia se realizó a una intensidad de corriente de 5mA/cm² durante 30 min. Posteriormente, para verificar la correcta transferencia de la proteína, las membranas se tiñeron con una solución de rojo de Ponceau (0,5%, p/v en ácido acético al 5%, v/v) y se lavaron varias veces con agua destilada para retirar el exceso de colorante.

II.4.3 Detección y revelado

El primer paso de la detección de proteínas es el bloqueo de la membrana, para evitar la aparición de señales inespecíficas. Para ello la membrana se incubó 1 h a RT en tampón TBS (20mM Tris-HCl pH 7.5 y 0,15M NaCl) con Tween 20 al 0,1% (v/v) y leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en agitación. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en TBS, Tween 20 al 0,1% (v/v) y leche desnatada en polvo al 5% (p/v), en

agitación toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se lavó la membrana tres veces con PBS en agitación durante 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h a RT. Usamos anticuerpos secundarios de ratón y conejo marcados con peroxidasa (Cell Signaling), que se diluyeron en TBS, Tween 20 al 0,1% (v/v) y leche desnatada en polvo al 3% (p/v). Terminada la incubación con el anticuerpo secundario se lavó la membrana tres veces en TBS con Tween 20 al 0,1%, durante 10 min. A continuación se procedió a revelar las proteínas inmuno-detectadas en la membrana utilizando el sistema ECL (BioRad), que se basa en la incubación de la membrana con el sustrato de la peroxidasa durante 5 min, y visualizando la imagen en un sistema de captación de imágenes (BioRad). Los anticuerpos utilizados se encuentran descritos en la Tabla 2.

II.5 Inmunofenotipado de las MSCs y separación celular por citometría de flujo

Al no existir un marcador único que defina las MSC, se usa una combinación de varios marcadores de superficie presentes y ausentes, aceptado por la comunidad científica (Dominici et al., 2006; Rodriguez et al., 2009)), que identifica estas células y excluye otras poblaciones. En nuestro caso el panel de anticuerpos monoclonales, conjugados directamente con un fluorocromo, consistió en: tres marcadores mesodérmicos que deben ser positivos, como Sca1-FITC, CD29-FITC y CD44-PE, y tres marcadores hematopoyéticos que deben ser negativos, como CD11b-PE, CD14-FITC y CD45-PE (Rodriguez et al., 2009). Como control negativo se usó un anticuerpo control del mismo isotipo marcado tanto con FITC como con PE. Las células se levantaron con tripsina, como se describió anteriormente (apartado I.4), y se lavaron con PBS. Aproximadamente se marcaron 2×10^5 células con cada anticuerpo diluido 1:25 en un volumen de 100 μ l incubando durante 15-20 min a RT en oscuridad (Tabla 3). Tras la incubación se lavaron las células dos veces con PBS y se resuspendieron en 300 μ l de PBS. Finalmente, se adquirieron y analizaron 20.000 células en un citómetro de flujo FACS Canto II usando el programa FACS Diva (BD Bioscience).

Para los experimentos de separación celular, aproximadamente 2×10^7 MSCs fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-Sca1 FITC, diluido 1:25 en un volumen de 400 μ l. Las fracciones de células Sca1⁺ y Sca1^{bajo/-} fueron purificadas usando un separador celular FACS Aria I (BD). Como control negativo se usó un anticuerpo control del mismo isotipo marcado con FITC. Las dos poblaciones de células separadas fueron inmediatamente inoculadas (2×10^5 células/ratón) subcutáneamente (s.c.) en ratones inmunodeficientes NOD/SCID IL2R $\gamma^{-/-}$, como se describe posteriormente en el apartado IV.2.1.

II.6 Ensayos funcionales de MSCs: Diferenciación

La capacidad de diferenciación de las MSCs hacia distintos tejidos mesodérmicos es una de las características funcionales que las define. En este caso, se hicieron diferenciaciones hacia dos tejidos de la capa mesodérmica: adiposo y óseo.

En ambos ensayos, las MSCs fueron plaqueadas a una densidad de 25.000 células/cm², y se dejaron crecer hasta que alcanzaron un nivel de confluencia del 100%. Tras esto, se lavaron con PBS, para eliminar los restos de suero del medio de proliferación, y se añadió un medio específico de diferenciación.

II.6.1 Diferenciación adipogénica

El medio de diferenciación adipogénica, consistía en dos medios comerciales que se alternaban en el cultivo durante el proceso de diferenciación. El primer medio, de inducción, constaba del medio basal (PT-3102B, Lonza) al que se le añadía insulina-h (recombinante), L-glutamina, MCGS, dexametasona, indometacina e IBMX (3-isobutilmetil-xantina) (PT-3004, Lonza). El segundo medio, de mantenimiento, constaba del medio basal (PT-3102A, Lonza) que se suplementaba con insulina-h (recombinante), L-glutamina, MCGS y GA-1000 (PT-4122, Lonza). Estas células se mantuvieron en cultivo durante 21 días, cambiándoles el medio cada 3 días, alternando medio de inducción y de mantenimiento. La diferenciación adipogénica se puede apreciar por la aparición de gotas de grasa en el citoplasma de la célula; cuanto más madura es la célula adipocítica, mayor es el tamaño de las gotas de grasa que se van desarrollando en su interior.

Para confirmar la aparición de las gotas de grasa en el citoplasma se usó el colorante Oil Red O (nº Cat# O0625, Sigma) que tiñe específicamente la grasa. Para ello, una vez terminada la diferenciación se fijaron las células con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 5-10 min a RT, se lavaron 2 veces con PBS y se le añadió la solución de trabajo de Oil Red O. Para preparar el Oil Red O se hace una solución de almacenaje que se compone de 300mg de polvo de Oil Red O en 100ml de isopropanol puro. La solución de trabajo se prepara mezclando tres partes de la solución de almacenamiento anterior con dos partes de agua destilada. Esta solución, que es estable durante 2 h, se deja reposar durante 10 min y se filtra para eliminar los depósitos formados, antes de añadirla. La tinción de la grasa con Oil Red O es prácticamente inmediata, de forma que después de 1 min de incubación, lavamos varias veces con agua hasta eliminar el exceso de colorante y observamos en el microscopio óptico las gotas de grasa teñidas de un color rojo intenso.

II.6.2 Diferenciación osteogénica

El medio específico de diferenciación osteogénica comercial usado fue: hMSC Osteogenic BulletKit (nº Cat# PT-3002, Lonza) que contiene medio basal de diferenciación al que se le adiciona dexametasona, L-glutamina, ascorbato, P/S, MCGS y β -glicerofosfato, preparado según las instrucciones del fabricante. Las células se mantuvieron en cultivo durante 15 días, cambiándoles el medio cada tres días. La diferenciación osteogénica se caracteriza por la secreción celular de una matriz extracelular en la cual se van acumulando depósitos de calcio.

Para detectar la aparición de estos depósitos y analizar el nivel de diferenciación de las MSCs hacia linaje osteogénico se usó el colorante Alizarin Red S (nº Cat# A5533, Sigma) que tiñe específicamente los depósitos de calcio que se acumulan en la matriz extracelular. Una vez finalizado el periodo de diferenciación, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 5-10 min, se lavaron dos veces con PBS y se les añadió la solución de trabajo de Alizarin Red. Esta solución se prepara disolviendo Alizarin al 2% (p/v) en agua destilada y ajustando el pH a 4,2 con $\text{NH}(\text{OH})_4$. La tinción de la matriz extracelular es muy rápida, de forma que después de una incubación de 5 min con la solución de trabajo, lavamos varias veces con agua hasta eliminar el exceso de colorante. En las células diferenciadas se observó al microscopio óptico la matriz extracelular teñida de color rojo por encima de la monocapa celular.

III. Homeostasis de los cultivos de células madre mesenquimales (MSCs)

III.1 Curva de crecimiento a largo plazo

Para estudiar la cinética de crecimiento de los distintos cultivos de MSCs se realizó una curva de crecimiento. Las distintas MSCs se contaron aproximadamente cada 4 días o cuando superaban el 90% de confluencia, durante 3 meses. Después de contar se replaquearon a una densidad de 5×10^3 células/cm². La duplicación de la población acumulada se calculó en cada pase de acuerdo con la fórmula: $X_f = X_i \times 2^n$, donde X_i es el número inicial de células sembrada, X_f es el número final de células contadas y n es el número de duplicaciones de la población.

$$X_f = X_i \times 2^n$$

$$2^n = X_f / X_i$$

$$n \times \log(2) = \log(X_f / X_i)$$

$$n = \log (X_f / X_i) / \log (2)$$

III.2 Análisis de cariotipo de bandas G

La estabilidad cromosómica de una célula consiste principalmente en el mantenimiento de un cariotipo normal, tanto numérica como estructuralmente. La forma más común y sencilla de estudiar el cariotipo celular es mediante técnicas de citogenética convencional o clásica, como el cariotipo de banda G. Esta técnica se basa en el estudio de los cromosomas en metafase que en nuestro caso se obtuvieron a partir de cultivos de MSCs con diferentes genotipos: wt, Rb^{-/-}, p53^{-/-} y p53^{-/-}Rb^{-/-}. Para ello se crecieron las células hasta alcanzar una densidad aproximada del 80% y seguidamente se trataron con colcemida (10µg/ml; Colcemid solution, nº Cat# 12-004-1D, Biological Industries) durante 3h en una estufa a 37°C. Esta droga produce la parada de las células en metafase. A continuación se lavaron las células con PBS, se levantaron con tripsina y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 8 ml de una solución hipotónica de KCl (0,075M) y se incubaron en un baño a 37°C durante 24 min. Tras centrifugar las células a 1000 rpm durante 10 min y eliminar el sobrenadante, se añadió a las células 6ml de una solución de fijación (Acético/Metanol 1:3) preparada en fresco. Después de una incubación de 30 min a 4°C, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Este paso de fijación se repitió cinco veces seguidas, dejando finalmente el pellet resuspendido en 1ml de fijador. Una vez que las células están adecuadamente fijadas se dejan caer 2 o 3 gotas de esta suspensión celular sobre un portaobjetos, previamente lavados con ácido acético al 60%, y se dejan secar a RT. Posteriormente, estos portaobjetos se incubaron durante 2-3 h a 50°C para envejecerlos y fijar el ADN al porta, y a continuación se realizó un tratamiento con tripsina de entre 20 seg y 1 min. Posteriormente, se tiñó con colorante Wright diluido (1ml de Wright, 1 ml de PBS y 8ml de agua destilada) 5 min. Finalmente, se lavó con abundante agua del grifo, se dejó secar a RT, quedando la preparación lista para observar al microscopio óptico. Con esta técnica se consigue un patrón de bandas característico de cada par cromosómico y por tanto permite su identificación. Las metafases fueron analizadas por un citogenetista profesional para identificar alteraciones numéricas y estructurales.

III.3 Análisis del ciclo celular

El análisis del estado replicativo de una población celular se puede llevar a cabo marcando las células con compuestos fluorescentes como el ioduro de propidio (IP), capaces de intercalarse en el ADN. De esta forma es posible evaluar la cantidad de ADN de las distintas subpoblaciones por citometría de flujo. Para llevar a cabo estos ensayos las células se sembraron en frascos de cultivo a una densidad de 5×10^5 células/cm². Cuando

las células alcanzaron una confluencia en torno al 80%, se levantaron con tripsina, se lavaron con PBS y se fijaron añadiendo etanol al 70% (v/v) enfriado a -20°C, gota a gota y en agitación. Las células fijadas se almacenaron a -20°C entre 1 y 7 días, antes de proceder a su análisis. Para el análisis se eliminó el etanol de las células, se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con 400µl de solución de yoduro de propidio, que contiene 50µg IP/ml y 100µg RNAsa A/ml en PBS. El porcentaje de células en las distintas fases del ciclo se cuantificó midiendo la fluorescencia del IP por citometría de flujo en un FACS Canto II (BD) y analizando los datos con los programas informáticos WinMDI 2.9 y ModFit 3.0.

III.4 Incorporación de bromo-desoxiuridina

Las células se sembraron en frascos de cultivo a una densidad de 5×10^5 células/cm². Cuando alcanzaron una confluencia del 80%, se lavaron con PBS y se añadió medio nuevo con Bromodesoxiuridina (BrdU), 10µM, durante 30 min. El BrdU es un nucleótido modificado, análogo de la timidina, que se incorpora al ADN únicamente cuando las células se encuentran en la fase de síntesis (fase S) del ciclo celular. Tras este tratamiento se lavaron las células con PBS, se levantaron con tripsina y se fijaron con etanol al 70%, gota a gota, en agitación. Las células fijadas se almacenaron a -20 °C entre 1 y 7 días antes de proceder a su análisis. Para el análisis, se eliminó el etanol de las células y se lavaron tres veces con PBS antes de incubarlo con HCl 2M durante 30 min a RT, para despurinizar el ADN y facilitar el posterior acceso del anticuerpo. Las células se lavaron dos veces más con PBS y una última vez con PBS-BSA-tween (PBS con 0,1% BSA y 0,2% Tween 20), con el fin de eliminar completamente los restos de HCl.

La detección de BrdU se realizó incubando las células con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado con Alexa fluor 647 (nº Cat# 560209, BD Pharmingen), diluido 1:5, durante 30 min a RT en oscuridad. Tras el marcaje se lavaron las células dos veces con PBS y por último, se incuban con 400µl de solución de IP (5µg/ml IP y 100µg RNAsa A en PBS) durante 15 min a 4°C. El porcentaje de células en las distintas fases del ciclo se cuantificó midiendo la señal del BrdU y el IP por citometría de flujo en un FACS Canto II (BD) y analizando los datos con el programa informático WinMDI 2.9.

IV. Ensayos tumorogénicos con MSCs

IV.1 Ensayos *in vitro*: Crecimiento celular independiente de anclaje

La transformación neoplásica de las células ocurre debido a una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que lleva a que las células sean capaces de proliferar independientemente de señales externas e internas requeridas para la división celular. El crecimiento independiente de anclaje es una de las características de la transformación

celular, y es considerado el ensayo *in vitro* más apropiado para demostrar la transformación maligna de las células. Para analizar esta propiedad realizamos un ensayo de formación de colonias en medio semisólido de agar con el kit CytoSelect™ Cell Transformation (nº Cat# CBA-135, Cell Biolabs, Inc.). Los ensayos se hicieron en placas de 48 pocillos partiendo de 15.000 células/pocillo, haciendo triplicados de cada muestra.

En primer lugar se preparó una capa de matriz agar en la base del pocillo. Para ello calentamos la solución 10x de matriz agar a 90°C durante 30 min y después se mantuvo a 37°C para que no solidificase. Por otro lado calentamos medio DMEM (2x) con 20% de SFB a 37°C durante otros 30 min. Transcurrido este tiempo se mezcló por cada pocillo de la placa los siguientes reactivos, en ese orden, para un volumen final de 100µl:

50 µl DMEM (2x)
40 µl H₂O
10 µl Matriz agar (10X)

Esta mezcla se dejó solidificar a 4°C durante 30 min. Seguidamente se volvió a atemperar la placa a RT durante otros 30 min.

A continuación, se añadió la suspensión de células embebidas en la matriz de agar sobre la base anterior. Para ello mezclamos por cada pocillo de la placa los siguientes reactivos, en ese orden, para un volumen final de 150µl:

70µl DMEM (2x)
55µl Diluyente
15µl Matriz agar (10X)
10µl suspensión celular (15.000 células)

Seguidamente homogeneizamos adecuadamente la mezcla, la incubamos durante 5 min a RT y la pipeteamos inmediatamente en el pocillo, sobre la capa de agar anterior. A continuación se puso la placa a 4°C durante 15 min para permitir la solidificación y luego se colocó en el incubador a 37°C y 5% CO₂, donde se mantuvo en cultivo durante 10 días. Tras este periodo se contaron las colonias obtenidas por pocillo en el microscopio óptico.

IV.2 Ensayos *in vivo*: Inoculación en ratones inmunodeficientes

Para estos experimentos se usaron ratones no obesos diabéticos/severamente inmunodeficientes Cg-Prkdc^{scid} IL2Rg^{tmWjl}/SzJ (NOD/SCID IL2Rγ^{-/-}) adquiridos de Jackson Laboratories (<http://jaxmice.jax.org>; Bar Harbor, ME). Todos los ratones fueron mantenidos

bajo condiciones específicas libres de patógenos, alimentados en condiciones *ad libitum*, de acuerdo con las pautas establecidas para experimentación con animales. Animales de entre 8 y 12 semanas de edad fueron inoculados de forma subcutánea (s.c.), intra-hueso (i.b.) o en el periósteo (p.). Los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 1cm^3 o, en caso de no presentar ningún tipo de lesión, tras de 6 meses desde su inoculación. La latencia de aparición de los tumores así como el peso de los mismos fueron registrados y analizados.

IV.2.1 Inoculación subcutánea (s.c.)

Se inyectaron 5×10^6 células por ratón diluidas en 200 μl de PBS con 1% P/S. Estas células fueron filtradas a través de un filtro de nylon de 70 μm (BD), justo antes de ser inyectadas, ya que las MSCs tienden a aglutinarse entre ellas cuando hay un gran número de células en un volumen pequeño.

Los ratones fueron inoculados subcutáneamente en flanco. Para ello, en primer lugar se cebó una aguja de 25G unida a una jeringuilla de 1ml con PBS 1x estéril, a continuación se cargaron los 200 μl de solución de células. Se depositó el ratón sobre la rejilla, permitiéndole que se agarre a ella con las patas delanteras y se levantó la piel de la espalda con los dedos índice y pulgar en la región intra-escapular. Se insertó la aguja en el flanco, en la base de la zona de piel que estamos sujetando, manteniendo la aguja paralela al cuerpo del ratón para evitar inocular en capas inferiores a la piel. Se inyectó el volumen de muestra a una velocidad moderada y se presionó la piel en la zona de la inyección tras retirar la aguja, para evitar que el fluido salga por el punto de la piel perforada. Para este tipo de inyección no fue necesario ningún tipo de anestesia ni analgesia.

IV.2.2 Inoculación intratibia (i.b.)

Para este tipo de inoculación se inyectaron $2,5 \times 10^5$ células, previamente filtradas, por tibia de ratón en un volumen de 20 μl de PBS con 1% P/S. Una vez anestesiado (Isoflurano 2,5% 0,8L/min O_2) se coloca al ratón en posición *decubito supino* y se desinfecta la extremidad a inocular con alcohol al 70%. A continuación se flexionó la rodilla en un ángulo aproximado de 90° sujetando la tibia fuertemente con los dedos pulgar e índice. Posteriormente se cebó una aguja de 25G unida a una jeringuilla de 1 ml con PBS 1x estéril. Se colocó la aguja sobre la rodilla con el bisel hacia arriba de manera que descansa sobre el extremo más distal del fémur (patella). En este momento se giró la aguja en ambos sentidos presionando a la vez, de manera que la aguja fuera penetrando por la cabeza de la tibia. Una vez perforada, se retiró la aguja y se realizó la inoculación de las células con una aguja de 27G accediendo al interior de la tibia (cresta) a través de la apertura realizada anteriormente. La pauta analgésica consistió en tres dosis de Buprenorfina:Carprofeno

(0,1:5mg/kg) cada 24h aplicando la primera dosis inmediatamente después de la inducción de la anestesia, antes de iniciar el procedimiento de inoculación.

VI.2.3 Inoculación periosteal (p.)

En este caso se inocularon se inocularon 10^6 células por ratón, resuspendidas en 100 μ l de PBS. Los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de Xilanciano (Rompun, Bayer) y ketamina (Imalgene 1000 1:8, Merial), 1:1. Se desinfectó la extremidad con alcohol al 70% y se inoculó la solución de células, previamente filtrada. La aguja de 26G se insertó en la pata bajo la piel, desde la parte proximal a la distal de la misma, hasta alcanzar la diáfisis y seguidamente la cresta de la tibia. En esa posición, se arañó la superficie del hueso con la aguja y las células se depositaron entonces en el espacio intra-periosteal. Para este tipo de inyección no fue necesaria ningún tipo de analgesia.

