



Artículos Científicos

Capacidad multipotencial en células madre mesenquimales derivadas de la placenta humana en Panamá

Multipotent capacity of human placenta-derived mesenchymal stem cells in Panama

Solís Mairim*, Fu Cindy**

*Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá, República de Panamá. **Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Latina de Panamá, Panamá, República de Panamá.

Palabras claves: células madre mesenquimales, placenta, proliferación, diferenciación, multipotencial, Panamá

Key words: mesenchymal stem cells, placenta, proliferation, differentiation, multipotent, Panama

Correspondencia:
Dra. Mairim Alexandra Solís

Correo electrónico:
msolis@gorgas.gob.pa

Recibido: 29 de agosto de 2019

Aceptado: 23 de diciembre de 2019

Publicado: 27 de marzo de 2020

Conflicto de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno asociado a esta publicación. Este trabajo fue financiado por el proyecto 09-2018-ITE17-R1-001 de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Panamá. El presente estudio fue aprobado por el Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá. Todos los procedimientos fueron conducidos de acuerdo a lo contenido en la Declaración de Helsinki.

Resumen

Introducción: Las células madre mesenquimales (MSCs) tienen la capacidad única de auto-renovación y pluripotencia con la cual apoyan en la regeneración de tejidos en organismos vivos. El mayor potencial terapéutico de las MSCs derivadas de la placenta (PDMSCs) humana, como fuente más joven de MSCs, estimula la búsqueda de las mejores condiciones de cultivo que preserven su capacidad de proliferar y diferenciarse. Sin embargo, estudios relacionados a la caracterización de la multipotencialidad de las PDMSCs durante periodos prolongados de cultivo, no han sido reportados en Panamá. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue el de implementar un proceso de aislamiento y cultivo que preserve las propiedades multipotentes en PDMSCs. **Materiales y Métodos:** Placentas humanas a término completo fueron obtenidas para el aislamiento de las MSCs. Las PDMSCs fueron caracterizadas según su morfología, expresión positiva de marcadores CD90, CD73, CD105, y capacidad de proliferación y diferenciación a linajes mesodérmicos. **Resultados:** Se ha demostrado la obtención de poblaciones de PDMSCs con morfología fibroblástica, adherencia plástica, expresión positiva de los marcadores CD90, CD73 y CD105, y capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica. Posterior al aislamiento y crio-preservación, las PDMSCs mantuvieron una viabilidad mayor de 95%, una tasa de proliferación por más de 40 días en cultivo, y la expresión positiva de los marcadores CD90, CD73, y CD105 al pasaje 16. **Conclusión:** Nuestros resultados demuestran una metodología eficiente para obtención y cultivo de PDMSCs que mantienen sus características multipotentes durante periodos prolongados de cultivo, abriendo el camino para futuras terapias celulares.

Abstract

Introduction: Human mesenchymal stem cells are (MSCs) unique in their pluripotency and their ability to self-renew in order to support tissue regeneration in living organisms. The increased therapeutic potential of PDMSCs as a pool of younger MSCs with a vast capacity for expansion, minor predisposition for tumor formation or immune reactions spurs the search for the best culture conditions to preserve their ability to differentiate and proliferate. However, studies regarding characterization of multipotent isolated PDMSCs during prolonged periods of culture has not been reported thus far in Panama. Therefore, in this study we seek to implement isolation and culture procedures that preserve multipotent characteristics in PDMSCs. **Materials and Methods:** Full-term human placentas were obtained for the isolation of MSCs. PDMSCs were characterized based on their morphology, positive expression of CD90, CD73, and CD105, and their ability to proliferate and differentiate to mesodermal lineages. **Results:** It was demonstrated that our isolated PDMSCs presented the MSC characteristics of fibroblastic morphology, plastic adherence, positive expression of CD90, CD73, and CD105 markers, as well as osteogenesis, adipogenesis, and osteogenic differentiation ability. When PDMSCs were cultured after isolation or cryopreservation, viability was maintained above 95%, with their proliferation rate maintained after 40 days, and positive expression of CD90, CD73, and CD105 markers kept after 16 passages. **Conclusion:** Taken together, our results demonstrated a methodology to obtain successful source of isolated human PDMSCs that kept their multipotent properties over time, opening the path for future cellular therapies.

INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) son un tipo de células madre adultas que residen en una variedad de tejidos, incluyendo la placenta [1]. Estas células multipotentes han generado un gran interés debido a su capacidad de diferenciación hacia una variedad de linajes, incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipocitos y hepatocitos, así como su uso potencial en medicina regenerativa [2]. Numerosos esfuerzos se han realizado para elucidar el mecanismo mediante el cual las células madre se diferencian a linajes específicos y su aplicación como terapia celular para un sinnúmero de enfermedades. Estas células, pueden ser aisladas fácilmente de diversos tejidos post-natales, pero con un número limitado de divisiones celulares antes de adquirir senescencia replicativa.

El uso de células madre de un tejido fetal, como la placenta, ofrece una fuente más joven de células madre adultas. Las células madre mesenquimales derivadas de la placenta humana (PDMSC) contienen características pluripotentes y un mayor potencial de expansión en comparación con otras células madre adultas, ya que su entorno de nicho fetal contiene características celulares y bioquímicas muy específicas que las preservan hasta que señalizaciones activen su auto-renovación y migración. El hecho de que las PDMSCs no induzcan reacción inmunológica [3,4] hace de estas células una excelente opción terapéutica. Estudios han demostrado la expresión positiva de los marcadores pluripotentes NANOG, SSEA-4 y OCT4 en PDMSCs [5]. Cuando las MSC son cultivadas durante períodos prolongados, se disminuye la capacidad de proliferación y diferenciación, lo que limita su uso futuro en terapias celulares [6]. El uso potencial de las células madre en medicina regenerativa dependerá de la capacidad de estas células para preservar sus propiedades de manera estable durante períodos prolongados de cultivo celular, además de una comprensión profunda de estas células.

Investigaciones que promuevan tratamientos de medicina regenerativa a través de terapias con células madre son escasas en Panamá. A su vez, el sistema de salud público, el cual en la actualidad no satisface las necesidades de un segmento importante de la población, podría beneficiarse de intervenciones de terapia celular. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue el de implementar en Panamá procedimientos de aislamiento y cultivo que preserven las características multipotentes en las PDMSCs. Los resultados obtenidos permitirán un avance en los estudios preclínicos relacionados con células madre para el desarrollo de terapias celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de PDMSCs

Placentas humanas a término completo (38-40 semanas de gestación) fueron obtenidas con el consentimiento informado de las pacientes del Hospital Santo Tomás, y

con la autorización de su Dirección Médica. Luego de remover las capas placentarias hasta llegar a las vellosidades coriónicas, el tejido fue picado manualmente y digerido enzimáticamente con colagenasa en un baño de agua a 37°C por 45 minutos agitando, como publicado anteriormente [7]. Se filtró para eliminar los fragmentos no digeridos, y centrifugó mediante gradiente de densidad para obtención de células mononucleares. Las células fueron cultivadas a $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ en DMEM-baja en glucosa suplementada con 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) y gentamicina, en un ambiente de 37°C y 5% CO_2 . Luego de 10 a 14 días, las colonias fueron sub-cultivadas o crio-preservedas en FBS suplementado con 10% DMSO.

Tiempo Generacional, Curva de Crecimiento y Viabilidad Celular

Las PDMSCs fueron sembradas en superficies de poliestireno a $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ para el análisis de auto-renovación en células recién aisladas. Se calculó el doblaje acumulativo de la población de células mediante la ecuación $\text{CPD} = \log(N1/N0)/\log 2$, como previamente fue publicado [8]. La construcción de la curva de crecimiento y los análisis de viabilidad celular fueron realizados bajo la tinción por azul de tripano y un hemocitómetro para conteo celular cada 24 horas por 8 días consecutivos. Imágenes de morfología fueron capturadas con un microscopio invertido (Nikon, Eclipse, TS100, Tokio, Japón).

