



ORIGINAL

Diferenciación neural de células del estroma de médula ósea humana en presencia de líquido cefalorraquídeo

Neural differentiation of human bone marrow stromal cells in the presence of cerebrospinal fluid

Vaquero J, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Oya S, Zurita M

Unidad de Investigación Neurociencias, Cátedra FUNDACIÓN MAPFRE-UAM para Investigación en Daño Cerebral, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Analizar la influencia del LCR sobre el proceso de diferenciación neural de BMSC inducida por agentes químicos.

Material y métodos: Se hizo un estudio de diferenciación química de BMSC humanas, valorando el porcentaje de ellas que expresan marcadores neurales, a diferentes tiempos tras ser expuestas *in vitro* a factores químicos de inducción neuronal, y se ha comparado este proceso de transdiferenciación morfológica con el obtenido tras repetir el estudio en las mismas condiciones experimentales, pero añadiendo al medio de cultivo 1 ml de LCR, con una concentración de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) de 1,5 pg/ml.

Resultados: Los factores neurotróficos presentes en LCR, en las condiciones experimentales del presente estudio, no modifican el proceso de diferenciación neural de BMSC mediado *in vitro* por agentes químicos.

Conclusiones: Este hallazgo sugiere que cuando las BMSC son administradas en el espacio subaracnoideo, los factores neurotróficos del LCR no influyen significativamente en el proceso de su diferenciación neural.

Palabras clave:

Células madre mesenquimales. Transdiferenciación celular. Células estromales.

Abstract

Objective: To analyze the influence of cerebrospinal fluid (CSF) upon the neural differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) induced by chemical agents.

Material and methods: A chemical differentiation study was made of human BMSCs, assessing the percentage of the latter that express neural markers at different timepoints following *in vitro* exposure to chemical neural induction factors. This morphological trans-differentiation process was in turn compared with that obtained after repeating the study under the same conditions but adding 1 ml of CSF to the culture medium, with a brain derived neurotrophic factor (BDNF) concentration of 1.5 pg/ml.

Results: Under the experimental conditions of this study, the neurotrophic factors present in CSF did not modify the neural differentiation process of BMSCs mediated by chemical agents *in vitro*.

Conclusions: These findings suggest that when BMSCs are administered within the subarachnoid space, the neurotrophic factors in CSF do not significantly influence the neural differentiation of the cells.

Key words:

Mesenchymal stem cells. Cell trans-differentiation. Stromal cells.

Correspondencia

J. Vaquero
Hospital Puerta de Hierro. Majadahonda, Madrid
jvaquero@telefonica.net



Introducción

En los últimos años se han obtenido evidencias a favor de que las células madre mesenquimales adultas, obtenidas del estroma de médula ósea (generalmente conocidas como *Bone marrow stromal cells* o BMSC), pueden sufrir un fenómeno de diferenciación morfológica hacia células con aspecto de neuronas o de astrocitos, cuando son cultivadas en presencia de determinados agentes químicos [1-3]. Sin embargo, se ha cuestionado si las células así obtenidas son realmente células nerviosas o bien su apariencia es el resultado de modificaciones del fenotipo celular causadas por los agentes químicos empleados [4,5] o incluso el resultado de un fenómeno de fusión celular [6-9]. En cualquier caso, aunque fuéramos capaces de obtener auténticas células nerviosas a partir de células del estroma de médula ósea, por medio de sustancias químicas, el empleo de este método de diferenciación celular presenta múltiples inconvenientes en la utilización clínica para protocolos de terapia celular, tanto por la posible toxicidad de las sustancias químicas exógenas que inducen la diferenciación, como por la necesidad de mantener una exposición continua de las células madre mesenquimales a dichos agentes, al objeto de mantener estable el fenotipo neural alcanzado [10].

Mediante el empleo de un co-cultivo de células estromales de médula ósea y de células de Schwann de origen murino se pudo demostrar que es factible lograr una diferenciación neural de las células estromales de la médula ósea, sin necesidad de utilizar agentes químicos exógenos en el medio de cultivo [11].