VI.2.4 Implantes de cerámica: preparación e implantación

Para cada implante se utilizaron 40mg de polvo de hidroxiapatite/fosfato tricálcico (HA/TCP) (Biomatlante) y 10^6 células. En primer lugar se lavó este polvo de cerámica con 1 ml de medio de cultivo, se centrifugó a 300xg durante 5 min y se eliminó el sobrenadante, tras lo cual se mezcló con las células resuspendidas en un volumen de 1ml de medio de cultivo. La mezcla se centrifugó de nuevo a 300xg durante 5 min para obtener una adherencia homogénea de las células a la cerámica y estos compuestos de MSCs/cerámica se mantuvieron en cultivo durante la noche. A la mañana siguiente el medio fue eliminado cuidadosamente y se añadió 35 μ l de medio fresco, al que se le adicionó BMP-2 (1 μ g/ μ l medio) cuando fue requerido, seguido de la incorporación un pegamento de fibrina compuesto por 30 μ l de trombina (reconstituida en una solución de CaCl₂ al 2%, Sigma) y 30 μ l de fibrinógeno (reconstituido en agua, Sigma), para darle mayor estabilidad a la estructura. Finalmente, este compuesto se dejó solidificar durante 30 min en condiciones de cultivo.

Para la implantación s.c. de esta estructura, los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de Xilanciano (Rompun, Bayer) y ketamina (Imalgene 1000, Merial) y, una vez dormidos, se afeitó y esterilizó el área de implantación. Seguidamente se hizo una incisión dorsal en la piel y se fabricó un bolsillo bajo el tejido cutáneo para insertar los implantes de cerámica. Cuando las estructuras estuvieron establemente posicionadas la herida fue suturada.

IV.2.5 Establecimiento de líneas celulares tumorales

Tras sacrificar los ratones se extrajeron los tumores y se mantuvieron en PBS con 1% P/S hasta su disección.

Para derivar la línea celular del tumor, se disgregó mecánicamente un trozo representativo del tumor, con ayuda de unas pinzas y un bisturí. A continuación se realizó una disgregación enzimática, incubando el tumor con 20ml de Colagenasa B (nº Cat# 11088807001, Roche) a una concentración de 1mg/ml de medio de cultivo, en baño con agitación, a 37°C durante 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó el tubo a 400xg durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células 2 veces con medio de cultivo. Finalmente, se sembraron las células a una densidad de 30.000 células/cm² en medio de cultivo de MSC. Transcurridos 2 días, se retiró el medio del cultivo, se lavaron las células con PBS y se añadió medio fresco. A partir de aquí las líneas tumorales de MSCs *ex vivo* se trataron como cualquier línea tumoral.

V. Análisis histo-patológico

El análisis histo-patológico de los tumores fue muy importante en todo este trabajo. La parte técnica (procesamiento de la muestra y tinción inmunohistoquímica) se llevó a cabo en nuestro propio laboratorio. El análisis patológico de las preparaciones fue realizada con ayuda de los siguientes patólogos: la Dra. Ana Isabel Sáez (Biobanco Andaluz del Sistema Público de Salud, Granada) y la Dra. Isabel Colmenero (Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid).

V.1 Inclusión en parafina

Los tumores obtenidos de los ratones fueron seccionados en varios fragmentos representativos de todas las áreas del tumor no superiores a 1,5x1x0,5 cm, e incluían además tejido no neoplásico que servirá posteriormente como control en las tinciones. Estos fragmentos se fijaron en formol tamponado al 10% a razón de 2 h por cada cm³, tras lo cual se metieron en cestillas histológicas, debidamente identificados y se incluyeron en parafina según técnicas convencionales. En primer lugar se deshidrato la muestra pasando por una serie de soluciones de etanol de concentraciones crecientes, desde el 50% hasta alcohol absoluto, y finalmente se sumergieron en xilol, para eliminar los restos de etanol. A continuación se colocó la muestra en un molde metálico, se rellenó de parafina líquida y se dejó enfriar.

En algunos casos de muestras de tumores con tejido óseo, las piezas fueron descalcificadas con una solución ácido clorhídrico al 4% y ácido fórmico al 4% en agua, durante 3 días antes de ser embebidas en parafina.

V.3 Microdissección

El bloque de parafina se mantuvo enfriando a 4°C durante 20 min, para facilitar el corte. A continuación, se ensambló el bloque en el micrótopo y se realizaron múltiples cortes de 3µm de grosor. Los cortes seriados se depositaron en un baño de agua suplementado con etanol absoluto (a 45°C) para extender la parafina y evitar pliegues. Los cortes extendidos se recogieron del baño con portaobjetos y se dejaron secar en una estufa a 37°C durante la noche para fijar la muestra al cristal.

V.4 Desparafinado y rehidratación de las muestras

Tras fijar las muestras a los portaobjetos se introdujeron en xilol durante 30 min para eliminar la parafina. Seguidamente, los cortes se introdujeron en una serie de soluciones de etanol de concentraciones decrecientes, de etanol absoluto a etanol al 50%, y finalmente en agua destilada, para rehidratar la muestra.

V.5 Tinciones

V.5.1 Hematoxilina-eosina

La hematoxilina, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) como los núcleos, en tonos azul/púrpura; la eosina tiñe componentes básicos (acidófilos) como el citoplasma en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida.

Las muestras desparafinadas y rehidratadas, fueron sumergidas en hematoxilina durante 10 min, se lavaron con abundante agua y se trasladaron rápidamente a un recipiente con alcohol ácido (decolorante compuesto por 3% de HCl concentrado y 97% de etanol 95%). Posteriormente lavamos nuevamente y se sumergieron en eosina 30 seg. Terminada la tinción, se pasaron las muestras se incubaron en una serie de alcoholes creciente (de 50% a 100%) para deshidratar las muestras de nuevo y se mantuvieron 10 min en xilol. Finalmente, se dejaron secar las muestras y se analizaron en el microscopio óptico.

V.5.2 Tricrómico de Masson

La tinción de Tricrómico de Masson tiñe fibras de colágeno tipo I y permite visualizar tejido óseo. Las muestras fueron teñidas en primer lugar con hematoxilina de Harris durante 10 min. Tras lavar las muestras 5 min con agua corriente, fueron tratadas con el colorante Fuccina ponceau durante 5 min, y seguidamente se realizaron 2 lavados con ácido fosfomolibdico. Después las muestras se tiñeron con metil violeta durante 5 min y, por último, se deshidrataron sumergiéndolas en una serie de alcoholes crecientes y xilol. Las muestras se visualizaron en el microscopio óptico.

V.6 Desenmascaramiento antigénico

La fijación del tejido en formalina y la inclusión en parafina da lugar a la pérdida de inmunoreactividad de la muestra, ya que el formol origina entrecruzamientos protéicos que pueden ocultar los antígenos de interés. Para conseguir una buena reacción antígeno-anticuerpo en algunos casos fue necesario realizar previamente una recuperación antigénica que consistió en una incubación de las muestras, ya desparafinadas y rehidratadas, con tampón citrato (nº Cat# C9999, Sigma) diluido 1:10, a 100°C durante 3 min. Tras este tratamiento, las muestras se dejaron enfriar durante 20 min en el tampón citrato, y finalmente se lavaron en agua destilada a RT.

V.7 Inmunotinción

La reacción de inmunohistoquímica se basa en el reconocimiento de un antígeno específico del corte histológico de la muestra por parte de un anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios fueron detectados mediante un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa, que procesa la Diaminobencidina (DAB) de forma que adquiere un color marrón en la zona específica donde hay antígeno. Esta técnica enzimática permite una localización precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio óptico.

Debido a que los anticuerpos que se usaron se han revelado con peroxidasa, el primer paso fue eliminar la peroxidasa endógena de cada corte y así evitar falsos positivos. Para ello, se trataron las muestras con una solución de bloqueo de peroxidasa comercial (nº Cat# S2023, Dako) durante 5 min a RT, lavando posteriormente con abundante PBS. A continuación se incubaron las muestras con suero del animal en el que se generó el anticuerpo secundario durante 1 h, para minimizar las uniones inespecíficas de este.

Tras estos pasos de bloqueo se incubaron las muestras con los distintos anticuerpos primarios en una cámara húmeda durante 1 h (Tabla 4). Una vez llevada a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, lavamos con PBS el exceso de anticuerpo primario e incubamos con la solución comercial de detección Real™ EnVision™ HRP (Dako). Este sistema, que se basa en un polímero compuesto de un esqueleto de dextrano al que se acoplan moléculas de peroxidasa de rábano (HRP), está conjugado con anticuerpos secundarios anti-ratón/conejo que se unen al complejo antígeno-anticuerpo. Transcurridos aproximadamente 45 min, se lavaron las preparaciones y se añadió el sustrato, que consiste en una solución de 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) provista por la casa comercial. La HRP acoplada al polímero cataliza la peroxidación del cromógeno DAB, que vira a un color marrón/pardo en el lugar de unión del antígeno con el anticuerpo.

En el caso de la detección inmunohistoquímica de GFP se realizó sin recuperación antigénica. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se usó un anticuerpo secundario biotinilado (1:500, Jackson ImmunoResearch Labs).

El sistema biotina/avidina es un sistema de amplificación de la señal del anticuerpo muy usado por su alta sensibilidad y especificidad. La avidina es una glucoproteína que tiene una altísima afinidad por la biotina, un millón de veces mayor que la que existe entre la mayoría de los anticuerpos por los antígenos, por lo que su unión es muy estable, casi irreversible y, por tanto, resistente a la temperatura y las enzimas proteolíticas. Posee cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales se puede unir a una molécula de biotina. La biotina se une con facilidad a la mayoría de las proteínas, incluyendo anticuerpos y enzimas, y cada proteína puede ser conjugada con varias moléculas de biotina. Todas estas características propician la formación de complejos macromoleculares entre la avidina y las enzimas o anticuerpos biotinilados, amplificando enormemente la señal del anticuerpo. En nuestro caso la amplificación de la señal se realizó con el kit VECTASTAIN Elite ABC Kit (Standard; nº Cat# 55510, ATOM), la detección con peroxidasa, con el kit DAB, Substrate kit for Peroxidase (nº Cat# 53915, ATOM). Finalmente, la presencia de GFP se reveló usando un kit para la detección de peroxidasa con el sustrato DAB (nº Cat# 53915, ATOM).

Estas técnicas necesitan de controles internos positivos y negativos. El control positivo se obtiene con la tinción de tejidos, normalmente sanos, que expresan el antígeno de interés. El control negativo se obtiene realizando la misma técnica, pero con omisión del paso de incubación con anticuerpo primario.

VI. Tomografía micro-computerizada (μ CT)

Las muestras fijadas en formol fueron visualizadas con un sistema de tomografía micro-computerizada eXplore Vista (GE Healthcare), con un tubo de rayos X de 50KV de voltaje y una corriente de 200 μ A. El ángulo de rotación de escaneo fue 180°, el incremento angular de 0,40° y la resolución de voxel 50 μ m. El conjunto de datos fue reconstruido y segmentado en imágenes binarias (imágenes de 8-bit BMP) para el posterior procesamiento de la imagen y reconstrucción en imágenes 3D usando el software MicroView ABA 2.2 software (GE Healthcare).

VII. Análisis de microarrays: Perfil de Expresión Genica (GEP)

Cultivos primarios de BM-MSCs y ASCs wt, p53^{-/-} y p53^{-/-}Rb^{-/-}, así como las líneas tumorales Tp53 and TRbp53 fueron recogidos y estabilizados con la solución RNA later (Ambion) hasta la extracción de ARN.

Las muestras fueron enviadas a NIM Genetic (www.nimgenetics.com), donde se realizó su procesamiento, hibridación, revelado y escaneado de los correspondientes chips. El ARN fue aislado usando el kit de extracción de ARN total de Agilent (Agilent Technologies) y su calidad fue validada en un Bioanalizador 2100 (Agilent). El software del bioanalizador da una estimación de la degradación del ARN representada por el valor del parámetro RNA Integrity Number (RIN)), en este estudio sólo se usaron muestras con un RIN superior a 9. El ARN total de las muestras fue marcado con Cy3 utilizando el kit Quick-Amp Labeling kit e hibridado con el Whole Mouse Genome Microarray (G4122F), donde está representado el genoma completo de ratón, siguiendo las indicaciones del fabricante (Agilent Technologies, CA). Cada muestra fue marcada e hibridada como triplicados independientes. Los primeros resultados fueron examinados usando el software GeneSpring 11.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA). La comparación de la expresión de los genes entre el grupo control y experimental se hicieron usando el test de t de student y el test de corrección multi-muestra de Benjamini Hochberg. Sólo los genes con un umbral de P valor < 0.05 y un fold change > 2 fueron incluidos en la lista preliminar de genes significativos diferencialmente expresados. El análisis de las rutas de señalización significativamente alteradas por la deficiencia de p53 y o de ambos, Rb y p53 simultáneamente, se llevo a cabo usando el Ingenuity Pathway software 8.0 (Ingenuity Systems, Inc., Redwood City, CA). Los datos de microarrays han sido depositados y están disponibles en Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con la referencia general GSE43804 (compuesta por las series GSE43781 y GSE43803).

RESULTADOS

Deficiency in p53 but not Retinoblastoma Induces the Transformation of Mesenchymal Stem Cells *In vitro* and Initiates Leiomyosarcoma *In vivo*.

Ruth Rubio, Javier García-Castro, Iván Gutiérrez-Aranda, Jesús Paramio, Mirentxu Santos, Purificación Catalina, Paola E. Leone, Pablo Menendez, and René Rodríguez.

Cancer Research, 2010; 70(10): 4185-94.

INTRODUCCIÓN:

La expresión de genes de fusión u otras mutaciones específicas en células madre mesenquimales (MSCs) murinas ha permitido el desarrollo de distintos modelos de sarcomas, apoyando así el concepto de que las MSCs podrían constituir las células de origen en sarcomagénesis.

OBJETIVO:

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial efecto oncogénico de la deficiencia de p53 y/o Retinoblastoma (Rb) en la transformación de MSCs y en el proceso de sarcomagénesis.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este trabajo se derivaron cultivos primarios de MSCs murinas de tejido adiposo (ASCs) con los siguientes genotipo: ASCs silvestres, p53^{-/-}, Rb^{-/-} y p53^{-/-}Rb^{-/-}, y se estudiaron las propiedades de crecimiento y homeostasis *in vitro*, así como su capacidad tumorigénica *in vivo*.

RESULTADOS:

A diferencia de las ASCs silvestres, las Rb^{-/-}, p53^{-/-} y p53^{-/-}Rb^{-/-} mostraron severas alteraciones en la homeostasis de los cultivos *in vitro*. Además, las células p53^{-/-} y p53^{-/-}Rb^{-/-}, fueron capaces de desarrollar tumores *in vivo* tras ser inoculadas de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes. Estos tumores mostraban una histopatología similar a los leiomiomas humanos, sugiriendo una relación entre este tipo de sarcoma de músculo liso y la deficiencia de p53 en ASCs. Distintas líneas celulares derivadas *ex vivo* de estos tumores primarios fueron capaces de reproducir, con una corta latencia, este fenotipo de leiomiomas en recipientes secundarios, indicando la presencia de la célula iniciadora de este tipo de tumor en la fracción p53^{-/-} ASCs. Asimismo, la expresión del marcador de célula madre Sca1 estaba reducida en p53^{-/-} ASCs. No obstante, tanto la subpoblación Sca1⁺

como Sca1^{bajo/-} mostraron idéntico potencial de sarcomagénesis, lo que indica que la fracción Sca1⁺ no está enriquecida en células iniciadoras de leiomiomas.

CONCLUSIONES:

Estos resultados definen el papel diferencial que juega la deficiencia de p53 y/o Rb en la transformación de ASCs y constituye una prueba de concepto de que las MSCs transformadas pueden ser útiles para el estudio de la patogénesis de distintos tipos de sarcomas.

The Differentiation Stage of p53 and Rb-deficient Mesenchymal Stem Cells imposes the phenotype of *in vivo* sarcoma development

Ruth Rubio, Iván Gutierrez-Aranda, Ana I. Sáez-Castillo, Alberto Labarga, Pablo Menéndez and René Rodríguez.

Oncogene, 2012; doi: 10.1038/onc.2012.507. [Epub ahead of print]

INTRODUCCIÓN:

Cada vez existen más evidencias que sugieren que subpoblaciones de células madre mesenquimales (MSCs) portadoras de mutaciones específicas están en el origen de determinados tipos de sarcomas. Entre estas mutaciones, aquellas que afectan a genes reguladores del ciclo celular son frecuentes en distintos tipos de sarcomas humanos. En trabajos anteriores hemos descrito que la deficiencia en p53 ($p53^{-/-}$) sola, o en combinación con Rb ($p53^{-/-} Rb^{-/-}$) en MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs) promueven la aparición de tumores tipo leiomioma *in vivo*.

OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del tejido de origen y del estadio de diferenciación de las $p53^{-/-} Rb^{-/-}$ MSCs en el fenotipo de los sarcomas desarrollados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para investigar si existe alguna relación entre la fuente de origen de las MSCs y el fenotipo del sarcoma desarrollado, comparamos la capacidad sarcomagénica de cultivos primarios silvestres, $p53^{-/-}$, $Rb^{-/-}$ y $p53^{-/-}Rb^{-/-}$, de ASCs y MSCs de médula ósea (BM-MSCs). Igualmente, para analizar si el estadio de diferenciación de las células transformada define el fenotipo tumoral, se indujo la diferenciación de BM-MSCs y ASCs hacia linaje osteogénico y se generaron mutantes para p53 y Rb, por escisión de parte de la secuencia de estos genes mediada por la recombinasa Cre, en diferentes estadios del proceso de diferenciación osteogénico.

RESULTADOS:

Las BM-MSCs $p53^{-/-}$ y $p53^{-/-}Rb^{-/-}$ formaron leiomiomas *in vivo* de forma similar a lo observado previamente con las ASCs $p53^{-/-}$ and $Rb^{-/-}p53^{-/-}$. Además, los perfiles de expresión génica de ambos tipos celulares fueron similares y están asociados con procesos

de sarcomagénesis de músculo liso. Estos datos sugieren que la fuente de origen de las MSCs no parece determinar el desarrollo de un determinado fenotipo de sarcoma.

Por otro lado, la inactivación de p53 y Rb en progenitores osteogénicos derivados de BM-MSCs dio lugar a la formación de osteosarcomas que pudieron ser trasplantados en ratones inmunodeficientes de forma seriada. Además, estos osteosarcomas presentaban estructuras más diferenciadas cuanto mayor era el grado de diferenciación hacia el linaje osteogénico de su célula de origen. Sin embargo, la inactivación de p53 y Rb en progenitores osteogénicos derivados de ASCs no indujo la formación de tumores *in vivo*.

CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos sugieren que el estadio de diferenciación osteogénica de las BM-MSCs que sufren las mutaciones transformantes es uno de los factores que determina el fenotipo del tumor desarrollado *in vivo* y que los progenitores osteogénicos derivados de BM-MSCs, a diferencia de las MSCs indiferenciadas o los progenitores osteogénicos derivados de ASCs, representan la célula de origen más probable para el osteosarcoma.

Bone microenvironment signals are essential for osteosarcoma development from p53- and Rb-deficient mesenchymal stem cells

Ruth Rubio, Ander Abarrategi, Javier García-Castro, Carlos Suarez, Juan Tornin, Laura Santos, Isabel Colmenero, Pablo Menéndez and René Rodriguez

En revisión en Stem Cells

INTRODUCCIÓN:

La transformación tumoral de células madre mesenquimales (MSCs) inducida por mutaciones oncogénicas concretas se ha usado con éxito para el desarrollo de diferentes tipos de sarcomas *in vivo*, sugiriendo un posible papel de las MSCs como células iniciadoras de sarcomas. Recientemente, hemos reportado que MSCs derivadas de médula ósea (BM-MSCs) mutadas para p53 sólo (p53^{-/-}) o en combinación con Rb (p53^{-/-}Rb^{-/-}) dan lugar tras su inoculación subcutánea en ratones inmunodeficientes, a tumores tipo leiomiomasarcoma u osteosarcomas (OS), dependiendo de si la célula donde inducimos las mutaciones eran MSCs indiferenciadas o progenitores osteogénicos derivados de ellas, respectivamente. Por el contrario, la depleción de p53 y Rb en progenitores osteogénicos derivados de MSCs de tejido adiposo (ASCs) no induce sarcomagénesis.