Análisis de Formación de Colonia

Las PDMSCs recién aisladas fueron cultivadas por 10 días consecutivos. A los días 2, 4, 6, 8, y 10 de cultivo, el medio de cultivo fue removido, y teñido con 0.5% Cristal Violeta (Sigma) en metanol por 5 minutos, como previamente publicado [9]. Las células fueron lavadas con agua doblemente destilada y las imágenes capturadas con un microscopio de luz invertida (Nikon).

Inducción a Diferenciación In Vitro

Las inducciones adipogénicas, osteogénicas y condrogénicas de PDMSCs se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante del Kit de diferenciación de adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis StemPro® (Gibco). Las PDMSCs se sembraron en una superficie de poliestireno y se cultivaron en DMEM-bajo glucosa-10% FBS durante 3 días antes de inducir diferenciación. Para la inducción adipogénica, se cultivaron PDMSCs en medio basal de diferenciación de adipocitos StemPro® suplementado con suplemento de adipogénesis StemPro® y gentamicina (10 mg / ml, Gibco) durante 7 días. La adipogénesis se evaluó mediante tinción con aceite rojo O (Sigma). Para la inducción de diferenciación osteogénica y condrogénica, se cultivaron PDMSCs en medio basal de diferenciación de osteocitos/condrocitos StemPro® con osteogénesis/condrogénesis StemPro® y reactivo de gentamicina (10 mg/ml) durante 21 y 14 días, respectivamente. La osteogénesis se analizó mediante tinción con rojo de alizarina S (Sigma) y condrogénesis con tinción con azul alciano al 1% (Sigma) preparada en HCL 0.1 N. Las células se fijaron antes de la tinción. Las imágenes se capturaron con un microscopio de luz invertida (Nikon).

Análisis de Marcadores en Células Madres

La expresión de marcadores de MSC en células se analizó mediante citometría de flujo. Los parámetros fueron adecuados para análisis multicolor de triple tinción de anticuerpos. Las PDMSCs se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Gibco) y se resuspendieron en tampón de tinción para citometría de flujo (FACS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) con los anticuerpos CD90 antihumano conjugado con FITC, CD73 antihumano conjugado con PE y CD105 antihumano conjugado con APC (1:100, BioLegend, San Diego, CA, EE. UU, Tabla 1) durante 15 minutos a 25°C en oscuridad. Las células se lavaron luego con tampón FACS y se resuspendieron en tampón de fijación (Thermo Fisher Scientific). La intensidad de fluorescencia de 10,000 células se registró en un citómetro de flujo (Guava, Merck, Darmstadt, Alemania) y se analizó con el software FlowJo, con longitudes de onda de excitación/emisión de FITC a 494/520, PE a 496/578 y APC a 650/660.

Tabla 1. Anticuerpos Primarios

Anticuerpo Primario	Título	Compañía/Número de Catálogo
CD90-FITC	0.111111111	Biolegend/328107
CD73-PE	0.111111111	Biolegend/344003
CD105-APC	0.111111111	Biolegend/323207

Figura 1. Viabilidad celular, morfología fibroblástica y adherencia plástica en células madre mesenquimales derivadas de la placenta humana. (A) Número total de células muertas y vivas después del aislamiento de PDMSCs; (B) Porcentaje de viabilidad de las PDMSCs después del aislamiento; (C) Morfología de las PDMSCs cultivadas durante 12 días. Magnificación: 10x y 40x. Barra de escala: 100 micrómetros. Abreviatura: PDMSC, células madre mesenquimáticas derivadas de placenta. Cada número de placenta representa un lote de PDMSCs aisladas.

RESULTADOS

Morfología fibroblástica, adherencia plástica y capacidad de formación de colonias en PDMSCs.

Células madre mesenquimales derivadas de placentas humanas fueron aisladas y cultivadas en placas de cultivo de poliestireno. Se obtuvo una viabilidad celular superior al 95% en las PDMSCs obtenidas de tres procesos independientes de aislamiento (Figura 1A, 1B). Las imágenes de microscopio muestran una morfología fibroblástica y adherencia plástica con tendencia a formación de colonias celulares en las PDMSC a partir del segundo día de cultivo (Figura 1C).