La utilización de co-cultivos separados por membranas porosas de policarbonato descartó la posibilidad de fenómenos de fusión celular, como explicación a la aparente transdiferenciación neural de las células estromales, llegándose a la conclusión de que los factores solubles aportados por las células de Schwann pueden inducir la transformación de las células estromales en células de aspecto neuronal [12]. Este hecho apoya la posible eficacia de los trasplantes de células estromales de médula ósea para regenerar estructuras lesionadas del sistema nervioso, sin necesidad de someterlas a ningún tipo de manipulación *in vitro*, ya que su posible diferenciación neural puede ser lograda *in vivo* y mediada por factores solubles aportados por células gliales [13-18].

Entre los principales factores responsables de este fenómeno de diferenciación celular, cabe señalar que el Factor de Crecimiento Nervioso y el BDNF son potentes factores neurotróficos, presentes en los astrocitos del sistema nervioso central responsables de la transformación de estas células hacia elementos de morfología neuronal [19].

Por otra parte, se están iniciando en clínica humana diversos ensayos clínicos de trasplante de células estromales de médula ósea para el tratamiento de la paraplejia traumática y otras enfermedades neurológicas, planteándose en estos ensayos, la conveniencia de utilizar diversos medios de soporte celular (suero fisiológico, plasmas autólogos, matrices de fibrina, etc) para mejorar la supervivencia y diferenciación de las células trasplantadas.

La posibilidad de utilizar LCR autólogo no se ha considerado hasta ahora en estos protocolos, a pesar de que el LCR contiene numerosos factores neurotróficos (factor de crecimiento nervioso o *Nervous Growth Factor* (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro o *Brain Derived Nervous Factor* (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de células liales o *Glial Derived Nervous Factor* (GDNF)). Por otra parte, se está planteando la administración intratecal de células madre adultas para tratar las secuelas del daño cerebral o medular [13, 15, 20-22] por lo que se hace necesario conocer el posible efecto beneficioso que pueden ejercer los factores tróficos presentes en el LCR, potenciando los fenómenos de diferenciación neural de las células estromales de la médula ósea. Como consecuencia de este planteamiento, el presente trabajo fue diseñado con el objetivo de conocer si la adición de LCR humano al medio de inducción mediante el cual se logra una transformación neural de células estromales humanas, es capaz de aumentar o mantener esta diferenciación celular.

Material y métodos

Las células estromales humanas (BMSC) fueron obtenidas a partir de aspirados de la médula ósea del esternón, en el curso de intervenciones quirúrgicas que precisaron esternotomía, en pacientes que fueron sometidos a cirugía de revascularización miocárdica. Todos firmaron el consentimiento informado.

El volumen del aspirado de médula ósea, de unos 5 cc, se tomó con una aguja heparinizada (Heparina sódica 1000UI/ml, ROVI) específica para aspiración de médula ósea de los laboratorios Wacrees (ref. DBMNI1501). La muestra de médula ósea fue diluida en una proporción 1:1 en solución de Hank's o DMEM / 10% FBS y tras pasar varias veces la muestra a través de una aguja de insulina para eliminar los aglomerados celulares, se utilizó un filtro de nilón de 70 micras para eliminar posibles restos óseos. La suspensión celular obtenida fue sometida a una centrifugación en gradiente de densidad (técnica de Ficoll-Hypaque) que consiste en colocar la muestra de médula ósea diluida con medio de cultivo en una proporción 1:1 ó 1:2 sobre una solución de Ficoll (9 cc de muestra por cada 6cc de linfoprep) para eliminar las células CD45 y glicoforina A positivas.



Tras la centrifugación, a 2500g, durante 30 minutos se recogió el sobrenadante y la interfase, siendo estos resuspendidos en medio Hank's sin calcio y magnesio pero con antibiótico, o en medio alfa-DMEM/10% FBS con antibiótico. Las células fueron nuevamente centrifugadas, a 1500 g, durante 15 minutos y el precipitado resuspendido en 20 cc de medio alfa-MEM con 2mM de L-glutamina, un 20% de suero fetal bovino (FBS), 100u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 5 µ/ml de gentamicina y sin deoxiribonucleótidos ni ribonucleótidos. Finalmente, las células fueron colocadas en un frasco de cultivo de 175 cm² e incubadas en una estufa a 37°C, con un 5% de CO₂. A las 48 horas de incubación, el sobrenadante conteniendo restos celulares y células no adherentes fueron eliminados, quedándonos solamente con las células adherentes.