OBJETIVO:

En este trabajo evaluamos el papel que juega el microambiente óseo en la diferenciación osteogénica de las ASCs y BM-MSCs transformadas y en el fenotipo final de los sarcomas desarrollados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para estudiar el efecto del microambiente óseo se inocularon ortotópicamente (intra-tibia o periósteeo) BM-MSCs y ASCs indiferenciadas p53^{-/-} o p53^{-/-}Rb^{-/-}. Posteriormente, evaluamos la contribución de distintos factores del microambiente óseo, como la proteína morfógena del hueso 2 (BMP-2) o la presencia de sustratos calcificados, sobre el desarrollo de OS, mediante la inoculación subcutánea de BM-MSCs y ASCs p53^{-/-}Rb^{-/-}, en presencia de BMP-2 y/o embebidas en cerámicas calcificadas bifásicas de hiroxiapatita y fosfato tricálcico (HA/TCP).

RESULTADOS:

La inoculación ortotópica de BM-MSCs y ASCs indiferenciadas, $p53^{-/-}$ y $p53^{-/-}Rb^{-/-}$, originó tumores tipo OS, donde las células tumorales desarrollaron extensas áreas osteoides. Igualmente, algunos de estos tumores produjeron metástasis en diferentes órganos que también mostraban matriz osteoide tumoral.

Por otro lado, la inoculación subcutánea de las BM-MSCs/ASCs $p53^{-/-} Rb^{-/-}$ en presencia de BMP-2 también tuvo como resultado la aparición de tumores con diferenciación osteogénica. De la misma forma, cuando se inocularon las células embebidas en las cerámicas calcificadas se observó la formación de hueso tumoral rodeando las estructuras de HA/TCP y, más aún, cuando añadimos BMP-2 a estos implantes cerámicos se indujo un aumento sinérgico en la formación de matriz osteoide tumoral.

CONCLUSIONES:

Estos datos muestran que las señales del microambiente óseo son esenciales para dirigir la diferenciación osteogénica de las MSCs transformadas y el consecuente desarrollo de OS a partir de BM-MSCs y ASCs deficientes para p53 y Rb, que de otra manera en ausencia de estas señales óseas originan un sarcoma tipo leiomiomasarcoma.

DISCUSIÓN

Discusión

Se ha especulado mucho en los últimos años sobre la célula de origen de los tumores (CIC), célula que recibe la mutación o mutaciones transformantes, y las células madre tumorales (CSC), célula capaz de regenerar y mantener el tumor con todas sus subpoblaciones. En muchos tipos de leucemias ya se conocen las células o progenitores que son origen de la enfermedad, así como el fenotipo de los clones tumorales responsables del mantenimiento de dicha leucemia a lo largo del tiempo. Sin embargo, en la mayoría de los tumores sólidos, como los sarcomas, tanto la CIC como CSC son aún desconocidas.

Recientemente se han ido publicando datos que indican que las MSCs son la célula de la que se originan muchos tipos de sarcomas, tras sufrir mutaciones específicas que las transforman. No obstante, se conoce muy poco sobre las bases mecánicas de la transformación de MSCs, pero han sido frecuentemente relacionadas con inestabilidad cromosómica. Esta observación sugiere, que la pérdida de una apropiada regulación del ciclo celular podría ser la clave de los procesos de transformación maligna. Mutaciones que contribuyen a la transformación tumoral a menudo desestabilizan el equilibrio entre proliferación, supervivencia y diferenciación de estas células, mediante el desmantelamiento de los puntos de control del ciclo celular. Así, se han descrito alteraciones en la expresión de importantes reguladores del ciclo celular, como p53, Rb, p16, p19 o c-myc, entre otros genes, que están frecuentemente mutados en sarcomas.

Según todo lo mencionado anteriormente, nuestro trabajo se ha enfocado a modelar sarcomas basándonos en la transformación de MSCs, deplecionando reconocidos genes supresores de tumores, como p53 y Rb, que aparecen reiteradamente mutados en sarcomas humanos. En estos modelos de sarcomagénesis quisimos, además de entender cuál era la célula de origen, estudiar otros factores que parecen estar afectando al desarrollo y fenotipo del sarcoma. Para ello, hemos abordado tres aspectos diferentes:

- Tejido de origen de la MSC que sufre la transformación
- Estadío de diferenciación de la MSC
- Microambiente donde se localiza la célula iniciadora del cáncer.

Para estudiar la influencia de estos factores en la sarcomagénesis utilizamos el siguiente modelo: trabajamos con ratones genéticamente modificados que portaban los genes de interés, p53 y Rb, funcionales pero flanqueados por secuencias lox-P. Animales con genotipos (i) wt, (ii) p53^{loxP/loxP}, (iii) Rb^{loxP/loxP} and (vi) p53^{loxP/loxP} Rb^{loxP/loxP}, de entre 6 y 10 semanas, fueron sacrificados y de ellos se extrajo la grasa y los huesos largos de las extremidades posteriores, para obtener la médula ósea. A partir de estos tejidos se establecieron cultivos primarios de MSCs de todos los genotipos y se infectaron con adenovirus que portaban la cre-recombinadas (Ad-CMV-Cre) para obtener cultivos primarios de MSCs mutantes (i) wt, (ii) p53^{-/-}, (iii) Rb^{-/-} and (vi) p53^{-/-} Rb^{-/-} de ambos tejidos.

Las vías de señalización de p53 y Rb están frecuentemente alteradas en todos los sarcomas humanos. Con el objetivo de generar un modelo de ratón de sarcoma ensayamos, *in vitro* e *in vivo*, las consecuencias de la depleción de p53 y/o Rb en MSCs derivadas de tejido

adiposo y de médula ósea, comparativamente por primera vez. $p53^{-/-}$, $Rb^{-/-}$ y $p53^{-/-} Rb^{-/-}$, en comparación con las MSCs wt, mostraron severas alteraciones en la homeostasis de los cultivos incluyendo altos niveles de aneuploidización.

Actualmente se cree que el cáncer resulta de un proceso de múltiples pasos en el que se van adquiriendo mutaciones específicas que afectan al delicado equilibrio entre proliferación y supervivencia, y por tanto, a la capacidad de diferenciación de las células. En nuestros ensayos *in vitro* MSCs $Rb^{-/-}$, $p53^{-/-}$ y $p53^{-/-} Rb^{-/-}$, de ambos tejidos, mostraba una tasa de crecimiento más rápido que las células wt. Además $p53^{-/-}$ y $p53^{-/-} Rb^{-/-}$ MSCs mostraban un gran desajuste en la capacidad de diferenciación, perdiendo casi totalmente la capacidad adipogénica en favor de la diferenciación osteogénica, que era mucho mayor que la de las células wt; este efecto se observó mucho más exacerbado en las MSCs derivadas de tejido adiposo. Estos resultados están en línea con trabajos publicados anteriormente donde se correlacionaba el incremento en la tasa de proliferación con una pobre diferenciación adipogénica y un aumento en la diferenciación hacia linaje osteogénico (Carcamo-Orive et al., 2008). También se ha reportado por varios grupos que p53 tiene un importante papel en la diferenciación de osteoblastos. Así por ejemplo, ratones deficientes para p53 muestran una diferenciación osteoblástica acelerada y un aumento de la densidad ósea (Wang et al., 2006). En otro trabajo, la activación de la vía de p53 mediante la delección de su regulador negativo MDM2, suprime la diferenciación osteogénica mediante la inhibición del factor de transcripción específico de hueso Runx2 (Lengner et al., 2006). Por último, estudios *in vitro* mostraron que la delección de p53 en MSCs y en precursores osteoblásticos promueven cambios transcripcionales asociados al aumento de la diferenciación osteogénica en estadios tempranos, pero bloquea la diferenciación completa de los progenitores hasta su estadio final de osteocito maduro (Tataria et al., 2006).

Un resultado aún más sorprendente fue que tanto las MSCs $p53^{-/-}$ como $p53^{-/-} Rb^{-/-}$, pero no las $Rb^{-/-}$, eran capaces de transformarse *in vitro*, en ensayos de crecimiento en matriz semisólida de agar, de la misma forma que desarrollar tumores en ensayos *in vivo* realizados en ratones inmunodeficientes. Cuando la inoculación que se practico fue **subcutánea** los tumores desarrollados a partir de las MSCs $p53^{-/-}$ y $p53^{-/-} Rb^{-/-}$, derivadas tanto de tejido adiposo como de médula ósea, mostraban un fenotipo típico de leiomioma, con células elongadas que formaban fascículos y que se disponían en los tres ejes del espacio intersectando entre ellos, características morfológicas propias de este tipo de tumores. También presentaban tinciones de inmunohistoquímica positivas para actina de músculo liso y caldesmón, marcadores igualmente de músculo liso. Los tumores derivados de MSCs $p53^{-/-} Rb^{-/-}$ tenían una latencia más corta y mostraban amplias áreas de necrosis, propio de tumores de gran tamaño e indicativo de una mayor agresividad. Curiosamente, los tumores $p53^{-/-}$ mostraban una tinción positiva para desmina que los $p53^{-/-} Rb^{-/-}$ no tenía, reflejando un menor nivel de diferenciación en los últimos. Estos datos indican que p53 tiene un papel como hit oncogénico en el desarrollo de tumores tipo leiomioma, y que la pérdida cooperativa de Rb podría potenciar y modular la transformación de las MSCs y el subfenotipo tumoral. Existen publicaciones previas que apoyan todos estos resultados. Hay artículos que sugieren que la pérdida de p53 y Rb parece contribuir a la iniciación y/o progresión de leiomiomas en humanos (Bleoo et al., 2003; Dei Tos et al., 1996). El potencial de las MSCs como origen de los leiomiomas está apoyado también por estudios de microRNAs basados en la diferenciación de estas células hacia músculo liso (Danielson et al., 2010). Asimismo, las

deficiencias de p53 y Rb en ovarios de ratón han sido asociados con el desarrollo de leiomiomas (Clark-Knowles et al., 2009). Cuando las mutaciones de p53 y Rb se producen en MSCs de la dermis, se ha reportado la formación de sarcomas pleiomórficos de tejidos blandos. En este estudio, el 33% de los sarcomas de tejidos blandos desarrollados a partir de los ratones p53^{loxP/loxP}, tratados con Ad-Cre (modelo similar al nuestro), se clasificaron como leiomiomas pleiomórficos (Choi et al., 2010). En otro estudio en el que se usó la misma estirpe de ratón que en nuestro caso (FVB) la inactivación somática en la epidermis de p53, pero no la de Rb, producía el desarrollo espontáneo de carcinoma de célula escamosa. La inactivación simultánea de p53 y Rb no agravaba el fenotipo observado en los mutantes simples de p53, pero aceleraba la aparición del mismo tipo de tumor, indicando que p53 es el gen supresor de tumores predominante actuando en la epidermis murina (Martinez-Cruz et al., 2008). En otros modelos de ratón en los que las mutaciones se restringen a músculo, la pérdida de p53 en cooperación con la isoforma oncogénica de K-Ras inducía la formación de sarcomas de alto grado con diferenciación miofibroblástica (Kirsch et al., 2007). Con las mismas mutaciones, en la dermis se obtienen diferentes tipos de STS, leiomiomas entre otros, igual que en el ovario, y en la epidermis se producen carcinomas de célula escamosa. Sin embargo, distintas mutaciones en diferentes tejidos pueden llegar a dar el mismo tipo de sarcoma, en este caso leiomioma.

Nuestros resultados basados en ASCs y BM-MSCs muestran que los tumores iniciados a partir de MSCs, tanto p53^{-/-} como p53^{-/-} Rb^{-/-}, son leiomiomas con incidencias y latencia similares. Por tanto, el tejido de origen de la MSC no parece tener un papel principal en el fenotipo final del sarcoma que se obtiene *in vivo*, al menos cuando se trata de células madre indiferenciadas. No obstante, no podemos eliminar la posibilidad de que MSCs de otros tejidos con mutaciones en p53 y Rb, u otros eventos oncogénicos que las transformen, podrían iniciar programas de sarcomagenesis diferentes.

A partir de los tumores obtenidos de ASCs y BM-MSCs se establecieron líneas celulares transformadas *ex vivo* (Tp53 y TRbp53). Estas líneas celulares mantenían las características inmunofenotípicas y propiedades de MSCs y, en ensayos *in vivo*, eran capaces de reiniciar tumores secundarios más agresivos y con una latencia mucho menor, de a penas dos semanas. El fenotipo de los tumores secundarios de ambos tejidos de origen seguía siendo leiomioma, indicando que entre las células provenientes de los tumores primarios reinoculadas, se encuentra la célula iniciadora de leiomioma.

Una observación interesante fue que todas las MSCs mutantes tenían la expresión del marcador Sca1 significativamente reducida en comparación con las Wt, y estos bajos niveles de expresión también se mantuvieron en las líneas celulares derivadas de los tumores. Nosotros ya demostramos previamente la relación existente entre la deficiencia de p53 y la expresión de Sca1 en mMSCs derivadas de grasa (Rodriguez et al., 2009). Esta regulación negativa de Sca1 también se ha reportado en MSCs de médula ósea y precursores osteobásticos deficientes para p53 y Rb que dan osteosarcoma (Berman et al., 2008). Estos autores aislaron dos poblaciones con diferente nivel de expresión de Sca1, mediante experimentos de separación celular por citometría de flujo, y ensayaron su potencial tumorigénico *in vivo*, mostrando que las células Sca1⁺ parecían estar enriquecidas en la población de células iniciadoras de tumor (CIC). Nosotros también utilizamos esta aproximación para separar células por el nivel de expresión de Sca1, en nuestro modelo de líneas celulares tumorales p53^{-/-} Rb^{-/-} derivadas de leiomioma de

ASCs, y ver si, al trasplantarlas, las células Sca1⁺ podrían estar enriquecidas en células iniciadora de sarcoma. En nuestro caso, tanto las células Sca1⁺ como las Sca1^{-/low} originaron tumores en los ratones inyectados con la misma penetrancia, latencia, peso y características histológicas de leiomiomas, todos muy similares entre ellos. Estos resultados indican que la expresión de Sca1 no segrega a la población de MSCs transformadas en fracciones celulares con diferente potencial tumorigénico para iniciar sarcomas. Por tanto, a diferencia de los estudios llevados a cabo por Berman y sus colaboradores, nosotros mostramos que la pérdida de p53 en MSCs es suficiente para transformar las células y que originen leiomiomas *in vivo*, independientemente del nivel de expresión del antígeno Sca1.

En el análisis de perfil de expresión génica se compararon cultivos primarios p53^{-/-} y p53^{-/-} Rb^{-/-} de ASCs y BM-MSCs, así como sus líneas celulares establecidas *ex vivo* a partir de los tumores (Tp53 y TRbp53). Los resultados mostraban un gran solapamiento entre los modelos de grasa y de médula ósea, y apoyaban la idea de que la deficiencia de p53 y Rb se asocia con sarcomagénesis relacionada con músculo, independientemente del tejido de origen. Usando el software IPA, seleccionamos aquellos genes comúnmente expresados en las células Tp53 y TRbp53 y encontramos, según lo publicado en las bases de datos públicas, que estaban relacionados con leiomiomas. Una alta proporción de genes (40-60%) que estaban comúnmente alterados en células Tp53 y TRbp53 afectaban a vías de señalización principales como NFκB, PTEN, IL-8 y PI3K/AKT. Interesantemente, se ha reportado que la vía de AKT tienen un papel muy relevante en el desarrollo de leiomiomas (Hernando et al., 2007). Sin embargo, las vías NFκB e IL-8, a pesar de estar bien reconocidas por su relación con cáncer, permanecen completamente inexploradas en leiomioma. Por tanto, la desregulación de esas vías de señalización podría ser parte de la base de la patogénesis del leiomioma en nuestro modelo tumoral experimental.

En modelos de ratones modificados genéticamente se ha relacionado la pérdida de p53 y Rb en precursores osteoblásticos, en BM-MSCs o en MSCs de primordio de extremidades con el desarrollo de osteosarcoma (OS) (Berman et al., 2008; Lin et al., 2009; Walkley et al., 2008). En el caso de Berman y Walkley, usaron el transgen Cre dirigido por el promotor de Osterix1 para inducir la mutación de los genes supresores de tumores de interés, p53 y Rb, en precursores osteoblásticos murinos; una altísima proporción de los ratones inyectados con células p53^{-/-} en ambos estudios desarrollaron OS, y la pérdida simultánea de Rb aceleraba el proceso de tumorigénesis, mostrando además una gran capacidad metastática en pulmones e hígado (Berman et al., 2008; Walkley et al., 2008). En el trabajo de Lin, también se usó el transgen Cre, pero dirigido en este caso por el promotor Pxr1, que les permitía expresar las mutaciones de p53 y Rb en MSCs indiferenciadas del primordio de las extremidades del animal, en lugar de progenitores más comprometidos hacia otro determinado linaje. En este caso, cuando la mutación se restringía a p53, los ratones desarrollaban distintos tipos de sarcomas, mayoritariamente OS (> 60%), aunque también se describieron casos de sarcomas de tejidos blandos bastante indiferenciados (32%); esta proporción se invertía cuando producían simultáneamente ambas mutaciones, Rb y p53, pasando a ser los sarcomas indiferenciados mayoritarios. En este mismo estudio, cuando las mutaciones previamente mencionadas estaban dirigidas por el promotor Coll1a, que contiene un "enhancer" que se expresa específicamente en osteoblastos, el porcentaje de osteosarcomas formados aumentaba aún más en comparación con los sarcomas indiferenciados (85% *versus* 15%) (Lin et al., 2009).

Comparando estos datos con nuestros resultados nos planteamos la siguiente cuestión: ¿la adquisición de las mutaciones mencionadas en MSCs indiferenciadas confiere el fenotipo de osteosarcoma, o el desarrollo de osteosarcoma ocurre cuando las MSCs que se transforman se han diferenciado previamente a osteoblastos o progenitores comprometidos con linaje óseo? Entonces, pensamos que la diferencia observada entre el leiomiomasarcoma que nosotros obteníamos a partir de MSCs indiferenciadas y el osteosarcoma que se generaban en sus modelos podría basarse en el nivel de diferenciación que poseía la célula que sufría la transformación maligna. Sin embargo, el estudio de la sarcomagénesis basados en tejidos embrionarios, como los del primordio de las extremidades, es un poco inapropiado ya que la mayoría de los sarcomas se producen en tejidos adultos. La ausencia de un promotor capaz de dirigir específicamente la expresión de la Cre-recombinasa en MSCs indiferenciadas de tejidos adultos constituye un desafío para usar modelos de ratón similares en los que se determine el fenotipo tumoral que resulta de la inactivación específica *in vivo* de p53 y Rb en MSCs indiferenciadas adultas.

Para analizar si el estadio de diferenciación podría imponer el fenotipo del sarcoma diseñamos un experimento que nos permitiera comparar la capacidad tumorigénica de progenitores osteogénicos con MSCs indiferenciadas. Para ello, partimos de los cultivos de ASCs y BM-MSCs p53^{loxP/loxP} Rb^{loxP/loxP}, los diferenciamos hacia linaje osteogénico y los hicimos mutantes para p53 y/o Rb en diferentes momentos a lo largo del proceso de diferenciación, a los 2, 5 y 10 días de cultivo en medio específico de diferenciación osteogénica. Los progenitores osteogénicos derivados de las BM-MSCs p53^{-/-} Rb^{-/-} desarrollaron *in vivo* tumores tipo osteosarcoma, no leiomiomasarcomas como habían producido las BM-MSCs p53^{-/-} Rb^{-/-} indiferenciadas. Es importante resaltar que cuanto más prolongada era la diferenciación de las MSCs hacia linaje osteogénico, más diferenciados eran los osteosarcomas que se desarrollaban. Las líneas tumorales obtenidas a partir de los osteosarcomas fueron capaces de reproducir el tumor con el mismo fenotipo en una ronda secundaria de trasplantes, sugiriendo la presencia de la célula iniciadora de osteosarcoma entre las células inoculadas. Estos datos parecen indicar que el estadio de diferenciación osteogénico en las BM-MSCs impone el fenotipo del sarcoma desarrollado *in vivo*, y que los progenitores osteogénicos derivados de MSCs son más probablemente la célula de origen de os osteosarcomas que las BM-MSCs indiferenciadas.

Los progenitores osteogénicos derivados de las ASCs p53^{-/-} Rb^{-/-} no desarrollaron *in vivo* ningún tipo de tumor, ni osteosarcoma, ni leiomiomasarcomas como habían producido las ASCs p53^{-/-} Rb^{-/-} indiferenciadas. Este resultado indica que los progenitores osteogénicos derivados de MSCs de distintos tejidos de origen no tienen el mismo potencial de transformación.