Tasa de proliferación sostenida durante el cultivo de PDMSCs

Una de las características únicas de las MSCs es su indefinida capacidad de auto-renovación. Para elucidar la capacidad de auto-renovación de nuestras células PDMSCs primarias, investigamos su tasa de proliferación a través de curvas de crecimiento y duplicación acumulativa de la población en la proliferación celular. Al día 3 de cultivo, se observó que las PDMSCs proliferaban gradualmente, debido a que se encontraban en un período de adaptación al entorno de cultivo para su posterior adhesión celular. La tasa de proliferación fue incrementando hasta el día 8, lo que representa todo el período proliferativo, llegando a la sub-confluencia al día 10 sin llegar a la fase de meseta (Figura 2A). Los resultados de la duplicación de la población acumulada mostraron que las PDMSCs aisladas tienen una capacidad de expansión por más de 40 días en cultivo (Figura 2B). Estos resultados fueron consistentes entre las PDMSCs de tres placentas independientes. Los resultados de nuestra curva de crecimiento corresponden a los cambios morfológicos observados en PDMSCs, en los que se formaron colonias celulares y aumentaron en tamaño y número a medida que avanzaba el día de cultivo (Figura 2C). Nuestros resultados demostraron obtener PDMSCs con

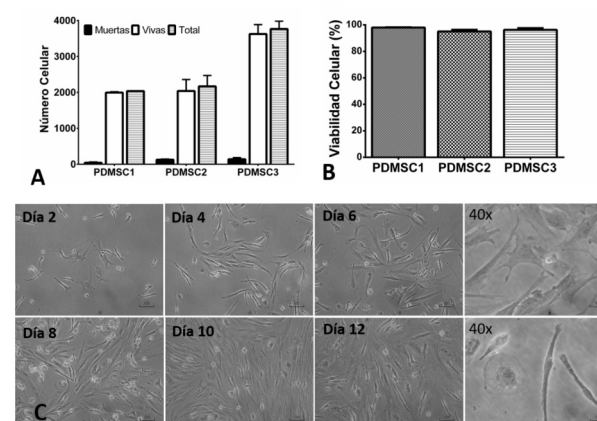
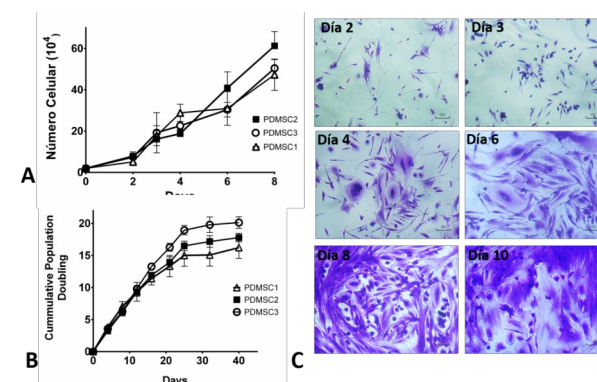


Figura 2. Capacidad de proliferación y formación de colonias de PDMSC humanas. (A) curva de crecimiento celular; (B) Curva de duplicación de la población acumulada con el tiempo donde cada punto representa un pasaje; (C) Capacidad de formación de colonias teñidas con 0.5% de cristal violeta. Las imágenes representan las observaciones representativas de células cultivadas durante la curva de crecimiento celular de 8 días en 2A. Barra de escala: 100 micrómetros. Abreviatura: PDMSC, células madre mesenquimáticas derivadas de placenta. Cada número de placenta representa un lote de PDMSCs aislados.



una viabilidad celular sostenida y un potencial de proliferación durante períodos prolongados de cultivo.

Capacidad de diferenciación a linajes osteogénicos, adipogénicos, y condrogénicos en PDMSCs

En condiciones de cultivo específicas, las MSCs derivadas de la placenta podrían diferenciarse con éxito a adipocitos, osteocitos y condrocitos en función de la tinción específica. Después de inducir nuestras PDMSCs, por medio de factores de crecimiento específicos de cada linaje, se demostró que las células se diferenciaron con éxito al linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico, como indicado por medio de la tinción positiva a Alizarin rojo, Aceite O, y azul de Alcian, respectivamente (Figura 3).