Posteriormente, el cultivo se lavó al menos dos veces con *buffer* fosfato salino (PBS) a pH7,4, estéril, añadiendo posteriormente 12 ml de medio alfa-MEM completo con 20% de FBS, que fue reemplazado cada 2-3 días, durante 14 días. Cuando las células alcanzaron un desarrollo cercano a la confluencia, fueron levantadas del frasco de cultivo mediante su incubación con 3 ml de tripsina 0.25%/1mM EDTA, durante 4-5 minutos, a 37°C. Tras este periodo de incubación, la tripsina fue inactivada con 6 ml de medio alfa-MEM completo. Las células obtenidas tras ser centrifugadas, a 1200 rpm, durante 15 minutos fueron lavadas al menos dos veces con medio alfa-MEM/10%FBS mediante centrifugación a 1000 rpm, durante 5 minutos cada lavado. Finalmente, el *pellet* obtenido fue diluido en medio alfa-MEM/20%FBS y sometido a recuento mediante el test de viabilidad de azul tripán.

Tras el recuento, las BMSC fueron subcultivadas en placas p35, en un medio alfa-MEM/20%FBS con antibióticos y glutamina, a una concentración de 2mM. Luego fueron plaqueadas a una densidad de 2500 células/cm² y el medio de cultivo (alfa-MEM/20% FBS) sustituido por un medio de preinducción consistente en: DMEM con 20% de FBS y 1mM de 2-beta-mercaptoetanol. A las 24 horas, tras eliminar el medio de preinducción, las células fueron transferidas 48 horas a un medio DMEM con un 2% de DMSO y 200 µm de *butylated hydroxyanisole* (BHA).

Para la caracterización inmunohistoquímica de BMSC indiferenciadas se realizaron estudios de marcaje con CD14 (1:40, NeoMarkers, Co, Fremont CA, EE.UU.); CD31 (1:100, NeoMarkers); CD34 (1:200, Master Diagnostica, Granada, España); CD45 (1:200, NeoMarkers); CD73 (1:100, Santa Cruz Inc., CA, EE.UU.); CD105 (5mg/ml, NeoMarkers); Vimentina (1:200, Master Diagnostica) y Fi-

bronectina (1:300, NeoMarkers). Para el estudio de la diferenciación de BMSC hacia un fenotipo neural se hicieron marcajes de NSE (1:800, NeoMarkers); NF-200 (1:500, Serotec, Kidlington, UK); nestina (1:50, Chemicon Int. Inc. Temecula CA, EE.UU.); beta-tubulina (2mg/ml, NeoMarkers); GFAP (2mg/ml, NeoMarkers) y Mab1580 (1:200, Chemicon).

Para cada marcador celular se analizaron 10 campos microscópicos, a 100 x, en los diferentes momentos de cultivo (4h, 12h, 24h, 72h y 1 semana) y se cuantificó, en cada momento, el porcentaje de células inmunopositivas con cada marcador. Como valor final se consideró el promedio de 10 experimentos repetidos de diferenciación de las BMSC.

La recogida de datos del estudio inmunohistoquímico fue hecha por un observador que no conocía el origen de la muestra. Los porcentajes medios (\pm desviación estándar) de las células de cada cultivo, a los diferentes tiempos de evolución, fueron comparados utilizando el programa estadístico Prisma (GraphPad) y el test de ANOVA, realizándose el test de Mann-Whitney para comparación de resultados entre grupos. Se consideró como significación estadística un valor de $p < 0,05$.

Tras conocer el patrón de diferenciación neural de las BMSC por medio de este procedimiento, se repitió el estudio, con las mismas características técnicas, pero añadiendo 1 ml de LCR humano al medio de cultivo, en todos los pases, a partir del momento en que éstas fueron tratadas con el medio de preinducción neural.

El LCR utilizado procedió del espacio subaracnoideo lumbar de dos pacientes sanos, con edades de 23 y 45 años a los que se les había colocado un drenaje externo para evitar fístulas de LCR, tras cirugía de hernia discal complicada por desgarros duros. La concentración de BDNF en las muestras de LCR utilizado fue de 1,5 pg/ml (determinación mediante técnica de ELISA).