En el análisis del perfil de expresión génica, el nivel de solapamiento entre los progenitores osteogénicos p53^{-/-} Rb^{-/-} de BM-MSCs y ASCs era considerablemente diferentes, con solo un 28% de solapamiento, aproximadamente. La expresión de las vías de señalización Wnt y BMP/TGF- β , que están relacionadas con osteosarcoma, están asociadas con los genes alterados en los progenitores osteogénicos de 10 días de diferenciación derivados de BM-MSCs (BM-Rbp53-10D), pero no con los progenitores osteogénicos de 10 días de diferenciación derivados de ASCs (ASC-Rbp53-10D), lo que debe contribuir al diferente potencial sarcomagénico que presentan los distintos progenitores. Esta diferencia de potencial de transformación podría estar íntimamente relacionada con las diferencias en la

capacidad de diferenciación *in vivo* mostrada por las BM-MSCs y MSCs de otros tejidos de origen (Bianco et al., 2008). Estos modelos de leiomioma/osteosarcoma basados en la depleción de p53 y Rb en células indiferenciadas o en progenitores osteogénicos derivados de MSCs nos hace pensar que, de forma general, una mutación o conjunto de mutaciones específicas podría generar un tipo de sarcoma u otro dependiendo del estado de diferenciación que tenga la célula y también en parte dependiendo del tejido de origen del que proceda la célula.

El modelo que presentamos, basado en la mutación condicional de genes supresores de tumores, es muy atractivo para avanzar en el estudio de los eventos tempranos relacionados con la formación de sarcomas.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Berman, S.D., E. Calo, A.S. Landman, P.S. Danielian, E.S. Miller, J.C. West, B.D. Fonhoue, A. Caron, R. Bronson, M.L. Boussein, S. Mukherjee, and J.A. Lees. 2008. Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:11851-11856.
- Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*. 2:313-319.
- Bleoo, S.L., R. Godbout, D. Rayner, Y. Tamimi, and R.B. Moore. 2003. Leiomyosarcoma of the bladder in a retinoblastoma patient. *Urologia internationalis*. 71:118-121.
- Carcamo-Orive, I., N. Tejados, J. Delgado, A. Gaztelumendi, D. Otaegui, V. Lang, and C. Trigueros. 2008. ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential. *Exp Cell Res*. 314:1777-1788.
- Clark-Knowles, K.V., M.K. Senterman, O. Collins, and B.C. Vanderhyden. 2009. Conditional inactivation of Brca1, p53 and Rb in mouse ovaries results in the development of leiomyosarcomas. *PLoS one*. 4:e8534.
- Choi, J., S.J. Curtis, D.M. Roy, A. Flesken-Nikitin, and A.Y. Nikitin. 2010. Local mesenchymal stem/progenitor cells are a preferential target for initiation of adult soft tissue sarcomas associated with p53 and Rb deficiency. *The American journal of pathology*. 177:2645-2658.
- Danielson, L.S., S. Menendez, C.S. Attolini, M.V. Guijarro, M. Bisogna, J. Wei, N.D. Socci, D.A. Levine, F. Michor, and E. Hernando. 2010. A differentiation-based microRNA signature identifies leiomyosarcoma as a mesenchymal stem cell-related malignancy. *The American journal of pathology*. 177:908-917.
- Dei Tos, A.P., R. Maestro, C. Doglioni, S. Piccinin, D.D. Libera, M. Boiocchi, and C.D. Fletcher. 1996. Tumor suppressor genes and related molecules in leiomyosarcoma. *The American journal of pathology*. 148:1037-1045.
- Hernando, E., E. Charytonowicz, M.E. Dudas, S. Menendez, I. Matushansky, J. Mills, N.D. Socci, N. Behrendt, L. Ma, R.G. Maki, P.P. Pandolfi, and C. Cordon-Cardo. 2007. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat Med*. 13:748-753.
- Kirsch, D.G., D.M. Dinulescu, J.B. Miller, J. Grimm, P.M. Santiago, N.P. Young, G.P. Nielsen, B.J. Quade, C.J. Chaber, C.P. Schultz, O. Takeuchi, R.T. Bronson, D. Crowley, S.J. Korsmeyer, S.S. Yoon, F.J. Hornicek, R. Weissleder, and T. Jacks. 2007. A spatially and temporally restricted mouse model of soft tissue sarcoma. *Nat Med*. 13:992-997.

- Lengner, C.J., H.A. Steinman, J. Gagnon, T.W. Smith, J.E. Henderson, B.E. Kream, G.S. Stein, J.B. Lian, and S.N. Jones. 2006. Osteoblast differentiation and skeletal development are regulated by Mdm2-p53 signaling. *The Journal of cell biology*. 172:909-921.
- Lin, P.P., M.K. Pandey, F. Jin, A.K. Raymond, H. Akiyama, and G. Lozano. 2009. Targeted mutation of p53 and Rb in mesenchymal cells of the limb bud produces sarcomas in mice. *Carcinogenesis*. 30:1789-1795.
- Martinez-Cruz, A.B., M. Santos, M.F. Lara, C. Segrelles, S. Ruiz, M. Moral, C. Lorz, R. Garcia-Escudero, and J.M. Paramio. 2008. Spontaneous squamous cell carcinoma induced by the somatic inactivation of retinoblastoma and Trp53 tumor suppressors. *Cancer research*. 68:683-692.
- Rodriguez, R., R. Rubio, M. Masip, P. Catalina, A. Nieto, T. de la Cueva, M. Arriero, N. San Martin, E. de la Cueva, D. Balomenos, P. Menendez, and J. Garcia-Castro. 2009. Loss of p53 induces tumorigenesis in p21-deficient mesenchymal stem cells. *Neoplasia*. 11:397-407.
- Tataria, M., N. Quarto, M.T. Longaker, and K.G. Sylvester. 2006. Absence of the p53 tumor suppressor gene promotes osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Journal of pediatric surgery*. 41:624-632; discussion 624-632.
- Walkley, C.R., R. Qudsi, V.G. Sankaran, J.A. Perry, M. Gostissa, S.I. Roth, S.J. Rodda, E. Snay, P. Dunning, F.H. Fahey, F.W. Alt, A.P. McMahon, and S.H. Orkin. 2008. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes & development*. 22:1662-1676.
- Wang, X., H.Y. Kua, Y. Hu, K. Guo, Q. Zeng, Q. Wu, H.H. Ng, G. Karsenty, B. de Crombrughe, J. Yeh, and B. Li. 2006. p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *The Journal of cell biology*. 172:115-125.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8:315-317.
- Marino, S., M. Vooijs, H. van Der Gulden, J. Jonkers, and A. Berns. 2000. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes & development*. 14:994-1004.
- Rodriguez, R., R. Rubio, M. Masip, P. Catalina, A. Nieto, T. de la Cueva, M. Arriero, N. San Martin, E. de la Cueva, D. Balomenos, P. Menendez, and J. Garcia-Castro. 2009. Loss of p53 induces tumorigenesis in p21-deficient mesenchymal stem cells. *Neoplasia*. 11:397-407.
- Ruiz, S., M. Santos, C. Segrelles, H. Leis, J.L. Jorcano, A. Berns, J.M. Paramio, and M. Vooijs. 2004. Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development*. 131:2737-2748.

- Abarbanell, A.M., Y. Wang, J.L. Herrmann, B.R. Weil, J.A. Poynter, M.C. Manukyan, and D.R. Meldrum. 2010. Toll-like receptor 2 mediates mesenchymal stem cell-associated myocardial recovery and VEGF production following acute ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 298:H1529-1536.
- Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, and M.F. Clarke. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:3983-3988.
- Allgower, M. 1960. [The pathogenesis and clinical aspects of various shock conditions]. *Praxis*. 49:383-384.
- Antonescu, C.R. 2011. The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. *J Pathol*. 223:251-261.
- Balic, M., H. Lin, L. Young, D. Hawes, A. Giuliano, G. McNamara, R.H. Datar, and R.J. Cote. 2006. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 12:5615-5621.
- Bao, S., Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, and J.N. Rich. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 444:756-760.
- Battiwalla, M., and P. Hematti. 2009. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 11:503-515.
- Berlin, O., B. Stener, L.G. Kindblom, and L. Angervall. 1984. Leiomyosarcomas of venous origin in the extremities. A correlated clinical, roentgenologic, and morphologic study with diagnostic and surgical implications. *Cancer*. 54:2147-2159.
- Berman, S.D., E. Calo, A.S. Landman, P.S. Danielian, E.S. Miller, J.C. West, B.D. Fonhoue, A. Caron, R. Bronson, M.L. Bouxsein, S. Mukherjee, and J.A. Lees. 2008. Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:11851-11856.
- Bernhard, J.C., and A. Panitch. 2012. Synthesis and characterization of an aggrecan mimic. *Acta biomaterialia*. 8:1543-1550.
- Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*. 2:313-319.

- Birnbaum, T., J. Roider, C.J. Schankin, C.S. Padovan, C. Schichor, R. Goldbrunner, and A. Straube. 2007. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *Journal of neuro-oncology*. 83:241-247.
- Boiko, A.D., O.V. Razorenova, M. van de Rijn, S.M. Swetter, D.L. Johnson, D.P. Ly, P.D. Butler, G.P. Yang, B. Joshua, M.J. Kaplan, M.T. Longaker, and I.L. Weissman. 2010. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*. 466:133-137.
- Bonnet, D., and J.E. Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 3:730-737.
- Boshoff, C., and R.A. Weiss. 1998. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Advances in cancer research*. 75:57-86.
- Bruder, S.P., K.H. Kraus, V.M. Goldberg, and S. Kadiyala. 1998a. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 80:985-996.
- Bruder, S.P., A.A. Kurth, M. Shea, W.C. Hayes, N. Jaiswal, and S. Kadiyala. 1998b. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 16:155-162.
- Cao, C., and Y. Dong. 2005. [Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waikexue zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*. 19:642-647.
- Castro-Malaspina, H., R.E. Gay, G. Resnick, N. Kapoor, P. Meyers, D. Chiarieri, S. McKenzie, H.E. Broxmeyer, and M.A. Moore. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 56:289-301.
- Cavarretta, I.T., V. Altanerova, M. Matuskova, L. Kucerova, Z. Culig, and C. Altaner. 2010. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing prodrug-converting enzyme inhibit human prostate tumor growth. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 18:223-231.
- Clevers, H. 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*. 17:313-319.
- Conrad, C., B. Gottgens, S. Kinston, J. Ellwart, and R. Huss. 2002. GATA transcription in a small rhodamine 123(low)CD34(+) subpopulation of a peripheral blood-derived CD34(-)CD105(+) mesenchymal cell line. *Exp Hematol*. 30:887-895.
- Crisan, M., S. Yap, L. Casteilla, C.W. Chen, M. Corselli, T.S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B.M. Deasy, S. Badyrak, H.J. Buhning, J.P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, and B. Peault. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*. 3:301-313.
- Chapel, A., J.M. Bertho, M. Bensidhoum, L. Fouillard, R.G. Young, J. Frick, C. Demarquay, F. Cuvelier, E. Mathieu, F. Trompier, N. Dudoignon, C. Germain, C. Mazurier, J. Aigueperse, J. Borneman, N.C. Gorin, P. Gourmelon, and D. Thierry. 2003.

- Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* 5:1028-1038.
- Chen, D., X. Ji, M.A. Harris, J.Q. Feng, G. Karsenty, A.J. Celeste, V. Rosen, G.R. Mundy, and S.E. Harris. 1998. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *The Journal of cell biology.* 142:295-305.
- Chen, R., M.C. Nishimura, S.M. Bumbaca, S. Kharbanda, W.F. Forrest, I.M. Kasman, J.M. Greve, R.H. Soriano, L.L. Gilmour, C.S. Rivers, Z. Modrusan, S. Nacu, S. Guerrero, K.A. Edgar, J.J. Wallin, K. Lamszus, M. Westphal, S. Heim, C.D. James, S.R. VandenBerg, J.F. Costello, S. Moorefield, C.J. Cowdrey, M. Prados, and H.S. Phillips. 2010. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell.* 17:362-375.
- da Silva Meirelles, L., A.I. Caplan, and N.B. Nardi. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 26:2287-2299.
- Dahl, I., and L. Angervall. 1974. Cutaneous and subcutaneous leiomyosarcoma. A clinicopathologic study of 47 patients. *Pathologia Europaea.* 9:307-315.
- Dalerba, P., S.J. Dylla, I.K. Park, R. Liu, X. Wang, R.W. Cho, T. Hoey, A. Gurney, E.H. Huang, D.M. Simeone, A.A. Shelton, G. Parmiani, C. Castelli, and M.F. Clarke. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104:10158-10163.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, F. Vandenabeele, J.R. Vermeesch, J.M. Raymackers, and F.P. Luyten. 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *The Journal of cell biology.* 160:909-918.
- de Saint Aubain Somerhausen, N., and C.D. Fletcher. 1999. Leiomyosarcoma of soft tissue in children: clinicopathologic analysis of 20 cases. *The American journal of surgical pathology.* 23:755-763.
- Dei Tos, A.P., R. Maestro, C. Doglioni, S. Piccinin, D.D. Libera, M. Boiocchi, and C.D. Fletcher. 1996. Tumor suppressor genes and related molecules in leiomyosarcoma. *The American journal of pathology.* 148:1037-1045.
- Dexter, T.M. 1982. Stromal cell associated haemopoiesis. *Journal of cellular physiology. Supplement.* 1:87-94.
- Dezawa, M., H. Kanno, M. Hoshino, H. Cho, N. Matsumoto, Y. Itokazu, N. Tajima, H. Yamada, H. Sawada, H. Ishikawa, T. Mimura, M. Kitada, Y. Suzuki, and C. Ide. 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *The Journal of clinical investigation.* 113:1701-1710.
- Dick, J.E. 2008. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 112:4793-4807.
- Diehn, M., R.W. Cho, N.A. Lobo, T. Kalisky, M.J. Dorie, A.N. Kulp, D. Qian, J.S. Lam, L.E. Ailles, M. Wong, B. Joshua, M.J. Kaplan, I. Wapnir, F.M. Dirbas, G. Somlo, C. Garberoglio, B. Paz, J. Shen, S.K. Lau, S.R. Quake, J.M. Brown, I.L. Weissman, and M.F. Clarke. 2009. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature.* 458:780-783.

- Djouad, F., C. Bony, F. Apparailly, P. Louis-Pence, C. Jorgensen, and D. Noel. 2006. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 82:1060-1066.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8:315-317.
- Dorfman, H.D., and B. Czerniak. 1995. Bone cancers. *Cancer*. 75:203-210.
- El-Rifai, W., M. Sarlomo-Rikala, S. Knuutila, and M. Miettinen. 1998. DNA copy number changes in development and progression in leiomyosarcomas of soft tissues. *The American journal of pathology*. 153:985-990.
- Elkahloun, A.G., M. Bittner, K. Hoskins, R. Gemmill, and P.S. Meltzer. 1996. Molecular cytogenetic characterization and physical mapping of 12q13-15 amplification in human cancers. *Genes, chromosomes & cancer*. 17:205-214.
- Eriksson, M., L. Hardell, and H.O. Adami. 1990. Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 82:486-490.
- Etheridge, S.L., G.J. Spencer, D.J. Heath, and P.G. Genever. 2004. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 22:849-860.
- Farshid, G., M. Pradhan, J. Goldblum, and S.W. Weiss. 2002. Leiomyosarcoma of somatic soft tissues: a tumor of vascular origin with multivariate analysis of outcome in 42 cases. *The American journal of surgical pathology*. 26:14-24.
- Feng, B., and L. Chen. 2009. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 24:717-721.
- Fernandez, M., V. Simon, G. Herrera, C. Cao, H. Del Favero, and J.J. Minguell. 1997. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone marrow transplantation*. 20:265-271.
- Florenes, V.A., G.M. Maelandsmo, A. Forus, A. Andreassen, O. Myklebost, and O. Fodstad. 1994. MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J Natl Cancer Inst*. 86:1297-1302.
- Fortier, L.A., A.J. Nixon, J. Williams, and C.S. Cable. 1998. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research*. 59:1182-1187.
- Forus, A., J.M. Berner, L.A. Meza-Zepeda, G. Saeter, D. Mischke, O. Fodstad, and O. Myklebost. 1998. Molecular characterization of a novel amplicon at 1q21-q22 frequently observed in human sarcomas. *Br J Cancer*. 78:495-503.
- Forus, A., A. D'Angelo, J. Henriksen, G. Merla, G.M. Maelandsmo, V.A. Florenes, S. Olivieri, B. Bjerkehagen, L.A. Meza-Zepeda, F. del Vecchio Blanco, C. Muller, F. Sanvito, J. Kononen, J.M. Nesland, O. Fodstad, A. Reymond, O.P. Kallioniemi, G. Arrigoni, A. Ballabio, O. Myklebost, and M. Zollo. 2001. Amplification and overexpression of PRUNE

in human sarcomas and breast carcinomas—a possible mechanism for altering the nm23-H1 activity. *Oncogene*. 20:6881-6890.

- Forus, A., V.A. Florenes, G.M. Maelandsmo, P.S. Meltzer, O. Fodstad, and O. Myklebost. 1993. Mapping of amplification units in the q13-14 region of chromosome 12 in human sarcomas: some amplica do not include MDM2. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 4:1065-1070.
- Friedenstein, A.J. 1980. Stromal Mechanism of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Hematological blood transfusion*. 25:19-29.
- Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and tissue kinetics*. 20:263-272.
- Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, and K.V. Petrakova. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 16:381-390.
- Fuchs, B., and D.J. Pritchard. 2002. Etiology of osteosarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*:40-52.
- Fuster, V., and J. Sanz. 2007. Gene therapy and stem cell therapy for cardiovascular diseases today: a model for translational research. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 4 Suppl 1:S1-8.
- Gangji, V., and J.P. Hauzeur. 2010. Treating osteonecrosis with autologous bone marrow cells. *Skeletal Radiol*. 39:209-211.
- Garcia-Castro, J., R. Alemany, M. Cascallo, J. Martinez-Quintanilla, M. Del Mar Arriero, A. Lassaletta, L. Madero, and M. Ramirez. 2010. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther*.
- Garcia-Castro, J., C. Trigueros, J. Madrenas, J.A. Perez-Simon, R. Rodriguez, and P. Menendez. 2008. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *Journal of cellular and molecular medicine*. 12:2552-2565.
- Gibault, L., G. Perot, F. Chibon, S. Bonnin, P. Lagarde, P. Terrier, J.M. Coindre, and A. Aurias. 2011. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. *J Pathol*. 223:64-71.
- Gillespie, W.J., C.M. Frampton, R.J. Henderson, and P.M. Ryan. 1988. The incidence of cancer following total hip replacement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 70:539-542.
- Gorlick, R., P. Anderson, I. Andrulis, C. Arndt, G.P. Beardsley, M. Bernstein, J. Bridge, N.K. Cheung, J.S. Dome, D. Ebb, T. Gardner, M. Gebhardt, H. Grier, M. Hansen, J. Healey, L. Helman, J. Hock, J. Houghton, P. Houghton, A. Huvos, C. Khanna, M. Kieran, E. Kleinerman, M. Ladanyi, C. Lau, D. Malkin, N. Marina, P. Meltzer, P. Meyers, D. Schofield, C. Schwartz, M.A. Smith, J. Toretsky, M. Tsokos, L. Wexler, J. Wigginton, S. Withrow, M. Schoenfeldt, and B. Anderson. 2003. Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary.

Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 9:5442-5453.