Expresión positiva de los marcadores CD73, CD90, y CD105 en PDMSCs

Las células madre mesenquimales tienen la característica de expresar los marcadores CD90, CD105 y CD73. Para realizar el análisis de la expresión de los marcadores por citometría de flujo, los procedimientos se estandarizaron hasta encontrar los parámetros para análisis multicolor para tinción triple. Los resultados mostraron que nuestras PDMSCs expresaron positivo a los marcadores CD90, CD105 y CD73 (Figura 4A-3C). 99.4% de la población de PDMSCs era positiva al marcador CD73 (Figura 4A), 86.8% positiva a CD90 (Figura 4B), y 97.2% positiva a CD105 (Figura 4C). Las PDMSCs a un pasaje 15 tuvieron mayor expresión de los marcadores CD90, CD105 y CD73 en comparación con las PDMSCs a P5 (Figura 4D). Estos resultados nos permiten asegurar que, la población celular aislada en nuestro proceso corresponde efectivamente a células madre mesenquimales y que la expresión se mantiene de manera continua a lo largo de los días de cultivo.

Las PDMSCs conservan su capacidad de proliferación y expresión de marcadores MSCs a través del tiempo

Dado que la capacidad de proliferación y diferenciación de las células madre adultas disminuye durante períodos prolongados de cultivo, perdiendo a menudo la expresión de sus marcadores y el potencial proliferativo, se procedió a cultivar durante 40 días una población joven y vieja de PDMSCs. La capacidad de proliferar y expresar marcadores CD73, CD90 y CD105 fueron comparadas entre las PDMSCs en un pasaje joven, a P4, y un pasaje viejo, a P15. Los resultados de la curva de duplicación de población acumulada mostraron que las PDMSCs en ambos grupos, mantuvieron una tasa de proliferación sostenida, con una ligera reducción en la proliferación de las PDMSCs a P15 en comparación con las PDMSCs a P4 (Figura 5A). Interesantemente, las PDMSCs a P15 tuvieron una expresión 2.8 veces mayor de CD90 (Figura 5B) y 1.4 veces mayor de CD105 (Figura 5C), en comparación con las PDMSCs a P4 (Figura 5B), mientras que la expresión de CD73 disminuyó a P15 (Figura 5D). Estos resultados demuestran la capacidad de los PDMSC para mantener sus características multipotentes durante los días de cultivo.

Figura 3. Potencial de diferenciación condrogénica, adipogénica y osteogénica de PDMSCs. Diferenciación condrogénica, adipogénica y osteogénica después de la tinción con azul de Alcian, rojo de aceite y rojo de alizarina, respectivamente.

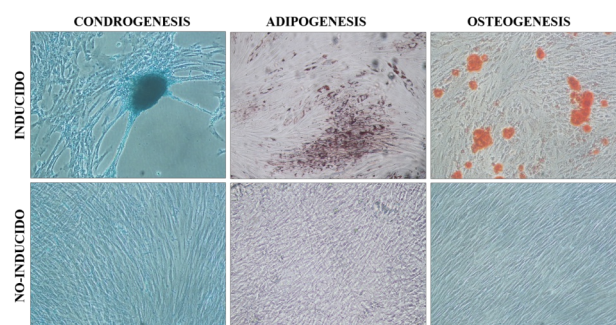


Figura 4. PDMSCs expresan positivamente a CD73, CD90 y CD105. Marcadores relacionados con MSC, (A) CD73, (B) CD90 y (C) CD105 analizados por citometría de flujo. Los histogramas muestran una población superpuesta de PDMSC al pasaje 4 en comparación con PDMSCs al pasaje 15 que expresan (D) CD73, (E) CD90 y (F) CD105.