Resultados

Las BMSC obtenidas de la médula ósea humana mostraron, antes de iniciar los experimentos de diferenciación neural, una morfología mesenquimal característica y expresaban positividad a los marcadores CD31, CD45, CD73, CD105, vimentina y fibronectina. En el curso de los procedimientos de diferenciación neural, se observaron cambios morfológicos progresivos y su transición progresiva, desde una morfología indiferenciada hacia una morfología neural, coincidió con el aumento de expresión de marcadores neuronales. Así, a la hora de la inducción se observaron células nestina positivas (28% \pm 4%) y a las 4 horas aumentaron a un 70% \pm 6%.

A las 8 horas, el 15% \pm 5% de las células mostraron positividad a nestina y se comenzaron a detectar células NSE positivas (37% \pm 6%).

A las 24 horas el número de células NSE ascendió a un 65% \pm 5%. A las 24 horas se detectaron células positivas para NF-200 (63% \pm 4%) y beta-tubulina (45% \pm 5%). A las 72 horas prácticamente todas las células mostraron marcadores propios de neuronas maduras NSE (80% \pm 10%), NF-200 (82% \pm 8%) y beta-tubulina (80% \pm 8%).

A la semana del tratamiento, encontramos un 90% \pm 8% de células NSE positivas, 88% \pm 5% de células NF-200 positivas y 90% \pm 3% de células beta-tubulina positivas. Todos los cultivos fueron negativos para la PGFA (marcador de diferenciación astrogial) y para el marcador de oligodendrocitos MAB1580. Por otra parte, la expresión de marcadores mesenquimales (CD105, CD73, vimentina y fibronectina) dejó de observarse en las BMSC de forma progresiva tras ser tratadas con los medios de preinducción e inducción neural, siendo completamente negativos estos marcadores a las 48 horas del inicio de los experimentos.

Tras repetir los cultivos en la segunda fase del estudio, adicionando LCR al medio (1 ml de LCR a todas las placas de cultivo), no se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de células que mostraron marcadores de diferenciación neural. Así, a la hora de la inducción, el número de células nestina positivas fue de 30% \pm 6% y a las 4 horas aumentaron a un 72% \pm 8%.

A las 8 horas, el 15% \pm 8% de las células mostraron positividad a nestina y se comenzaron a detectar células NSE positivas (35% \pm 6%).

A las 24 horas el número de células NSE ascendió a un 62% \pm 7%. A las 24 horas se detectaron células positivas para NF-200 (66% \pm 6%) y beta-tubulina (48% \pm 8%). A las 72 horas prácticamente todas las células mostraron marcadores propios de neuronas maduras, en un porcentaje similar al observado en los experimentos previos (85% \pm 10% de positividad para NSE; 86% \pm 10% de positividad para NF-200 y 86% \pm 10% de positividad para beta-tubulina).

A la semana, el porcentaje de células expresando los diferentes marcadores también fue similar al obtenido en la primera fase del estudio, encontrando un 92% \pm 4% de células que expresaban NSE, un 90% \pm 6% expresando NF-200 y un 86% \pm 5% expresando beta-tubulina. La Figura 1 muestra una de las imágenes de diferenciación neuronal morfológica obtenidas en el presente estudio y la Figura 2 muestra la expresión de marcadores de diferenciación neural en diferentes fases del estudio y según que las BMSC humanas fueran cultivadas o no en presencia de LCR.