- Guo, L., N. Kawazoe, Y. Fan, Y. Ito, J. Tanaka, T. Tateishi, X. Zhang, and G. Chen. 2008. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on photoreactive polymer-modified surfaces. *Biomaterials.* 29:23-32.
- Gustafson, P. 1994. Soft tissue sarcoma. Epidemiology and prognosis in 508 patients. *Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum.* 259:1-31.
- Hamblen, D.L., and R.L. Carter. 1984. Sarcoma and joint replacement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume.* 66:625-627.
- Hansen, M.F. 2002. Genetic and molecular aspects of osteosarcoma. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions.* 2:554-560.
- Hashimoto, H., Y. Daimaru, M. Tsuneyoshi, and M. Enjoji. 1986. Leiomyosarcoma of the external soft tissues. A clinicopathologic, immunohistochemical, and electron microscopic study. *Cancer.* 57:2077-2088.
- Hashimoto, H., M. Tsuneyoshi, and M. Enjoji. 1985. Malignant smooth muscle tumors of the retroperitoneum and mesentery: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *Journal of surgical oncology.* 28:177-186.
- Hayden, J.B., and B.H. Hoang. 2006. Osteosarcoma: basic science and clinical implications. *The Orthopedic clinics of North America.* 37:1-7.
- He, Q., C. Wan, and G. Li. 2007. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* 25:69-77.
- Helman, L.J., and P. Meltzer. 2003. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer.* 3:685-694.
- Heppner, G.H. 1984. Tumor heterogeneity. *Cancer research.* 44:2259-2265.
- Hermann, P.C., S.L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J.W. Ellwart, M. Guba, C.J. Bruns, and C. Heeschen. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell.* 1:313-323.
- Honzarenko, M., Y. Le, M. Swierkowski, I. Ghiran, A.M. Glodek, and L.E. Silberstein. 2006. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.* 24:1030-1041.
- Horwitz, E.M., D.J. Prockop, L.A. Fitzpatrick, W.W. Koo, P.L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J.C. Marx, R.E. Pyeritz, and M.K. Brenner. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 5:309-313.
- Huang, S., V. Leung, S. Peng, L. Li, F.J. Lu, T. Wang, W. Lu, K.M. Cheung, and G. Zhou. 2011. Developmental definition of MSCs: new insights into pending questions. *Cellular reprogramming.* 13:465-472.

- Hulliger, L. 1956. [Differentiable developmental potencies of blood and lymph cells in vitro]. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 329:289-318.
- Hung, S.C., W.P. Deng, W.K. Yang, R.S. Liu, C.C. Lee, T.C. Su, R.J. Lin, D.M. Yang, C.W. Chang, W.H. Chen, H.J. Wei, and J.G. Gelovani. 2005. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 11:7749-7756.
- Huss, R., C. Lange, E.M. Weissinger, H.J. Kolb, and K. Thalmeier. 2000. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells*. 18:252-260.
- Huvos, A.G., H.Q. Woodard, W.G. Cahan, N.L. Higinbotham, F.W. Stewart, A. Butler, and S.S. Bretsky. 1985. Postradiation osteogenic sarcoma of bone and soft tissues. A clinicopathologic study of 66 patients. *Cancer*. 55:1244-1255.
- Joo, K.M., S.Y. Kim, X. Jin, S.Y. Song, D.S. Kong, J.I. Lee, J.W. Jeon, M.H. Kim, B.G. Kang, Y. Jung, J. Jin, S.C. Hong, W.Y. Park, D.S. Lee, H. Kim, and D.H. Nam. 2008. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 88:808-815.
- Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble. 2006. Cancer stem cells. *The New England journal of medicine*. 355:1253-1261.
- Kadiyala, S., R.G. Young, M.A. Thiede, and S.P. Bruder. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell transplantation*. 6:125-134.
- Kansara, M., and D.M. Thomas. 2007. Molecular pathogenesis of osteosarcoma. *DNA and cell biology*. 26:1-18.
- Karlsson, P., E. Holmberg, A. Samuelsson, K.A. Johansson, and A. Wallgren. 1998. Soft tissue sarcoma after treatment for breast cancer--a Swedish population-based study. *Eur J Cancer*. 34:2068-2075.
- Kassis, I., L. Zangi, R. Rivkin, L. Levdansky, S. Samuel, G. Marx, and R. Gorodetsky. 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone marrow transplantation*. 37:967-976.
- Keel, S.B., K.A. Jaffe, G. Petur Nielsen, and A.E. Rosenberg. 2001. Orthopaedic implant-related sarcoma: a study of twelve cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 14:969-977.
- Kelly, P.N., A. Dakic, J.M. Adams, S.L. Nutt, and A. Strasser. 2007. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*. 317:337.
- Khakoo, A.Y., S. Pati, S.A. Anderson, W. Reid, M.F. Elshal, Rovira, II, A.T. Nguyen, D. Malide, C.A. Combs, G. Hall, J. Zhang, M. Raffeld, T.B. Rogers, W. Stetler-Stevenson, J.A. Frank, M. Reitz, and T. Finkel. 2006. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The Journal of experimental medicine*. 203:1235-1247.

- Kirkpatrick, C.J., A. Alves, H. Kohler, J. Kriegsmann, F. Bittinger, M. Otto, D.F. Williams, and R. Eloy. 2000. Biomaterial-induced sarcoma: A novel model to study preneoplastic change. *The American journal of pathology*. 156:1455-1467.
- Klein, A.K., J.A. Dyck, K.A. Stitzel, J. Shimizu, L.A. Fox, and N. Taylor. 1983. Characterization of canine fetal lymphohematopoiesis: studies of CFUGM, CFUL, and CFUF. *Exp Hematol*. 11:263-274.
- Komarova, S., Y. Kawakami, M.A. Stoff-Khalili, D.T. Curiel, and L. Pereboeva. 2006. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther*. 5:755-766.
- Kon, E., A. Muraglia, A. Corsi, P. Bianco, M. Marcacci, I. Martin, A. Boyde, I. Ruspantini, P. Chistolini, M. Rocca, R. Giardino, R. Cancedda, and R. Quarto. 2000. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*. 49:328-337.
- Krampera, M., G. Pizzolo, G. Aprili, and M. Franchini. 2006. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 39:678-683.
- Krebsbach, P.H., S.A. Kuznetsov, K. Satomura, R.V. Emmons, D.W. Rowe, and P.G. Robey. 1997. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation*. 63:1059-1069.
- Krebsbach, P.H., M.H. Mankani, K. Satomura, S.A. Kuznetsov, and P.G. Robey. 1998. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation*. 66:1272-1278.
- Krivtsov, A.V., D. Twomey, Z. Feng, M.C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J.E. Levine, J. Wang, W.C. Hahn, D.G. Gilliland, T.R. Golub, and S.A. Armstrong. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. 442:818-822.
- Kucerova, L., V. Altanerova, M. Matuskova, S. Tyciakova, and C. Altaner. 2007. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer research*. 67:6304-6313.
- Kurth, T., E. Hedbom, N. Shintani, M. Sugimoto, F.H. Chen, M. Haspl, S. Martinovic, and E.B. Hunziker. 2007. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis Cartilage*. 15:1178-1189.
- Kuznetsov, S.A., P.H. Krebsbach, K. Satomura, J. Kerr, M. Riminucci, D. Benayahu, and P.G. Robey. 1997. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 12:1335-1347.
- Kuznetsov, S.A., M.H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco, and P.G. Robey. 2001. Circulating skeletal stem cells. *The Journal of cell biology*. 153:1133-1140.
- Kynaston, J.A., A.J. Malcolm, A.W. Craft, S.M. Davies, P.H. Jones, D.J. King, C.D. Mitchell, A. Oakhill, and C.A. Stiller. 1993. Chemotherapy in the management of infantile fibrosarcoma. *Medical and pediatric oncology*. 21:488-493.

- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, and J.E. Dick. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 367:645-648.
- Le Blanc, K., I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Gotherstrom, M. Hassan, M. Uzunel, and O. Ringden. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 363:1439-1441.
- Leu, H.J., and M. Makek. 1986. Intramural venous leiomyosarcomas. *Cancer*. 57:1395-1400.
- Li, X., M.T. Lewis, J. Huang, C. Gutierrez, C.K. Osborne, M.F. Wu, S.G. Hilsenbeck, A. Pavlick, X. Zhang, G.C. Chamness, H. Wong, J. Rosen, and J.C. Chang. 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 100:672-679.
- Lim, E., F. Vaillant, D. Wu, N.C. Forrest, B. Pal, A.H. Hart, M.L. Asselin-Labat, D.E. Gyorki, T. Ward, A. Partanen, F. Feleppa, L.I. Huschtscha, H.J. Thorne, S.B. Fox, M. Yan, J.D. French, M.A. Brown, G.K. Smyth, J.E. Visvader, and G.J. Lindeman. 2009. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*. 15:907-913.
- Loebinger, M.R., and S.M. Janes. 2010. Stem cells as vectors for antitumour therapy. *Thorax*. 65:362-369.
- Lu, Y.R., Y. Yuan, X.J. Wang, L.L. Wei, Y.N. Chen, C. Cong, S.F. Li, D. Long, W.D. Tan, Y.Q. Mao, J. Zhang, Y.P. Li, and J.Q. Cheng. 2007. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*. 7:245-251.
- Luk, J.M., P.P. Wang, C.K. Lee, J.H. Wang, and S.T. Fan. 2005. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J Immunol Methods*. 305:39-47.
- Luria, E.A., A.F. Panasyuk, and A.Y. Friedenstein. 1971. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion*. 11:345-349.
- Macconail, L.E., P. Van Hummelen, M. Meyerson, and W.C. Hahn. 2011. Clinical implementation of comprehensive strategies to characterize cancer genomes: opportunities and challenges. *Cancer discovery*. 1:297-311.
- Mack, T.M. 1995. Sarcomas and other malignancies of soft tissue, retroperitoneum, peritoneum, pleura, heart, mediastinum, and spleen. *Cancer*. 75:211-244.
- MacLean, S., W.S. Khan, A.A. Malik, M. Snow, and S. Anand. 2012. Tendon regeneration and repair with stem cells. *Stem cells international*. in press. doi:10.1155/2012/316281.
- Maire, G., J.W. Martin, M. Yoshimoto, S. Chilton-MacNeill, M. Zielenska, and J.A. Squire. 2011. Analysis of miRNA-gene expression-genomic profiles reveals complex mechanisms of microRNA deregulation in osteosarcoma. *Cancer genetics*. 204:138-146.
- Mandahl, N., C.D. Fletcher, P. Dal Cin, I. De Wever, F. Mertens, F. Mitelman, J. Rosai, A. Rydholm, R. Sciot, G. Tallini, H. Van Den Berghe, R. Vanni, and H. Willen. 2000. Comparative cytogenetic study of spindle cell and pleomorphic leiomyosarcomas of soft tissues: a report from the CHAMP Study Group. *Cancer genetics and cytogenetics*. 116:66-73.

- Marcacci, M., E. Kon, V. Moukhachev, A. Lavroukov, S. Kutepov, R. Quarto, M. Mastrogiacomo, and R. Cancedda. 2007. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* 13:947-955.
- Marina, N., M. Gebhardt, L. Teot, and R. Gorlick. 2004. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *The oncologist.* 9:422-441.
- Mark, R.J., J. Poen, L.M. Tran, Y.S. Fu, M.T. Selch, and R.G. Parker. 1994. Postirradiation sarcomas. A single-institution study and review of the literature. *Cancer.* 73:2653-2662.
- Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 103:295-309.
- Masters, J.R., and B. Koberle. 2003. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer.* 3:517-525.
- Maximow, A. 1902. Experimentelle Untersuchungen über entzündliche Neubildung von Bindegewebe. *Zielgers Berit z path Anat u allg Path.* (suppl):S5.
- Maximow, A. 1928. Culture of blood leucocyte: from linfocyte and monocite to connective tissue. *Arch Exp Zellforsch.* 5:169-268.
- Mazhari, R., and J.M. Hare. 2007. Advances in cell-based therapy for structural heart disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 49:387-395.
- McClain, K.L., C.T. Leach, H.B. Jenson, V.V. Joshi, B.H. Pollock, R.T. Parmley, F.J. DiCarlo, E.G. Chadwick, and S.B. Murphy. 1995. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in children with AIDS. *The New England journal of medicine.* 332:12-18.
- Menasche, P. 2011. Cardiac cell therapy: lessons from clinical trials. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 50:258-265.
- Menon, L.G., S. Picinich, R. Koneru, H. Gao, S.Y. Lin, M. Koneru, P. Mayer-Kuckuk, J. Glod, and D. Banerjee. 2007. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells.* 25:520-528.
- Mentzel, T., E. Calonje, and C.D. Fletcher. 1994. Leiomyosarcoma with prominent osteoclast-like giant cells. Analysis of eight cases closely mimicking the so-called giant cell variant of malignant fibrous histiocytoma. *The American journal of surgical pathology.* 18:258-265.
- Merchant, W., E. Calonje, and C.D. Fletcher. 1995. Inflammatory leiomyosarcoma: a morphological subgroup within the heterogeneous family of so-called inflammatory malignant fibrous histiocytoma. *Histopathology.* 27:525-532.
- Mishra, L., R. Derynck, and B. Mishra. 2005. Transforming growth factor-beta signaling in stem cells and cancer. *Science.* 310:68-71.
- Mohseny, A.B., K. Szuhai, S. Romeo, E.P. Buddingh, I. Briaire-de Bruijn, D. de Jong, M. van Pel, A.M. Cleton-Jansen, and P.C. Hogendoorn. 2009. Osteosarcoma originates from

mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol.* 219:294-305.

Moosmann, S., J. Hutter, C. Moser, F. Krombach, and R. Huss. 2005. Milieu-adopted in vitro and in vivo differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones. *Cells Tissues Organs.* 179:91-101.

Morandi, F., L. Raffaghello, G. Bianchi, F. Meloni, A. Salis, E. Millo, S. Ferrone, V. Barnaba, and V. Pistoia. 2008. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells.* 26:1275-1287.

Mosna, F., L. Sensebe, and M. Krampera. 2010. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem cells and development.* 19:1449-1470.

Myhre-Jensen, O. 1981. A consecutive 7-year series of 1331 benign soft tissue tumours. Clinicopathologic data. Comparison with sarcomas. *Acta orthopaedica Scandinavica.* 52:287-293.

Nagao, H., K. Ijiri, M. Hirotsu, Y. Ishidou, T. Yamamoto, S. Nagano, T. Takizawa, K. Nakashima, S. Komiya, and T. Setoguchi. 2011. Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma. *J Pathol.* 224:169-179.

Nagoshi, N., S. Shibata, Y. Kubota, M. Nakamura, Y. Nagai, E. Satoh, S. Morikawa, Y. Okada, Y. Mabuchi, H. Katoh, S. Okada, K. Fukuda, T. Suda, Y. Matsuzaki, Y. Toyama, and H. Okano. 2008. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell stem cell.* 2:392-403.

Nakamizo, A., F. Marini, T. Amano, A. Khan, M. Studeny, J. Gumin, J. Chen, S. Hentschel, G. Vecil, J. Dembinski, M. Andreeff, and F.F. Lang. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer research.* 65:3307-3318.

Nakamura, K., Y. Ito, Y. Kawano, K. Kurozumi, M. Kobune, H. Tsuda, A. Bizen, O. Honmou, Y. Niitsu, and H. Hamada. 2004. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene therapy.* 11:1155-1164.

Ning, H., F. Yang, M. Jiang, L. Hu, K. Feng, J. Zhang, Z. Yu, B. Li, C. Xu, Y. Li, J. Wang, J. Hu, X. Lou, and H. Chen. 2008. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia.* 22:593-599.

Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194:23-28.

O'Brien, C.A., A. Pollett, S. Gallinger, and J.E. Dick. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 445:106-110.

O'Hare, T., A.S. Corbin, and B.J. Druker. 2006. Targeted CML therapy: controlling drug resistance, seeking cure. *Current opinion in genetics & development.* 16:92-99.

Oda, Y., K. Miyajima, K. Kawaguchi, S. Tamiya, Y. Oshiro, Y. Hachitanda, M. Oya, Y. Iwamoto, and M. Tsuneyoshi. 2001. Pleomorphic leiomyosarcoma: clinicopathologic and immunohistochemical study with special emphasis on its distinction from ordinary

leiomyosarcoma and malignant fibrous histiocytoma. *The American journal of surgical pathology*. 25:1030-1038.

- Ogawa, M., A.C. LaRue, and C.J. Drake. 2006. Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications. *Blood*. 108:2893-2896.
- Ogden, A.T., A.E. Waziri, R.A. Lochhead, D. Fusco, K. Lopez, J.A. Ellis, J. Kang, M. Assanah, G.M. McKhann, M.B. Sisti, P.C. McCormick, P. Canoll, and J.N. Bruce. 2008. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery*. 62:505-514; discussion 514-505.
- Oravec-Wilson, K.I., S.T. Philips, O.H. Yilmaz, H.M. Ames, L. Li, B.D. Crawford, A.M. Gauvin, P.C. Lucas, K. Sitwala, J.R. Downing, S.J. Morrison, and T.S. Ross. 2009. Persistence of leukemia-initiating cells in a conditional knockin model of an imatinib-responsive myeloproliferative disorder. *Cancer Cell*. 16:137-148.
- Orkin, S.H., and L.I. Zon. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 132:631-644.
- Otano-Joos, M., G. Mechttersheimer, S. Ohl, K.K. Wilgenbus, W. Scheurlen, T. Lehnert, F. Willeke, H.F. Otto, P. Lichter, and S. Joos. 2000. Detection of chromosomal imbalances in leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization and interphase cytogenetics. *Cytogenetics and cell genetics*. 90:86-92.
- Owen, M. 1985. Lineage of osteogenic cells and their relationship to stromal system. *Peck WA (ed.) Bone and mineral research*. New York: Elsevier. 3:1-25.
- Owen, M. 1988. Marrow stromal stem cells. *Journal of cell science. Supplement*. 10:63-76.
- Parker, S.L., T. Tong, S. Bolden, and P.A. Wingo. 1996. Cancer statistics, 1996. *CA: a cancer journal for clinicians*. 46:5-27.
- Patterson, H., S. Gill, C. Fisher, M.G. Law, H. Jayatilake, C.D. Fletcher, M. Thomas, R. Grimer, B.A. Gusterson, and C.S. Cooper. 1994. Abnormalities of the p53 MDM2 and DCC genes in human leiomyosarcomas. *Br J Cancer*. 69:1052-1058.
- Paul, J. 1958. Establishment of permanent cell strains from human adult peripheral blood. *Nature*. 182:808.
- Pece, S., D. Tosoni, S. Confalonieri, G. Mazzarol, M. Vecchi, S. Ronzoni, L. Bernard, G. Viale, P.G. Pelicci, and P.P. Di Fiore. 2010. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell*. 140:62-73.
- Penman, H.G., and P.A. Ring. 1984. Osteosarcoma in association with total hip replacement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 66:632-634.
- Pierce, G.B., and W.C. Speers. 1988. Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer research*. 48:1996-2004.
- Piersma, A.H., R.E. Ploemacher, K.G. Brockbank, P.G. Nikkels, and C.P. Ottenheim. 1985. Migration of fibroblastoid stromal cells in murine blood. *Cell and tissue kinetics*. 18:589-595.

- Pisters, P.W., D.H. Leung, J. Woodruff, W. Shi, and M.F. Brennan. 1996. Analysis of prognostic factors in 1,041 patients with localized soft tissue sarcomas of the extremities. *J Clin Oncol.* 14:1679-1689.
- Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143-147.
- Qiao, L., Z. Xu, T. Zhao, Z. Zhao, M. Shi, R.C. Zhao, L. Ye, and X. Zhang. 2008. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell research.* 18:500-507.
- Qiao, L.X., Z. L. Tan, X. et al. 2007. Investigation of inhibition of Wnt/B-catenin pathway in breast cancer cell mediated by Dkk-1 released from human mesenchymal stem cells. *Prog Biochem Biophys.* 34:702-708.
- Quarto, R., M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S.M. Kutepov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon, and M. Marcacci. 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England journal of medicine.* 344:385-386.
- Quintana, E., M. Shackleton, H.R. Foster, D.R. Fullen, M.S. Sabel, T.M. Johnson, and S.J. Morrison. 2010. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell.* 18:510-523.
- Quintana, E., M. Shackleton, M.S. Sabel, D.R. Fullen, T.M. Johnson, and S.J. Morrison. 2008. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature.* 456:593-598.
- Rajani, B., T.A. Smith, J.D. Reith, and J.R. Goldblum. 1999. Retroperitoneal leiomyosarcomas unassociated with the gastrointestinal tract: a clinicopathologic analysis of 17 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 12:21-28.
- Ranchod, M., and R.L. Kempson. 1977. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneum: a pathologic analysis of 100 cases. *Cancer.* 39:255-262.
- Rangan, S.R. 1967. Origin of the fibroblastic growths in chicken buffy coat macrophage cultures. *Exp Cell Res.* 46:477-487.
- Ricci-Vitiani, L., D.G. Lombardi, E. Pillozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, and R. De Maria. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 445:111-115.
- Ringden, O., M. Uzunel, I. Rasmusson, M. Remberger, B. Sundberg, H. Lonnie, H.U. Marschall, A. Dlugosz, A. Szakos, Z. Hassan, B. Omazic, J. Aschan, L. Barkholt, and K. Le Blanc. 2006. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 81:1390-1397.
- Rocheffort, G.Y., B. Delorme, A. Lopez, O. Herault, P. Bonnet, P. Charbord, V. Eder, and J. Domenech. 2006. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells.* 24:2202-2208.