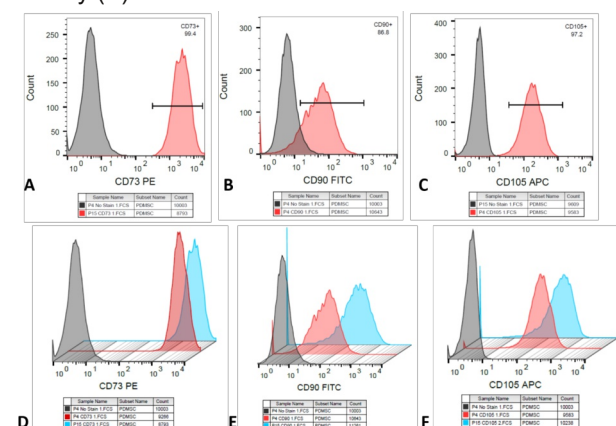
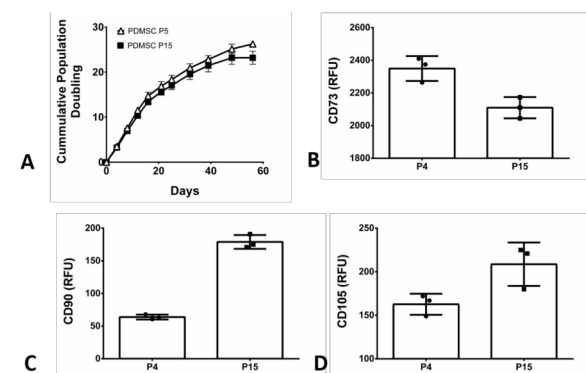


Figura 5. Capacidad prolongada de PDMSC para proliferar y expresar marcadores específicos de MSC. PDMSCs cultivados a P4 y P15 se compararon por su (A) duplicación acumulativa de población; y expresión de (B) CD73; (C) CD90; y (D) CD105.



DISCUSIÓN

A través de este estudio, se ha demostrado una metodología eficiente para obtención de PDMSCs que mantengan sus características multipotentes durante períodos prolongados de cultivo. El proceso de aislamiento utilizado es un método sutil basado en digestión enzimática [5], la cual mantiene la viabilidad celular por arriba del 95%. La Sociedad Internacional de Trasplante Celular ha declarado tres criterios fundamentales para definir a las MSCs, incluyendo, adherencia plástica, expresión específica de antígenos de superficie celular, y potencial de diferenciación multipotente [10]. Las PDMSCs obtenidas en nuestro estudio resultaron adherentes a la superficie plástica durante condiciones estándar de cultivo, característica importante para su expansión [9]. Las MSC tienen la particular capacidad de formación de colonias cuando son sembradas a bajas densidades in vitro [11]. La morfología y número de colonias formadas proporcionan información preliminar sobre la capacidad que tienen las células progenitoras para diferenciarse y proliferar [12]. En este aspecto, nuestras PDMSCs mostraron contener una morfología fibroblástica y capacidad de formación de colonia, como previamente observado [13]. Las MSCs cuentan con un número limitado de expansión antes de entrar en senescencia [14], por lo que un procedimiento óptimo de cultivo asiste a extender el tiempo de cultivo. Nuestros resultados demostraron que las PDMSCs tienen la capacidad de proliferación por hasta 10 días, antes de llegar a confluencia. Adicionalmente, fue posible la expansión de las PDMSCs por 10 pasajes durante un periodo de 40 días. La propiedad biológica que más identifica a las MSCs es su capacidad in vitro de diferenciación osteogénica, adipogénica, y condrogénica. Nuestras PDMSCs mostraron la capacidad de diferenciación a los tres linajes.

La expresión de los antígenos de superficie CD73, CD90, y CD105 ha sido utilizado como método para identificar las MSCs. Para este estudio utilizamos un parámetro de análisis multicolor compuesto de tinciones triples que permite el análisis de los tres marcadores en una misma muestra. Más del 95% de la población de PDMSCs expresó positivamente a CD105 y CD73, como previamente reportado [10] mientras que el 87% de la población de PDMSCs expresó positivamente al marcador CD90, indicando la presencia de los tres antígenos en la superficie celular de PDMSCs. Curiosamente, los niveles de expresión de CD105 y CD90 aumentaron en pasajes posteriores, como observado anteriormente con CD105 en células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo [15]. Queda por dilucidar si las funciones de CD105, como receptor para los ligandos TGF- β s; y CD90, en regular las interacciones celulares y matriz-célula, son incrementadas al avanzar los pasajes, o si la función de CD73 en convertir la adenosina monofosfato a adenosina, disminuye con los pasajes.