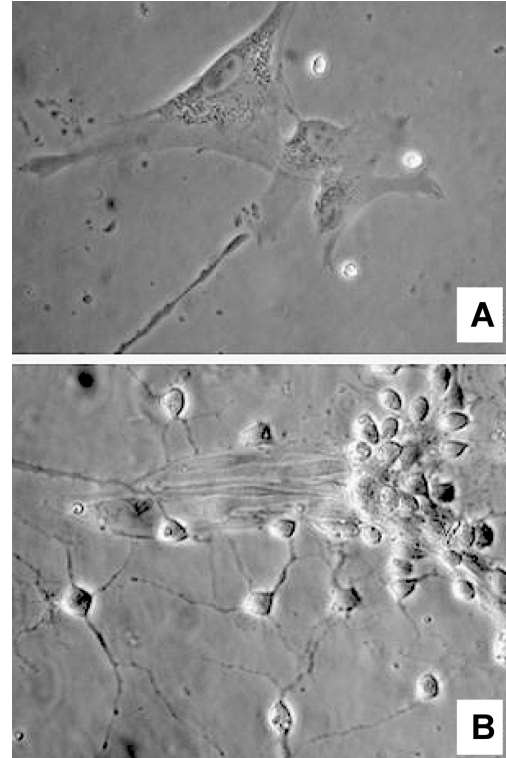


Fig. 1. a) Aspecto morfológico de las células madre mesenquimales humanas, obtenidas del estroma de la médula ósea (BMSC) antes de ser sometidas al protocolo de inducción neural. b) Aspecto neuronal de las BMSC, a la semana de ser cultivadas en el medio de inducción neural. Cultivos sin LCR en el medio. Microscopio de contraste de fase.

Discusión

Nuestros resultados en el presente estudio confirman observaciones previas acerca de que las células madre adultas mesenquimales, del estroma de médula ósea, pueden sufrir una transformación morfológica progresiva hacia elementos de aspecto neural, principalmente neuronas, por medio de factores químicos específicos [1-3, 11, 23]. Por otra parte, la observación previa de que determinados factores solubles presentes en el sistema nervioso central, tales como como BDNF y NGE, pueden estar implicados en la diferenciación neural de las BMSC [19] nos ha llevado a estudiar el posible efecto de la adición de LCR humano a los medios de cultivo generalmente utilizados para lograr la diferenciación neural de BMSC. Los hallazgos que hemos obtenido sugieren que el LCR, cuando es utilizado en asociación a los factores químicos exógenos de inducción neural, no modifica el patrón de transdiferenciación de BMSC, al menos en las condiciones experimentales que hemos establecido en este estudio. Ob-

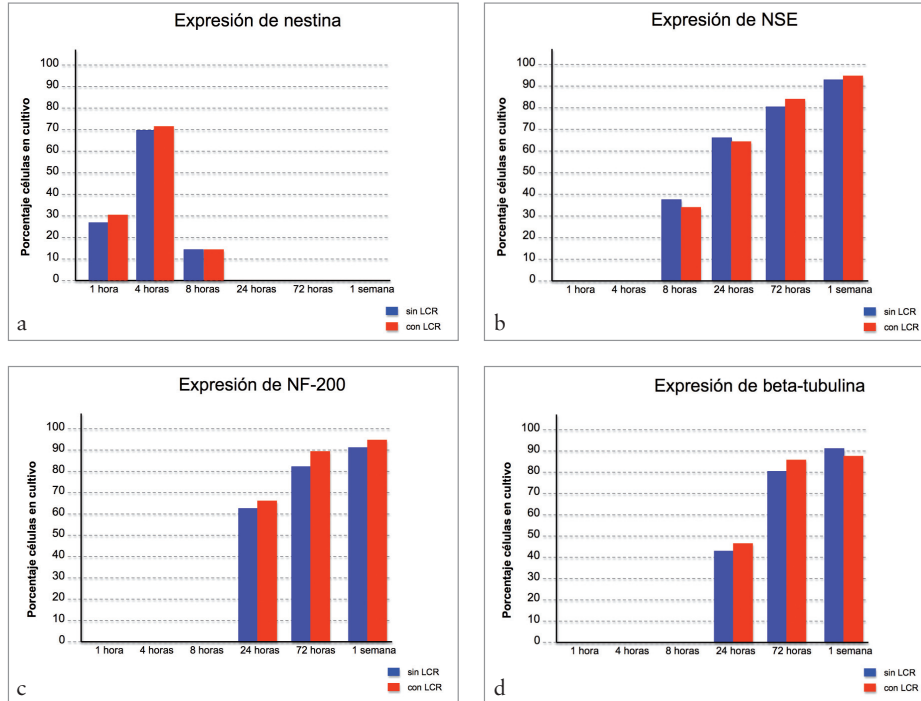


Fig. 2. Porcentaje de BMSC que expresan marcadores de diferenciación neural (a) y de diferenciación neuronal (b,c,d) en diferentes tiempos de evolución y según que se añadiera o no se añadiera LCR al medio de inducción neuronal. No se observaron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la presencia de LCR en el medio de cultivo.

servaciones previas sobre BMSC murinas han mostrado que la adición de BDNF al medio de cultivo (10ng/ml en un medio de cultivo conteniendo 12ml de alfa-MEM/10%FBS con antibióticos y L-glutamina, a concentración de 2mM) logra una transdiferenciación neural de las BMSC [19], lo que sugiere que los hallazgos negativos que hemos obtenido pueden estar en relación con las bajas concentraciones de BDNF presentes en el LCR y por tanto utilizadas en nuestro presente diseño experimental, con una posible inactivación del efecto del BDNF del LCR por los factores químicos exógenos empleados en el proceso de la transdiferenciación química de las BMSC, o bien con un diferente efecto de los factores tróficos presentes en el LCR cuando actúan sobre BMSC murinas o BMSC humanas.