- Rodriguez, R., J. Garcia-Castro, C. Trigueros, M. Garcia Arranz, and P. Menendez. 2012a. Multipotent mesenchymal stromal cells: clinical applications and cancer modeling. *Advances in experimental medicine and biology*. 741:187-205.
- Rodriguez, R., R. Rubio, and P. Menendez. 2012b. Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells. *Cell research*. 22:62-77.
- Roesch, A., M. Fukunaga-Kalabis, E.C. Schmidt, S.E. Zabierowski, P.A. Brafford, A. Vultur, D. Basu, P. Gimotty, T. Vogt, and M. Herlyn. 2010. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*. 141:583-594.
- Romieu-Mourez, R., M. Francois, M.N. Boivin, J. Stagg, and J. Galipeau. 2007. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol*. 179:1549-1558.
- Ross, R., and J.W. Lillywhite. 1965. The fate of buffy coat cells grown in subcutaneously implanted diffusion chambers. A light and electron microscopic study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 14:1568-1585.
- Rydholm, A. 1983. Management of patients with soft-tissue tumors. Strategy developed at a regional oncology center. *Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum*. 203:13-77.
- Salerno, A., R. Levato, M.A. Mateos-Timoneda, E. Engel, P.A. Netti, and J.A. Planell. 2012. Modular polylactic acid microparticle-based scaffolds prepared via microfluidic emulsion/solvent displacement process: Fabrication, characterization, and in vitro mesenchymal stem cells interaction study. *Journal of biomedical materials research. Part A*.
- Sandberg, A.A., and J.A. Bridge. 2003. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer genetics and cytogenetics*. 145:1-30.
- Schatton, T., G.F. Murphy, N.Y. Frank, K. Yamaura, A.M. Waaga-Gasser, M. Gasser, Q. Zhan, S. Jordan, L.M. Duncan, C. Weishaupt, R.C. Fuhlbrigge, T.S. Kupper, M.H. Sayegh, and M.H. Frank. 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. 451:345-349.
- Shackleton, M., E. Quintana, E.R. Fearon, and S.J. Morrison. 2009. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*. 138:822-829.
- Shakibaei, M. 1998. Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res*. 240:95-106.
- Sharma, S., A. Panitch, and C.P. Neu. 2012. Incorporation of an Aggrecan Mimic Prevents Proteolytic Degradation of Anisotropic Cartilage Analogs. *Acta biomaterialia*.
- Sharma, S.V., D.Y. Lee, B. Li, M.P. Quinlan, F. Takahashi, S. Maheswaran, U. McDermott, N. Azizian, L. Zou, M.A. Fischbach, K.K. Wong, K. Brandstetter, B. Wittner, S. Ramaswamy, M. Classon, and J. Settleman. 2010. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 141:69-80.

- Shi, M., Z.W. Liu, and F.S. Wang. 2011. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology*. 164:1-8.
- Shmelkov, S.V., J.M. Butler, A.T. Hooper, A. Hormigo, J. Kushner, T. Milde, R. St Clair, M. Baljevic, I. White, D.K. Jin, A. Chadburn, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, N.W. Gale, G. Thurston, G.D. Yancopoulos, M. D'Angelica, N. Kemeny, D. Lyden, and S. Rafii. 2008. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133-metastatic colon cancer cells initiate tumors. *The Journal of clinical investigation*. 118:2111-2120.
- Shmookler, B.M., and D.H. Lauer. 1983. Retroperitoneal leiomyosarcoma. A clinicopathologic analysis of 36 cases. *The American journal of surgical pathology*. 7:269-280.
- Sikic, B.I., R. Tibshirani, and N.J. Lacayo. 2008. Genomics of childhood leukemias: the virtue of complexity. *J Clin Oncol*. 26:4367-4368.
- Singh, S.K., C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, and P.B. Dirks. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432:396-401.
- Skubitz, K.M., and D.R. D'Adamo. 2007. Sarcoma. *Mayo Clinic proceedings*. *Mayo Clinic*. 82:1409-1432.
- Sonabend, A.M., I.V. Ulasov, M.A. Tyler, A.A. Rivera, J.M. Mathis, and M.S. Lesniak. 2008. Mesenchymal stem cells effectively deliver an oncolytic adenovirus to intracranial glioma. *Stem Cells*. 26:831-841.
- Sordi, V., R. Melzi, A. Mercalli, R. Formicola, C. Doglioni, F. Tiboni, G. Ferrari, R. Nano, K. Chwalek, E. Lammert, E. Bonifacio, D. Borg, and L. Piemonti. 2010. Mesenchymal cells appearing in pancreatic tissue culture are bone marrow-derived stem cells with the capacity to improve transplanted islet function. *Stem Cells*. 28:140-151.
- Spees, J.L., S.D. Olson, J. Ylostalo, P.J. Lynch, J. Smith, A. Perry, A. Peister, M.Y. Wang, and D.J. Prockop. 2003. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:2397-2402.
- Stagg, J. 2007. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue antigens*. 69:1-9.
- Stagg, J. 2008. Mesenchymal stem cells in cancer. *Stem Cell Rev*. 4:119-124.
- Stagg, J., L. Lejeune, A. Paquin, and J. Galipeau. 2004. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther*. 15:597-608.
- Stagg, J., S. Pommey, N. Eliopoulos, and J. Galipeau. 2006. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 107:2570-2577.
- Stirling, G.A., and V.V. Kakkar. 1969. Cells in the circulating blood capable of producing connective tissue. *British journal of experimental pathology*. 50:51-55.

- Stoff-Khalili, M.A., A.A. Rivera, J.M. Mathis, N.S. Banerjee, A.S. Moon, A. Hess, R.P. Rocconi, T.M. Numnum, M. Everts, L.T. Chow, J.T. Douglas, G.P. Siegal, Z.B. Zhu, H.G. Bender, P. Dall, A. Stoff, L. Pereboeva, and D.T. Curiel. 2007. Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*. 105:157-167.
- Studený, M., F.C. Marini, J.L. Dembinski, C. Zompetta, M. Cabreira-Hansen, B.N. Bekele, R.E. Champlin, and M. Andreeff. 2004. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*. 96:1593-1603.
- Svarvar, C., T. Bohling, O. Berlin, P. Gustafson, G. Folleras, B. Bjerkehagen, H.A. Domanski, K. Sundby Hall, E. Tukiainen, and C. Blomqvist. 2007. Clinical course of nonvisceral soft tissue leiomyosarcoma in 225 patients from the Scandinavian Sarcoma Group. *Cancer*. 109:282-291.
- Swanson, P.E., M.R. Wick, and L.P. Dehner. 1991. Leiomyosarcoma of somatic soft tissues in childhood: an immunohistochemical analysis of six cases with ultrastructural correlation. *Human pathology*. 22:569-577.
- Takashima, Y., T. Era, K. Nakao, S. Kondo, M. Kasuga, A.G. Smith, and S. Nishikawa. 2007. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 129:1377-1388.
- Tondreau, T., N. Meuleman, A. Delforge, M. Dejeneffe, R. Leroy, M. Massy, C. Mortier, D. Bron, and L. Lagneaux. 2005. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells*. 23:1105-1112.
- Toro, J.R., L.B. Travis, H.J. Wu, K. Zhu, C.D. Fletcher, and S.S. Devesa. 2006. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: An analysis of 26,758 cases. *Int J Cancer*. 119:2922-2930.
- Tschoep, K., A. Kohlmann, M. Schlemmer, T. Haferlach, and R.D. Issels. 2007. Gene expression profiling in sarcomas. *Critical reviews in oncology/hematology*. 63:111-124.
- Tse, W.T., J.D. Pendleton, W.M. Beyer, M.C. Egalka, and E.C. Guinan. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 75:389-397.
- Tucker, M.A., G.J. D'Angio, J.D. Boice, Jr., L.C. Strong, F.P. Li, M. Stovall, B.J. Stone, D.M. Green, F. Lombardi, W. Newton, and et al. 1987. Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children. *The New England journal of medicine*. 317:588-593.
- Varela-Duran, J., H. Oliva, and J. Rosai. 1979. Vascular leiomyosarcoma: the malignant counterpart of vascular leiomyoma. *Cancer*. 44:1684-1691.
- Vermeulen, L., M.R. Sprick, K. Kemper, G. Stassi, and J.P. Medema. 2008. Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ*. 15:947-958.
- Vianello, F., and F. Dazzi. 2008. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: a double edged sword? *Leukemia*. 22:463-465.

- Visvader, J.E. 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*. 469:314-322.
- Wan, C., Q. He, and G. Li. 2006. Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 24:610-618.
- Wang, J., P.O. Sakariassen, O. Tsinkalovsky, H. Immervoll, S.O. Boe, A. Svendsen, L. Prestegarden, G. Rosland, F. Thorsen, L. Stuhr, A. Molven, R. Bjerkvig, and P.O. Enger. 2008. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*. 122:761-768.
- Wang, L.L. 2005. Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer J*. 11:294-305.
- Wang, R., Y.J. Lu, C. Fisher, J.A. Bridge, and J. Shipley. 2001. Characterization of chromosome aberrations associated with soft-tissue leiomyosarcomas by twenty-four-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis. *Genes, chromosomes & cancer*. 31:54-64.
- Wang, Y., H.E. Johnsen, S. Mortensen, L. Bindslev, R.S. Ripa, M. Haack-Sorensen, E. Jorgensen, W. Fang, and J. Kastrup. 2006. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart*. 92:768-774.
- Weatherby, R.P., D.C. Dahlin, and J.C. Ivins. 1981. Postradiation sarcoma of bone: review of 78 Mayo Clinic cases. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*. 56:294-306.
- Wehner, M.S., J.L. Humphreys, and F.E. Sharkey. 2000. Epididymal rhabdomyoma: report of a case, including histologic and immunohistochemical findings. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 124:1518-1519.
- Weiss, R.A., D. Whitby, S. Talbot, P. Kellam, and C. Boshoff. 1998. Human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*:51-54.
- Whelan, J.S. 1997. Osteosarcoma. *Eur J Cancer*. 33:1611-1618; discussion 1618-1619.
- Wile, A.G., H.L. Evans, and M.M. Romsdahl. 1981. Leiomyosarcoma of soft tissue: a clinicopathologic study. *Cancer*. 48:1022-1032.
- Williams, R.T., W. den Besten, and C.J. Sherr. 2007. Cytokine-dependent imatinib resistance in mouse BCR-ABL+, Arf-null lymphoblastic leukemia. *Genes & development*. 21:2283-2287.
- Williams, S.A., H.L. Maecker, D.M. French, J. Liu, A. Gregg, L.B. Silverstein, T.C. Cao, R.A. Carano, and V.M. Dixit. 2011. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell*. 146:918-930.
- Wu, G.D., J.A. Nolta, Y.S. Jin, M.L. Barr, H. Yu, V.A. Starnes, and D.V. Cramer. 2003. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation*. 75:679-685.

- Wu, Y., L. Chen, P.G. Scott, and E.E. Tredget. 2007. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 25:2648-2659.
- Ye, Y., L.M. Pringle, A.W. Lau, D.N. Riquelme, H. Wang, T. Jiang, D. Lev, A. Welman, G.A. Blobel, A.M. Oliveira, and M.M. Chou. 2010. TRE17/USP6 oncogene translocated in aneurysmal bone cyst induces matrix metalloproteinase production via activation of NF-kappaB. *Oncogene*. 29:3619-3629.
- Yong, R.L., N. Shinojima, J. Fueyo, J. Gumin, G.G. Vecil, F.C. Marini, O. Bogler, M. Andreeff, and F.F. Lang. 2009. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer research*. 69:8932-8940.
- Young, N.P., D. Crowley, and T. Jacks. 2011. Uncoupling cancer mutations reveals critical timing of p53 loss in sarcomagenesis. *Cancer research*. 71:4040-4047.
- Zahm, S.H., and J.F. Fraumeni, Jr. 1997. The epidemiology of soft tissue sarcoma. *Seminars in oncology*. 24:504-514.
- Zhou, B.B., H. Zhang, M. Damelin, K.G. Geles, J.C. Grindley, and P.B. Dirks. 2009. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*. 8:806-823.
- Abarbanell, A.M., Y. Wang, J.L. Herrmann, B.R. Weil, J.A. Poynter, M.C. Manukyan, and D.R. Meldrum. 2010. Toll-like receptor 2 mediates mesenchymal stem cell-associated myocardial recovery and VEGF production following acute ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 298:H1529-1536.
- Abe, E., M. Yamamoto, Y. Taguchi, B. Lecka-Czernik, C.A. O'Brien, A.N. Economides, N. Stahl, R.L. Jilka, and S.C. Manolagas. 2000. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 15:663-673.
- Adorno, M., M. Cordenonsi, M. Montagner, S. Dupont, C. Wong, B. Hann, A. Solari, S. Bobisse, M.B. Rondina, V. Guzzardo, A.R. Parenti, A. Rosato, S. Bicciato, A. Balmain, and S. Piccolo. 2009. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell*. 137:87-98.
- Antonescu, C.R. 2011. The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. *J Pathol*. 223:251-261.
- Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*. 8:301-316.
- Bao, S., Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, and J.N. Rich. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 444:756-760.
- Battiwalla, M., and P. Hematti. 2009. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 11:503-515.

- Battula, V.L., K.W. Evans, B.G. Hollier, Y. Shi, F.C. Marini, A. Ayyanan, R.Y. Wang, C. Brisken, R. Guerra, M. Andreeff, and S.A. Mani. 2010. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 28:1435-1445.
- Beausejour, C.M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S.W. Lowe, P. Yaswen, and J. Campisi. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*. 22:4212-4222.
- Benevolenskaya, E.V., H.L. Murray, P. Branton, R.A. Young, and W.G. Kaelin, Jr. 2005. Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation. *Molecular cell*. 18:623-635.
- Berlin, O., B. Stener, L.G. Kindblom, and L. Angervall. 1984. Leiomyosarcomas of venous origin in the extremities. A correlated clinical, roentgenologic, and morphologic study with diagnostic and surgical implications. *Cancer*. 54:2147-2159.
- Berman, S.D., E. Calo, A.S. Landman, P.S. Danielian, E.S. Miller, J.C. West, B.D. Fonhoue, A. Caron, R. Bronson, M.L. Bouxsein, S. Mukherjee, and J.A. Lees. 2008. Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:11851-11856.
- Bernhard, J.C., and A. Panitch. 2012. Synthesis and characterization of an aggrecan mimic. *Acta biomaterialia*. 8:1543-1550.
- Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*. 2:313-319.
- Bissell, M.J., and W.C. Hines. 2011. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine*. 17:320-329.
- Boland, G.M., G. Perkins, D.J. Hall, and R.S. Tuan. 2004. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 93:1210-1230.
- Bonnet, D., and J.E. Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 3:730-737.
- Bookstein, R., and W.H. Lee. 1991. Molecular genetics of the retinoblastoma suppressor gene. *Critical reviews in oncogenesis*. 2:211-227.
- Borovski, T., E.M.F. De Sousa, L. Vermeulen, and J.P. Medema. 2011. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res*. 71:634-639.
- Boshoff, C., and R.A. Weiss. 1998. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Advances in cancer research*. 75:57-86.
- Brehm, A., and T. Kouzarides. 1999. Retinoblastoma protein meets chromatin. *Trends in biochemical sciences*. 24:142-145.
- Bruder, S.P., K.H. Kraus, V.M. Goldberg, and S. Kadiyala. 1998a. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 80:985-996.

- Bruder, S.P., A.A. Kurth, M. Shea, W.C. Hayes, N. Jaiswal, and S. Kadiyala. 1998b. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 16:155-162.
- Burkhart, D.L., and J. Sage. 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 8:671-682.
- Calo, E., J.A. Quintero-Estades, P.S. Danielian, S. Nedelcu, S.D. Berman, and J.A. Lees. 2010. Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature*. 466:1110-1114.
- Callaghan, D.A., L. Dong, S.M. Callaghan, Y.X. Hou, L. Dagnino, and R.S. Slack. 1999. Neural precursor cells differentiating in the absence of Rb exhibit delayed terminal mitosis and deregulated E2F 1 and 3 activity. *Developmental biology*. 207:257-270.
- Castro-Malaspina, H., R.E. Gay, G. Resnick, N. Kapoor, P. Meyers, D. Chiarieri, S. McKenzie, H.E. Broxmeyer, and M.A. Moore. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 56:289-301.
- Cavarretta, I.T., V. Altanerova, M. Matuskova, L. Kucerova, Z. Culig, and C. Altaner. 2010. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing prodrug-converting enzyme inhibit human prostate tumor growth. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 18:223-231.
- Classon, M., and N. Dyson. 2001. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res*. 264:135-147.
- Claudio, P.P., T. Tonini, and A. Giordano. 2002. The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome biology*. 3:reviews3012.
- Clevers, H. 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*. 17:313-319.
- Cobrinik, D. 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*. 24:2796-2809.
- Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano. 2007. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 130:223-233.
- Corselli, M., C.J. Chin, C. Parekh, A. Sahaghian, W. Wang, S. Ge, D. Evseenko, X. Wang, E. Montelatici, L. Lazzari, G.M. Crooks, and B. Peault. 2013. Perivascular support of human hematopoietic cells. *Blood*.
- Courtois-Cox, S., S.L. Jones, and K. Cichowski. 2008. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*. 27:2801-2809.
- Crisan, M., S. Yap, L. Casteilla, C.W. Chen, M. Corselli, T.S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B.M. Deasy, S. Badylak, H.J. Buhning, J.P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, and B. Peault. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*. 3:301-313.
- Chapel, A., J.M. Bertho, M. Bensidhoum, L. Fouillard, R.G. Young, J. Frick, C. Demarquay, F. Cuvelier, E. Mathieu, F. Trompier, N. Dudoignon, C. Germain, C. Mazurier, J. Aigueperse, J. Borneman, N.C. Gorin, P. Gourmelon, and D. Thierry. 2003.

- Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* 5:1028-1038.
- Chen, D., I. Livne-bar, J.L. Vanderluit, R.S. Slack, M. Agochiya, and R. Bremner. 2004a. Cell-specific effects of RB or RB/p107 loss on retinal development implicate an intrinsically death-resistant cell-of-origin in retinoblastoma. *Cancer Cell.* 5:539-551.
- Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy. 2004b. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 22:233-241.
- Chen, G., C. Deng, and Y.P. Li. 2012. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences.* 8:272-288.
- Choy, L., and R. Derynck. 2003. Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *The Journal of biological chemistry.* 278:9609-9619.
- da Silva Meirelles, L., A.I. Caplan, and N.B. Nardi. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 26:2287-2299.
- Dahl, I., and L. Angervall. 1974. Cutaneous and subcutaneous leiomyosarcoma. A clinicopathologic study of 47 patients. *Pathologia Europaea.* 9:307-315.
- Dannenbergh, J.H., and H.P. te Riele. 2006. The retinoblastoma gene family in cell cycle regulation and suppression of tumorigenesis. *Results and problems in cell differentiation.* 42:183-225.
- Daria, D., M.D. Filippi, E.S. Knudsen, R. Faccio, Z. Li, T. Kalfa, and H. Geiger. 2008. The retinoblastoma tumor suppressor is a critical intrinsic regulator for hematopoietic stem and progenitor cells under stress. *Blood.* 111:1894-1902.
- de Saint Aubain Somerhausen, N., and C.D. Fletcher. 1999. Leiomyosarcoma of soft tissue in children: clinicopathologic analysis of 20 cases. *The American journal of surgical pathology.* 23:755-763.
- Deb, S.P., R.M. Munoz, D.R. Brown, M.A. Subler, and S. Deb. 1994. Wild-type human p53 activates the human epidermal growth factor receptor promoter. *Oncogene.* 9:1341-1349.
- Dei Tos, A.P., R. Maestro, C. Doglioni, S. Piccinin, D.D. Libera, M. Boiocchi, and C.D. Fletcher. 1996. Tumor suppressor genes and related molecules in leiomyosarcoma. *The American journal of pathology.* 148:1037-1045.
- Deschaseaux, F., F. Gindraux, R. Saadi, L. Obert, D. Chalmers, and P. Herve. 2003. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45med,low phenotype. *British journal of haematology.* 122:506-517.
- Deshpande, A., and P.W. Hinds. 2006. The retinoblastoma protein in osteoblast differentiation and osteosarcoma. *Current molecular medicine.* 6:809-817.