Investigaciones que impulsen ensayos preclínicos para el desarrollo de terapias celulares son escasos en Panamá.

Los únicos estudios reportados han utilizado células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical [16,17]. La capacidad multipotencial de las PDMSCs, como fuente joven de células madre, permite su posible uso en enfermedades que actualmente no cuentan con un tratamiento efectivo. Mayores esfuerzos que impulsen investigaciones en PDMSCs, abrirán los caminos para futuras intervenciones a pacientes por medio de terapia celular.

CONCLUSIÓN

Por medio de este estudio se ha demostrado una forma eficiente de obtener y cultivar PDMSCs con morfología fibroblástica, adhesión plástica, expresión positiva de marcadores CD73, CD90 y CD105, y capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica. Nuestros resultados indican el éxito de nuestro proceso de cultivo al mantener las propiedades multipotentes de las PDMSCs humanas durante un tiempo prolongado de cultivo. Los resultados obtenidos permiten una estandarización de las preparaciones celulares al cumplir con los criterios mínimos para la caracterización de las MSCs, lo que permite un avance más rápido en los estudios preclínicos y en el desarrollo de terapias celulares en Panamá.

AGRADECIMIENTO

Biomedicina de la Universidad Nacional de Cheng Kung en Taiwán por el apoyo intelectual en los procedimientos establecidos en Panamá. Agradecemos al Lcdo. Davis Beltrán por brindar asistencia técnica en citometría de flujo.

REFERENCIAS

- [1] Meirelles LdS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-2213.
- [2] Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.* 2000;7:451-457.
- [3] Yang ZX, Han ZB, Ji YR, et al. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *PLoS One.* 2013;8:e59354.
- [4] Abumaree MH, Abomaray FM, Alshabibi MA, AlAskar AS, Kalionis B. Immunomodulatory properties of human placental mesenchymal stem/stromal cells. *Placenta.* 2017;59:87-95.
- [5] Solis MA, Wei Y-H, Chang C-H, Yu C-H, Kuo P-L, Huang LLH. Hyaluronan upregulates mitochondrial biogenesis and reduces adenosine triphosphate production for efficient mitochondrial function in slow-proliferating human mesenchymal stem cells. *Stem*

- Cells. 2016;34:2512-2524.
- [6] Wong TY, Chang C-H, Yu C-H, Huang LLH. Hyaluronan keeps mesenchymal stem cells quiescent and maintains the differentiation potential over time. *Aging Cell*. 2017;16:451-460.
- [7] Liu CM, Yu CH, Chang CH, Hsu CC, Huang LLH. Hyaluronan substratum holds mesenchymal stem cells in slow-cycling mode by prolonging G1 phase. *Cell Tissue Res*. 2008;334:435-443.
- [8] Chen PY, Huang LLH, Hsieh HJ. Hyaluronan preserves the proliferation and differentiation potentials of long-term cultured murine adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360:1-6.
- [9] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006;24:462-471.
- [10] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.
- [11] Pochampally R (2008) Colony Forming Unit Assays for MSCs. In: Prockop DJ, Bunnell BA, Phinney DG, editors. *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press. pp. 83-91.
- [12] Sarma NJ, Takeda A, Yaseen NR. Colony Forming Cell (CFC) Assay for Human Hematopoietic Cells. *J Vis Exp*. 2010;e2195.
- [13] Pelekanos RA, Sardesai VS, Futrega K, Lott WB, Kuhn M, Doran MR. Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human Placenta Tissue. *J Vis Exp*. 2016;54204.
- [14] Krishnamurthy J, Sharpless NE. Stem Cells and the Rate of Living. *Cell Stem Cell*. 2007;1:9-11.
- [15] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006;208:64-76.
- [16] Riordan NH, Madrigal M, Reneau J, et al. Scalable efficient expansion of mesenchymal stem cells in xeno free media using commercially available reagents. *J Transl Med*. 2015;13:232.
- [17] Riordan NH, Morales I, Fernandez G, et al. Clinical feasibility of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis. *J Transl Med*. 2018;16:57.