En los últimos años se se han publicado numerosas observaciones a favor de la utilidad de la administración de BMSC en el espacio subaracnoideo, en los protocolos de terapia celular aplicados al sistema nervioso [13,15,20-22] planteándose que el LCR puede ejercer un efecto beneficioso sobre el mantenimiento de la viabilidad celular y sobre la posible diferenciación de las BMSC administradas. Teniendo en cuenta las bajas concentraciones de BDNF presentes en el LCR es dudoso que la presencia de este factor neurotrófico pueda ejercer un efecto diferencia-

dor de las BMSC, y es lógico admitir que la utilidad de administrar BMSC en LCR debe relacionarse con el hecho de que el LCR sirve de vehículo para dichas células, las cuales pueden ejercer su posible efecto beneficioso tras atravesar el parénquima nervioso y quedar expuestas a los agentes neurotróficos locales presentes en el interior del tejido nervioso [24].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Woodbury D, Schwar EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:364-70.
2. Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164:247-56.
3. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004; 113:1701-10.
4. Liu Y, Rao MS. Transdifferentiation-factor or artifact. *J Cell Biochem* 2003; 88:29-40.



5. Lu P, Blesch A, Tuszynsk MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation or artefact? *J Neurosci Res* 2004; 77:174-91.
6. Alvarez-Dolado M, Pardal R, García Verdugo JM, Fike JR, Lee H, Pfeffer K, et al. Fusion of bone-marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425:968-73.
7. Chen KA, Laywell ED, Marshall G, Walton N, Zheng T, Steindler DA. Fusion of neural stem cells in culture. *Exp Neurol* 2006; 198:129-35.
8. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, et al. Cell fusion is the principal source of bone marrow derived hepatocytes. *Nature* 2002; 422:897-901.
9. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416:545-8.
10. Zurita M, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Neural transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon. *Neurosci Res* 2008; 60:275-80.
11. Zurita M, Vaquero J, Oya S, Miguel M. Schwann cells induce neuronal differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport* 2005; 16:505-8.
12. Zurita M, Vaquero J, Oya S, Bonilla C, Aguayo C. Neurotrophic Schwann-cell factors induce neural differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport* 2007; 18:1713-7.
13. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 2004; 187:266-78.
14. Park HC, Shims YS, Ha Y, Yoon SH, Park SR, Choi BH, et al. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Tissue Eng* 2005; 11:913-22.
15. Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, Kushner R, Swanger SA, Kopen GC, et al. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil, Neural Repair* 2006; 20:278-96.
16. Syková E, Homola A, Mazanec R, Lachmann H, Konrádová SL, Kobylka P, et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant* 2006; 15:675-87.
17. Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40:609-19.
18. Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, et al. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells* 2007; 25:2066-73.
19. Zurita M, Aguayo C, Oya S, Vaquero J. Implication of neurotrophic factors in the neuronal transdifferentiation of adult mesenchymal stem cells. *Mapfre Medicina* 2007; 18: 201-8.
20. Sateke K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine* 2004; 29:1971-9.
21. Bakshi A, Hunter C, Swanger S, Lepore A, Fischer I. Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. *J Neurosurg Spine* 2004; 1:330-7.
22. Bakshi A, Barshinger AL., Swanger SA, Madhavani V, Shumsky JS, Neuhuber B, et al. Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation. *J Neurotrauma* 2006; 23:55-65.
23. Zurita M, Vaquero J, Oya S, Aguayo C. Transdiferenciación neuronal de células madre mesenquimales de médula ósea humana. *Mapfre-Medicina* 2005; 16:167-73.
24. Vaquero J, Zurita M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: a challenge for contemporary neurobiology. *Histol Histopath* 2009; 24:107-16.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.