- Dexter, T.M. 1982. Stromal cell associated haemopoiesis. *Journal of cellular physiology. Supplement.* 1:87-94.
- Dezawa, M., H. Kanno, M. Hoshino, H. Cho, N. Matsumoto, Y. Itokazu, N. Tajima, H. Yamada, H. Sawada, H. Ishikawa, T. Mimura, M. Kitada, Y. Suzuki, and C. Ide. 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *The Journal of clinical investigation.* 113:1701-1710.
- Dick, J.E. 2008. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 112:4793-4807.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8:315-317.
- Donehower, L.A., M. Harvey, B.L. Slagle, M.J. McArthur, C.A. Montgomery, Jr., J.S. Butel, and A. Bradley. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 356:215-221.
- Doorbar, J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 110:525-541.
- Dorfman, H.D., and B. Czerniak. 1995. Bone cancers. *Cancer.* 75:203-210.
- Dyer, M.A., and R. Bremner. 2005. The search for the retinoblastoma cell of origin. *Nat Rev Cancer.* 5:91-101.
- El-Rifai, W., M. Sarlomo-Rikala, S. Knuutila, and M. Miettinen. 1998. DNA copy number changes in development and progression in leiomyosarcomas of soft tissues. *The American journal of pathology.* 153:985-990.
- Elkahloun, A.G., M. Bittner, K. Hoskins, R. Gemmill, and P.S. Meltzer. 1996. Molecular cytogenetic characterization and physical mapping of 12q13-15 amplification in human cancers. *Genes, chromosomes & cancer.* 17:205-214.
- Eriksson, M., L. Hardell, and H.O. Adami. 1990. Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 82:486-490.
- Farshid, G., M. Pradhan, J. Goldblum, and S.W. Weiss. 2002. Leiomyosarcoma of somatic soft tissues: a tumor of vascular origin with multivariate analysis of outcome in 42 cases. *The American journal of surgical pathology.* 26:14-24.
- Feng, B., and L. Chen. 2009. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals.* 24:717-721.
- Ferguson, K.L., and R.S. Slack. 2001. The Rb pathway in neurogenesis. *Neuroreport.* 12:A55-62.
- Ferguson, K.L., J.L. Vanderluit, J.M. Hebert, W.C. McIntosh, E. Tibbo, J.G. MacLaurin, D.S. Park, V.A. Wallace, M. Vooijs, S.K. McConnell, and R.S. Slack. 2002. Telencephalon-specific Rb knockouts reveal enhanced neurogenesis, survival and abnormal cortical development. *The EMBO journal.* 21:3337-3346.

- Ferreira, R., I. Naguibneva, L.L. Pritchard, S. Ait-Si-Ali, and A. Harel-Bellan. 2001. The Rb/chromatin connection and epigenetic control: opinion. *Oncogene*. 20:3128-3133.
- Florenes, V.A., G.M. Maelandsmo, A. Forus, A. Andreassen, O. Myklebost, and O. Fodstad. 1994. MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J Natl Cancer Inst*. 86:1297-1302.
- Fortier, L.A., A.J. Nixon, J. Williams, and C.S. Cable. 1998. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research*. 59:1182-1187.
- Forus, A., J.M. Berner, L.A. Meza-Zepeda, G. Saeter, D. Mischke, O. Fodstad, and O. Myklebost. 1998. Molecular characterization of a novel amplicon at 1q21-q22 frequently observed in human sarcomas. *Br J Cancer*. 78:495-503.
- Forus, A., A. D'Angelo, J. Henriksen, G. Merla, G.M. Maelandsmo, V.A. Florenes, S. Olivieri, B. Bjerkehagen, L.A. Meza-Zepeda, F. del Vecchio Blanco, C. Muller, F. Sanvito, J. Kononen, J.M. Nesland, O. Fodstad, A. Reymond, O.P. Kallioniemi, G. Arrigoni, A. Ballabio, O. Myklebost, and M. Zollo. 2001. Amplification and overexpression of PRUNE in human sarcomas and breast carcinomas-a possible mechanism for altering the nm23-H1 activity. *Oncogene*. 20:6881-6890.
- Forus, A., V.A. Florenes, G.M. Maelandsmo, P.S. Meltzer, O. Fodstad, and O. Myklebost. 1993. Mapping of amplification units in the q13-14 region of chromosome 12 in human sarcomas: some amplicons do not include MDM2. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 4:1065-1070.
- Frazier, M.W., X. He, J. Wang, Z. Gu, J.L. Cleveland, and G.P. Zambetti. 1998. Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Molecular and cellular biology*. 18:3735-3743.
- Friedenstein, A.J. 1980. Stromal Mechanism of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Hematological blood transfusion*. 25:19-29.
- Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*. 3:393-403.
- Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and tissue kinetics*. 20:263-272.
- Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, and K.V. Petrakova. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 16:381-390.
- Friedman, M.S., M.W. Long, and K.D. Hankenson. 2006. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *Journal of cellular biochemistry*. 98:538-554.
- Friend, S.H., R. Bernards, S. Rogelj, R.A. Weinberg, J.M. Rapaport, D.M. Albert, and T.P. Dryja. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 323:643-646.

- Fuchs, B., and D.J. Pritchard. 2002. Etiology of osteosarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*:40-52.
- Fuster, V., and J. Sanz. 2007. Gene therapy and stem cell therapy for cardiovascular diseases today: a model for translational research. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 4 Suppl 1:S1-8.
- Gangji, V., and J.P. Hauzeur. 2010. Treating osteonecrosis with autologous bone marrow cells. *Skeletal Radiol*. 39:209-211.
- Garcia-Cao, M., S. Gonzalo, D. Dean, and M.A. Blasco. 2002. A role for the Rb family of proteins in controlling telomere length. *Nature genetics*. 32:415-419.
- Garcia-Castro, J., R. Alemany, M. Cascallo, J. Martinez-Quintanilla, M. Del Mar Arriero, A. Lassaletta, L. Madero, and M. Ramirez. 2010. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther*.
- Garcia-Castro, J., C. Trigueros, J. Madrenas, J.A. Perez-Simon, R. Rodriguez, and P. Menendez. 2008. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J Cell Mol Med*. 12:2552-2565.
- Gaur, T., C.J. Lengner, H. Hovhannisyan, R.A. Bhat, P.V. Bodine, B.S. Komm, A. Javed, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, G.S. Stein, and J.B. Lian. 2005. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 280:33132-33140.
- Gibault, L., G. Perot, F. Chibon, S. Bonnin, P. Lagarde, P. Terrier, J.M. Coindre, and A. Aurias. 2011. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. *J Pathol*. 223:64-71.
- Gonzalo, S., and M.A. Blasco. 2005. Role of Rb family in the epigenetic definition of chromatin. *Cell Cycle*. 4:752-755.
- Gorlick, R., P. Anderson, I. Andrulis, C. Arndt, G.P. Beardsley, M. Bernstein, J. Bridge, N.K. Cheung, J.S. Dome, D. Ebb, T. Gardner, M. Gebhardt, H. Grier, M. Hansen, J. Healey, L. Helman, J. Hock, J. Houghton, P. Houghton, A. Huvos, C. Khanna, M. Kieran, E. Kleinerman, M. Ladanyi, C. Lau, D. Malkin, N. Marina, P. Meltzer, P. Meyers, D. Schofield, C. Schwartz, M.A. Smith, J. Toretsky, M. Tsokos, L. Wexler, J. Wigginton, S. Withrow, M. Schoenfeldt, and B. Anderson. 2003. Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 9:5442-5453.
- Guo, L., N. Kawazoe, Y. Fan, Y. Ito, J. Tanaka, T. Tateishi, X. Zhang, and G. Chen. 2008. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on photoreactive polymer-modified surfaces. *Biomaterials*. 29:23-32.
- Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis, and J. Bartek. 2008. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 319:1352-1355.
- Hansen, M.F. 2002. Genetic and molecular aspects of osteosarcoma. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2:554-560.

- Hartmann, C. 2006. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* 16:151-158.
- Hashimoto, H., Y. Daimaru, M. Tsuneyoshi, and M. Enjoji. 1986. Leiomyosarcoma of the external soft tissues. A clinicopathologic, immunohistochemical, and electron microscopic study. *Cancer.* 57:2077-2088.
- Hashimoto, H., M. Tsuneyoshi, and M. Enjoji. 1985. Malignant smooth muscle tumors of the retroperitoneum and mesentery: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *Journal of surgical oncology.* 28:177-186.
- Hayden, J.B., and B.H. Hoang. 2006. Osteosarcoma: basic science and clinical implications. *The Orthopedic clinics of North America.* 37:1-7.
- Helman, L.J., and P. Meltzer. 2003. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer.* 3:685-694.
- Heppner, G.H. 1984. Tumor heterogeneity. *Cancer research.* 44:2259-2265.
- Hermann, P.C., S.L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J.W. Ellwart, M. Guba, C.J. Bruns, and C. Heeschen. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell.* 1:313-323.
- Honzarenko, M., Y. Le, M. Swierkowski, I. Ghiran, A.M. Glodek, and L.E. Silberstein. 2006. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.* 24:1030-1041.
- Horwitz, E.M., D.J. Prockop, L.A. Fitzpatrick, W.W. Koo, P.L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J.C. Marx, R.E. Pyeritz, and M.K. Brenner. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 5:309-313.
- Huang, S., V. Leung, S. Peng, L. Li, F.J. Lu, T. Wang, W. Lu, K.M. Cheung, and G. Zhou. 2011. Developmental definition of MSCs: new insights into pending questions. *Cellular reprogramming.* 13:465-472.
- Hung, S.C., W.P. Deng, W.K. Yang, R.S. Liu, C.C. Lee, T.C. Su, R.J. Lin, D.M. Yang, C.W. Chang, W.H. Chen, H.J. Wei, and J.G. Gelovani. 2005. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 11:7749-7756.
- Huvos, A.G., H.Q. Woodard, W.G. Cahan, N.L. Higinbotham, F.W. Stewart, A. Butler, and S.S. Bretsky. 1985. Postradiation osteogenic sarcoma of bone and soft tissues. A clinicopathologic study of 66 patients. *Cancer.* 55:1244-1255.
- Iavarone, A., E.R. King, X.M. Dai, G. Leone, E.R. Stanley, and A. Lasorella. 2004. Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature.* 432:1040-1045.
- Inoue, Y., M. Kitagawa, and Y. Taya. 2007. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *The EMBO journal.* 26:2083-2093.

- Jacks, T., L. Remington, B.O. Williams, E.M. Schmitt, S. Halachmi, R.T. Bronson, and R.A. Weinberg. 1994. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current biology : CB*. 4:1-7.
- Jeon, E.J., K.Y. Lee, N.S. Choi, M.H. Lee, H.N. Kim, Y.H. Jin, H.M. Ryoo, J.Y. Choi, M. Yoshida, N. Nishino, B.C. Oh, K.S. Lee, Y.H. Lee, and S.C. Bae. 2006. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *The Journal of biological chemistry*. 281:16502-16511.
- Jones, E.A., S.E. Kinsey, A. English, R.A. Jones, L. Straszynski, D.M. Meredith, A.F. Markham, A. Jack, P. Emery, and D. McGonagle. 2002. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis and rheumatism*. 46:3349-3360.
- Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble. 2006. Cancer stem cells. *The New England journal of medicine*. 355:1253-1261.
- Kadiyala, S., R.G. Young, M.A. Thiede, and S.P. Bruder. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell transplantation*. 6:125-134.
- Kansara, M., and D.M. Thomas. 2007. Molecular pathogenesis of osteosarcoma. *DNA and cell biology*. 26:1-18.
- Karlsson, P., E. Holmberg, A. Samuelsson, K.A. Johansson, and A. Wallgren. 1998. Soft tissue sarcoma after treatment for breast cancer--a Swedish population-based study. *Eur J Cancer*. 34:2068-2075.
- Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter, and K. Bieback. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 24:1294-1301.
- Khakoo, A.Y., S. Pati, S.A. Anderson, W. Reid, M.F. Elshal, Rovira, II, A.T. Nguyen, D. Malide, C.A. Combs, G. Hall, J. Zhang, M. Raffeld, T.B. Rogers, W. Stetler-Stevenson, J.A. Frank, M. Reitz, and T. Finkel. 2006. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The Journal of experimental medicine*. 203:1235-1247.
- Kirkpatrick, C.J., A. Alves, H. Kohler, J. Kriegsmann, F. Bittinger, M. Otto, D.F. Williams, and R. Eloy. 2000. Biomaterial-induced sarcoma: A novel model to study preneoplastic change. *The American journal of pathology*. 156:1455-1467.
- Kolf, C.M., E. Cho, and R.S. Tuan. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy*. 9:204.
- Komarova, S., Y. Kawakami, M.A. Stoff-Khalili, D.T. Curiel, and L. Pereboeva. 2006. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther*. 5:755-766.
- Kon, E., A. Muraglia, A. Corsi, P. Bianco, M. Marcacci, I. Martin, A. Boyde, I. Ruspantini, P. Chistolini, M. Rocca, R. Giardino, R. Cancedda, and R. Quarto. 2000. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*. 49:328-337.

- Kong, L.J., A.R. Meloni, and J.R. Nevins. 2006. The Rb-related p130 protein controls telomere lengthening through an interaction with a Rad50-interacting protein, RINT-1. *Molecular cell*. 22:63-71.
- Krampera, M., G. Pizzolo, G. Aprili, and M. Franchini. 2006. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 39:678-683.
- Krebsbach, P.H., S.A. Kuznetsov, K. Satomura, R.V. Emmons, D.W. Rowe, and P.G. Robey. 1997. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation*. 63:1059-1069.
- Krebsbach, P.H., M.H. Mankani, K. Satomura, S.A. Kuznetsov, and P.G. Robey. 1998. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation*. 66:1272-1278.
- Krivtsov, A.V., D. Twomey, Z. Feng, M.C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J.E. Levine, J. Wang, W.C. Hahn, D.G. Gilliland, T.R. Golub, and S.A. Armstrong. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. 442:818-822.
- Krutzfeldt, M., M. Ellis, D.B. Weekes, J.J. Bull, M. Eilers, M.D. Vivanco, W.R. Sellers, and S. Mittnacht. 2005. Selective ablation of retinoblastoma protein function by the RET finger protein. *Molecular cell*. 18:213-224.
- Kucerova, L., V. Altanerova, M. Matuskova, S. Tyciakova, and C. Altaner. 2007. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer research*. 67:6304-6313.
- Kurth, T., E. Hedbom, N. Shintani, M. Sugimoto, F.H. Chen, M. Haspl, S. Martinovic, and E.B. Hunziker. 2007. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis Cartilage*. 15:1178-1189.
- Kuznetsov, S.A., P.H. Krebsbach, K. Satomura, J. Kerr, M. Riminucci, D. Benayahu, and P.G. Robey. 1997. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 12:1335-1347.
- Kynaston, J.A., A.J. Malcolm, A.W. Craft, S.M. Davies, P.H. Jones, D.J. King, C.D. Mitchell, A. Oakhill, and C.A. Stiller. 1993. Chemotherapy in the management of infantile fibrosarcoma. *Medical and pediatric oncology*. 21:488-493.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, and J.E. Dick. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 367:645-648.
- Lasorella, A., M. Nosedà, M. Beyna, Y. Yokota, and A. Iavarone. 2000. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature*. 407:592-598.
- Le Blanc, K., I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Gotherstrom, M. Hassan, M. Uzunel, and O. Ringden. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 363:1439-1441.
- Leu, H.J., and M. Makek. 1986. Intramural venous leiomyosarcomas. *Cancer*. 57:1395-1400.

- Lim, E., F. Vaillant, D. Wu, N.C. Forrest, B. Pal, A.H. Hart, M.L. Asselin-Labat, D.E. Gyorki, T. Ward, A. Partanen, F. Feleppa, L.I. Huschtscha, H.J. Thorne, S.B. Fox, M. Yan, J.D. French, M.A. Brown, G.K. Smyth, J.E. Visvader, and G.J. Lindeman. 2009a. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med.* 15:907-913.
- Lim, L.Y., N. Vidnovic, L.W. Ellisen, and C.O. Leong. 2009b. Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. *Br J Cancer.* 101:1606-1612.
- Loebinger, M.R., and S.M. Janes. 2010. Stem cells as vectors for antitumour therapy. *Thorax.* 65:362-369.
- Longworth, M.S., A. Herr, J.Y. Ji, and N.J. Dyson. 2008. RBF1 promotes chromatin condensation through a conserved interaction with the Condensin II protein dCAP-D3. *Genes & development.* 22:1011-1024.
- Luk, J.M., P.P. Wang, C.K. Lee, J.H. Wang, and S.T. Fan. 2005. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J Immunol Methods.* 305:39-47.
- Luu, H.H., W.X. Song, X. Luo, D. Manning, J. Luo, Z.L. Deng, K.A. Sharff, A.G. Montag, R.C. Haydon, and T.C. He. 2007. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 25:665-677.
- Ma, X.J., R. Salunga, J.T. Tuggle, J. Gaudet, E. Enright, P. McQuary, T. Payette, M. Pistone, K. Stecker, B.M. Zhang, Y.X. Zhou, H. Varnholt, B. Smith, M. Gadd, E. Chatfield, J. Kessler, T.M. Baer, M.G. Erlander, and D.C. Sgroi. 2003. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100:5974-5979.
- Macaluso, M., M. Montanari, and A. Giordano. 2006. Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene.* 25:5263-5267.
- Macconail, L.E., P. Van Hummelen, M. Meyerson, and W.C. Hahn. 2011. Clinical implementation of comprehensive strategies to characterize cancer genomes: opportunities and challenges. *Cancer discovery.* 1:297-311.
- Mack, T.M. 1995. Sarcomas and other malignancies of soft tissue, retroperitoneum, peritoneum, pleura, heart, mediastinum, and spleen. *Cancer.* 75:211-244.
- MacLean, S., W.S. Khan, A.A. Malik, M. Snow, and S. Anand. 2012. Tendon regeneration and repair with stem cells. *Stem cells international.* in press. doi:10.1155/2012/316281.
- MacLellan, W.R., G. Xiao, M. Abdellatif, and M.D. Schneider. 2000. A novel Rb- and p300-binding protein inhibits transactivation by MyoD. *Molecular and cellular biology.* 20:8903-8915.
- MacPherson, D., J. Sage, T. Kim, D. Ho, M.E. McLaughlin, and T. Jacks. 2004. Cell type-specific effects of Rb deletion in the murine retina. *Genes & development.* 18:1681-1694.

- Maire, G., J.W. Martin, M. Yoshimoto, S. Chilton-MacNeill, M. Zielenska, and J.A. Squire. 2011. Analysis of miRNA-gene expression-genomic profiles reveals complex mechanisms of microRNA deregulation in osteosarcoma. *Cancer genetics*. 204:138-146.
- Mandahl, N., C.D. Fletcher, P. Dal Cin, I. De Wever, F. Mertens, F. Mitelman, J. Rosai, A. Rydholm, R. Sciot, G. Tallini, H. Van Den Berghe, R. Vanni, and H. Willen. 2000. Comparative cytogenetic study of spindle cell and pleomorphic leiomyosarcomas of soft tissues: a report from the CHAMP Study Group. *Cancer genetics and cytogenetics*. 116:66-73.
- Marcacci, M., E. Kon, V. Moukhachev, A. Lavroukov, S. Kutepov, R. Quarto, M. Mastrogiacomo, and R. Cancedda. 2007. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng*. 13:947-955.
- Marina, N., M. Gebhardt, L. Teot, and R. Gorlick. 2004. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *The oncologist*. 9:422-441.
- Mark, R.J., J. Poen, L.M. Tran, Y.S. Fu, M.T. Selch, and R.G. Parker. 1994. Postirradiation sarcomas. A single-institution study and review of the literature. *Cancer*. 73:2653-2662.
- Martinez, C., T.J. Hofmann, R. Marino, M. Dominici, and E.M. Horwitz. 2007. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*. 109:4245-4248.
- Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 103:295-309.
- Mazhari, R., and J.M. Hare. 2007. Advances in cell-based therapy for structural heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 49:387-395.
- McClain, K.L., C.T. Leach, H.B. Jenson, V.V. Joshi, B.H. Pollock, R.T. Parmley, F.J. DiCarlo, E.G. Chadwick, and S.B. Murphy. 1995. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in children with AIDS. *The New England journal of medicine*. 332:12-18.
- Medema, J.P., and L. Vermeulen. 2011. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*. 474:318-326.
- Menasche, P. 2011. Cardiac cell therapy: lessons from clinical trials. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 50:258-265.
- Mendez-Ferrer, S., T.V. Michurina, F. Ferraro, A.R. Mazloom, B.D. Macarthur, S.A. Lira, D.T. Scadden, A. Ma'ayan, G.N. Enikolopov, and P.S. Frenette. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 466:829-834.
- Mentzel, T., E. Calonje, and C.D. Fletcher. 1994. Leiomyosarcoma with prominent osteoclast-like giant cells. Analysis of eight cases closely mimicking the so-called giant cell variant of malignant fibrous histiocytoma. *The American journal of surgical pathology*. 18:258-265.

- Merchant, W., E. Calonje, and C.D. Fletcher. 1995. Inflammatory leiomyosarcoma: a morphological subgroup within the heterogeneous family of so-called inflammatory malignant fibrous histiocytoma. *Histopathology*. 27:525-532.
- Meuwissen, R., S.C. Linn, R.I. Linnoila, J. Zevenhoven, W.J. Mooi, and A. Berns. 2003. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell*. 4:181-189.
- Mishra, L., R. Derynck, and B. Mishra. 2005. Transforming growth factor-beta signaling in stem cells and cancer. *Science*. 310:68-71.
- Miyake, S., W.R. Sellers, M. Safran, X. Li, W. Zhao, S.R. Grossman, J. Gan, J.A. DeCaprio, P.D. Adams, and W.G. Kaelin, Jr. 2000. Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. *Molecular and cellular biology*. 20:8889-8902.
- Mogi, A., and H. Kuwano. 2011. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011:583929.
- Mohseny, A.B., K. Szuhai, S. Romeo, E.P. Buddingh, I. Briaire-de Bruijn, D. de Jong, M. van Pel, A.M. Cleton-Jansen, and P.C. Hogendoorn. 2009. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol*. 219:294-305.
- Morikawa, S., Y. Mabuchi, K. Niibe, S. Suzuki, N. Nagoshi, T. Sunabori, S. Shimmura, Y. Nagai, T. Nakagawa, H. Okano, and Y. Matsuzaki. 2009. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochemical and biophysical research communications*. 379:1114-1119.
- Morris, E.J., and N.J. Dyson. 2001. Retinoblastoma protein partners. *Advances in cancer research*. 82:1-54.
- Munakata, T., Y. Liang, S. Kim, D.R. McGivern, J. Huibregtse, A. Nomoto, and S.M. Lemon. 2007. Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS pathogens*. 3:1335-1347.
- Murakami, M., M. Nakagawa, E.N. Olson, and O. Nakagawa. 2005. A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:18034-18039.
- Myhre-Jensen, O. 1981. A consecutive 7-year series of 1331 benign soft tissue tumours. Clinicopathologic data. Comparison with sarcomas. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 52:287-293.
- Nadri, S., M. Soleimani, R.H. Hosseni, M. Massumi, A. Atashi, and R. Izadpanah. 2007. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *The International journal of developmental biology*. 51:723-729.
- Nagao, H., K. Ijiri, M. Hirotsu, Y. Ishidou, T. Yamamoto, S. Nagano, T. Takizawa, K. Nakashima, S. Komiya, and T. Setoguchi. 2011. Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma. *J Pathol*. 224:169-179.

- Nagoshi, N., S. Shibata, Y. Kubota, M. Nakamura, Y. Nagai, E. Satoh, S. Morikawa, Y. Okada, Y. Mabuchi, H. Katoh, S. Okada, K. Fukuda, T. Suda, Y. Matsuzaki, Y. Toyama, and H. Okano. 2008. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell stem cell*. 2:392-403.
- Nakamizo, A., F. Marini, T. Amano, A. Khan, M. Studeny, J. Gumin, J. Chen, S. Hentschel, G. Vecil, J. Dembinski, M. Andreeff, and F.F. Lang. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer research*. 65:3307-3318.
- Nakamura, K., Y. Ito, Y. Kawano, K. Kurozumi, M. Kobune, H. Tsuda, A. Bizen, O. Honmou, Y. Niitsu, and H. Hamada. 2004. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene therapy*. 11:1155-1164.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon, and S.W. Lowe. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 113:703-716.
- Ning, H., F. Yang, M. Jiang, L. Hu, K. Feng, J. Zhang, Z. Yu, B. Li, C. Xu, Y. Li, J. Wang, J. Hu, X. Lou, and H. Chen. 2008. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*. 22:593-599.
- Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 194:23-28.
- Nuttall, M.E., and J.M. Gimble. 2004. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Current opinion in pharmacology*. 4:290-294.
- O'Brien, C.A., A. Pollett, S. Gallinger, and J.E. Dick. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 445:106-110.
- Oda, Y., K. Miyajima, K. Kawaguchi, S. Tamiya, Y. Oshiro, Y. Hachitanda, M. Oya, Y. Iwamoto, and M. Tsuneyoshi. 2001. Pleomorphic leiomyosarcoma: clinicopathologic and immunohistochemical study with special emphasis on its distinction from ordinary leiomyosarcoma and malignant fibrous histiocytoma. *The American journal of surgical pathology*. 25:1030-1038.
- Ognjanovic, S., M. Olivier, T.L. Bergemann, and P. Hainaut. 2012. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. *Cancer*. 118:1387-1396.
- Oren, M., and V. Rotter. 2010. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a001107.
- Orkin, S.H., and L.I. Zon. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 132:631-644.
- Otano-Joos, M., G. Mechttersheimer, S. Ohl, K.K. Wilgenbus, W. Scheurlen, T. Lehnert, F. Willeke, H.F. Otto, P. Lichter, and S. Joos. 2000. Detection of chromosomal imbalances in leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization and interphase cytogenetics. *Cytogenetics and cell genetics*. 90:86-92.
- Owen, M. 1985. Lineage of osteogenic cells and their relationship to stromal system. *Peck WA (ed.) Bone and mineral research*. New York: Elsevier. 3:1-25.

- Owen, M. 1988. Marrow stromal stem cells. *Journal of cell science. Supplement.* 10:63-76.
- Pacal, M., and R. Bremner. 2006. Insights from animal models on the origins and progression of retinoblastoma. *Current molecular medicine.* 6:759-781.
- Patterson, H., S. Gill, C. Fisher, M.G. Law, H. Jayatilake, C.D. Fletcher, M. Thomas, R. Grimer, B.A. Gusterson, and C.S. Cooper. 1994. Abnormalities of the p53 MDM2 and DCC genes in human leiomyosarcomas. *Br J Cancer.* 69:1052-1058.
- Pece, S., D. Tosoni, S. Confalonieri, G. Mazzarol, M. Vecchi, S. Ronzoni, L. Bernard, G. Viale, P.G. Pelicci, and P.P. Di Fiore. 2010. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell.* 140:62-73.
- Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin, and R.C. Jordan. 2006. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of clinical pathology.* 59:445-453.
- Pierce, G.B., and W.C. Speers. 1988. Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer research.* 48:1996-2004.
- Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143-147.
- Preuss, U., R. Kreutzfeld, and K.H. Scheidtmann. 2000. Tumor-derived p53 mutant C174Y is a gain-of-function mutant which activates the fos promoter and enhances colony formation. *Int J Cancer.* 88:162-171.
- Quarto, R., M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S.M. Kutepov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon, and M. Marcacci. 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England journal of medicine.* 344:385-386.
- Rajani, B., T.A. Smith, J.D. Reith, and J.R. Goldblum. 1999. Retroperitoneal leiomyosarcomas unassociated with the gastrointestinal tract: a clinicopathologic analysis of 17 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 12:21-28.
- Ranchod, M., and R.L. Kempson. 1977. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneum: a pathologic analysis of 100 cases. *Cancer.* 39:255-262.
- Ricci-Vitiani, L., D.G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, and R. De Maria. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 445:111-115.
- Ringden, O., M. Uzunel, I. Rasmusson, M. Remberger, B. Sundberg, H. Lonnies, H.U. Marschall, A. Dlugosz, A. Szakos, Z. Hassan, B. Omazic, J. Aschan, L. Barkholt, and K. Le Blanc. 2006. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 81:1390-1397.
- Rodríguez, R., J. Garcia-Castro, C. Trigueros, M. Garcia Arranz, and P. Menendez. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells: clinical applications and cancer modeling. *Advances in experimental medicine and biology.* 741:187-205.

- Rodriguez, R., R. Rubio, M. Masip, P. Catalina, A. Nieto, T. de la Cueva, M. Arriero, N. San Martin, E. de la Cueva, D. Balomenos, P. Menendez, and J. Garcia-Castro. 2009. Loss of p53 induces tumorigenesis in p21-deficient mesenchymal stem cells. *Neoplasia*. 11:397-407.
- Rubio, D., S. Garcia, T. De la Cueva, M.F. Paz, A.C. Lloyd, A. Bernad, and J. Garcia-Castro. 2008. Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. *Exp Cell Res*. 314:691-698.
- Ruiz, S., M. Santos, C. Segrelles, H. Leis, J.L. Jorcano, A. Berns, J.M. Paramio, and M. Vooijs. 2004. Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development*. 131:2737-2748.
- Saavedra, H.I., L. Wu, A. de Bruin, C. Timmers, T.J. Rosol, M. Weinstein, M.L. Robinson, and G. Leone. 2002. Specificity of E2F1, E2F2, and E2F3 in mediating phenotypes induced by loss of Rb. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 13:215-225.
- Sage, J., A.L. Miller, P.A. Perez-Mancera, J.M. Wysocki, and T. Jacks. 2003. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature*. 424:223-228.
- Salerno, A., R. Levato, M.A. Mateos-Timoneda, E. Engel, P.A. Netti, and J.A. Planell. 2012. Modular polylactic acid microparticle-based scaffolds prepared via microfluidic emulsion/solvent displacement process: Fabrication, characterization, and in vitro mesenchymal stem cells interaction study. *Journal of biomedical materials research. Part A*.
- Sampath, J., D. Sun, V.J. Kidd, J. Grenet, A. Gandhi, L.H. Shapiro, Q. Wang, G.P. Zambetti, and J.D. Schuetz. 2001. Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *The Journal of biological chemistry*. 276:39359-39367.
- Sandberg, A.A., and J.A. Bridge. 2003. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer genetics and cytogenetics*. 145:1-30.
- Shakibaei, M. 1998. Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res*. 240:95-106.
- Sharma, S., A. Panitch, and C.P. Neu. 2012. Incorporation of an Aggrecan Mimic Prevents Proteolytic Degradation of Anisotropic Cartilage Analogs. *Acta biomaterialia*.
- Shi, M., Z.W. Liu, and F.S. Wang. 2011. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology*. 164:1-8.
- Shmookler, B.M., and D.H. Lauer. 1983. Retroperitoneal leiomyosarcoma. A clinicopathologic analysis of 36 cases. *The American journal of surgical pathology*. 7:269-280.
- Singh, S.K., C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, and P.B. Dirks. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432:396-401.

- Skapek, S.X., Y.R. Pan, and E.Y. Lee. 2006. Regulation of cell lineage specification by the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene*. 25:5268-5276.
- Skubitz, K.M., and D.R. D'Adamo. 2007. Sarcoma. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*. 82:1409-1432.
- Slack, R.S., H. El-Bizri, J. Wong, D.J. Belliveau, and F.D. Miller. 1998. A critical temporal requirement for the retinoblastoma protein family during neuronal determination. *The Journal of cell biology*. 140:1497-1509.
- Sonabend, A.M., I.V. Ulasov, M.A. Tyler, A.A. Rivera, J.M. Mathis, and M.S. Lesniak. 2008. Mesenchymal stem cells effectively deliver an oncolytic adenovirus to intracranial glioma. *Stem Cells*. 26:831-841.
- Song, L., D. Baksh, and R.S. Tuan. 2004. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. *Cytotherapy*. 6:596-601.
- Sottile, V., and K. Seuwen. 2000. Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone). *FEBS letters*. 475:201-204.
- Soussi, T., and C. Beroud. 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 1:233-240.
- Spees, J.L., S.D. Olson, J. Ylostalo, P.J. Lynch, J. Smith, A. Perry, A. Peister, M.Y. Wang, and D.J. Prockop. 2003. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:2397-2402.
- Stagg, J. 2007. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue antigens*. 69:1-9.
- Stagg, J. 2008. Mesenchymal stem cells in cancer. *Stem Cell Rev*. 4:119-124.
- Stagg, J., S. Pommey, N. Eliopoulos, and J. Galipeau. 2006. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 107:2570-2577.
- Stein, W.D. 1997. Kinetics of the multidrug transporter (P-glycoprotein) and its reversal. *Physiological reviews*. 77:545-590.
- Stoff-Khalili, M.A., A.A. Rivera, J.M. Mathis, N.S. Banerjee, A.S. Moon, A. Hess, R.P. Rocconi, T.M. Numnum, M. Everts, L.T. Chow, J.T. Douglas, G.P. Siegal, Z.B. Zhu, H.G. Bender, P. Dall, A. Stoff, L. Pereboeva, and D.T. Curiel. 2007. Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*. 105:157-167.
- Strano, S., E. Munarriz, M. Rossi, B. Cristofanelli, Y. Shaul, L. Castagnoli, A.J. Levine, A. Sacchi, G. Cesareni, M. Oren, and G. Blandino. 2000. Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. *The Journal of biological chemistry*. 275:29503-29512.

- Studeniy, M., F.C. Marini, J.L. Dembinski, C. Zompetta, M. Cabreira-Hansen, B.N. Bekele, R.E. Champlin, and M. Andreeff. 2004. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst.* 96:1593-1603.
- Sun, S., Z. Guo, X. Xiao, B. Liu, X. Liu, P.H. Tang, and N. Mao. 2003. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells.* 21:527-535.
- Swanson, P.E., M.R. Wick, and L.P. Dehner. 1991. Leiomyosarcoma of somatic soft tissues in childhood: an immunohistochemical analysis of six cases with ultrastructural correlation. *Human pathology.* 22:569-577.
- Takashima, Y., T. Era, K. Nakao, S. Kondo, M. Kasuga, A.G. Smith, and S. Nishikawa. 2007. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell.* 129:1377-1388.
- Talos, F., A. Nemaierova, E.R. Flores, O. Petrenko, and U.M. Moll. 2007. p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53. *Molecular cell.* 27:647-659.
- Tang, Q.Q., T.C. Otto, and M.D. Lane. 2004. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101:9607-9611.
- Thomas, D.M., S.A. Carty, D.M. Piscopo, J.S. Lee, W.F. Wang, W.C. Forrester, and P.W. Hinds. 2001. The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Molecular cell.* 8:303-316.
- Tschoep, K., A. Kohlmann, M. Schlemmer, T. Haferlach, and R.D. Issels. 2007. Gene expression profiling in sarcomas. *Critical reviews in oncology/hematology.* 63:111-124.
- Tse, W.T., J.D. Pendleton, W.M. Beyer, M.C. Egalka, and E.C. Guinan. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 75:389-397.
- Tucker, M.A., G.J. D'Angio, J.D. Boice, Jr., L.C. Strong, F.P. Li, M. Stovall, B.J. Stone, D.M. Green, F. Lombardi, W. Newton, and et al. 1987. Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children. *The New England journal of medicine.* 317:588-593.
- Varela-Duran, J., H. Oliva, and J. Rosai. 1979. Vascular leiomyosarcoma: the malignant counterpart of vascular leiomyoma. *Cancer.* 44:1684-1691.
- Vermeulen, L., M.R. Sprick, K. Kemper, G. Stassi, and J.P. Medema. 2008. Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ.* 15:947-958.
- Vianello, F., and F. Dazzi. 2008. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: a double edged sword? *Leukemia.* 22:463-465.
- Visvader, J.E. 2011. Cells of origin in cancer. *Nature.* 469:314-322.
- Walkley, C.R., and S.H. Orkin. 2006. Rb is dispensable for self-renewal and multilineage differentiation of adult hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103:9057-9062.

- Walkley, C.R., J.M. Shea, N.A. Sims, L.E. Purton, and S.H. Orkin. 2007. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*. 129:1081-1095.
- Wang, L.L. 2005. Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer J*. 11:294-305.
- Wang, R., Y.J. Lu, C. Fisher, J.A. Bridge, and J. Shipley. 2001. Characterization of chromosome aberrations associated with soft-tissue leiomyosarcomas by twenty-four-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis. *Genes, chromosomes & cancer*. 31:54-64.
- Wang, S., X. Qu, and R.C. Zhao. 2012. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of hematology & oncology*. 5:19.
- Weatherby, R.P., D.C. Dahlin, and J.C. Ivins. 1981. Postradiation sarcoma of bone: review of 78 Mayo Clinic cases. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*. 56:294-306.
- Wei, W., U. Herbig, S. Wei, A. Dutriaux, and J.M. Sedivy. 2003. Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts. *EMBO reports*. 4:1061-1066.
- Weigelt, B., A.M. Glas, L.F. Wessels, A.T. Witteveen, J.L. Peterse, and L.J. van't Veer. 2003. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:15901-15905.
- Weiss, R.A., D. Whitby, S. Talbot, P. Kellam, and C. Boshoff. 1998. Human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*:51-54.
- Whelan, J.S. 1997. Osteosarcoma. *Eur J Cancer*. 33:1611-1618; discussion 1618-1619.
- Wikenheiser-Brokamp, K.A. 2006. Retinoblastoma family proteins: insights gained through genetic manipulation of mice. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 63:767-780.
- Wildwater, M., A. Campilho, J.M. Perez-Perez, R. Heidstra, I. Blilou, H. Korthout, J. Chatterjee, L. Mariconti, W. Grissem, and B. Scheres. 2005. The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell*. 123:1337-1349.
- Wile, A.G., H.L. Evans, and M.M. Romsdahl. 1981. Leiomyosarcoma of soft tissue: a clinicopathologic study. *Cancer*. 48:1022-1032.
- Williams, S.A., H.L. Maecker, D.M. French, J. Liu, A. Gregg, L.B. Silverstein, T.C. Cao, R.A. Carano, and V.M. Dixit. 2011. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell*. 146:918-930.
- Wu, Y., L. Chen, P.G. Scott, and E.E. Tredget. 2007. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 25:2648-2659.
- Ye, Y., L.M. Pringle, A.W. Lau, D.N. Riquelme, H. Wang, T. Jiang, D. Lev, A. Welman, G.A. Blobel, A.M. Oliveira, and M.M. Chou. 2010. TRE17/USP6 oncogene translocated in aneurysmal bone cyst induces matrix metalloproteinase production via activation of NF-kappaB. *Oncogene*. 29:3619-3629.

- Yong, R.L., N. Shinojima, J. Fueyo, J. Gumin, G.G. Vecil, F.C. Marini, O. Bogler, M. Andreeff, and F.F. Lang. 2009. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer research*. 69:8932-8940.
- Young, N.P., D. Crowley, and T. Jacks. 2011. Uncoupling cancer mutations reveals critical timing of p53 loss in sarcomagenesis. *Cancer research*. 71:4040-4047.
- Zhang, J., J. Gray, L. Wu, G. Leone, S. Rowan, C.L. Cepko, X. Zhu, C.M. Craft, and M.A. Dyer. 2004. Rb regulates proliferation and rod photoreceptor development in the mouse retina. *Nature genetics*. 36:351-360.
- Zhou, B.B., H. Zhang, M. Damelin, K.G. Geles, J.C. Grindley, and P.B. Dirks. 2009. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*. 8:806-823.
- Ziebold, U., T. Reza, A. Caron, and J.A. Lees. 2001. E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes & development*. 15:386-391.