

Caracterización fenotípica de las células madre de médula ósea utilizadas en la terapia celular regenerativa

Phenotypic characterization of the bone marrow stem cells used in regenerative cellular therapy

DraC. Consuelo Macías-Abraham, Lic. Lázaro O. del Valle-Pérez, Dra. Aymara Baganet-Cobas, Dra. Elvira Dorticós-Balea, Dr. Juan C. Jaime-Fagundo, Dra. Rosa M. Lam-Díaz, Lic. Bertha B. Socarrás-Ferrer, Dra. Miriam Sánchez-Segura, Dra. Vianed Marsán-Suárez, Lic. Lourdes Palma-Salgado, Prof. DrC. Porfirio Hernández-Ramírez, Prof. DrC. José M. Ballester-Santovenia

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

La Medicina Regenerativa es una novedosa terapéutica de amplio potencial en diferentes enfermedades para la cual se utilizan células madre procedentes de la médula ósea (MO), cuya caracterización fenotípica es limitada. En nuestro trabajo se estudió la expresión de diferentes marcadores de la membrana celular en células mononucleares (CMN) de la MO de 14 pacientes a quienes se les realizó terapia celular autóloga, obtenidas por punción medular y movilización a la sangre periférica, con el objetivo de caracterizar los diferentes tipos de células presentes en esta población celular heterogénea e identificar las moléculas de adhesión implicadas en su adhesión. Se observó mayor presencia de células madre adherentes del estroma medular en las CMN obtenidas directamente de la MO; una mayor población de células CD90+ en las CMN procedentes de sangre periférica CD34-/CD45- con una elevada expresión de las moléculas CD44 y CD62L, lo que sugiere mayor presencia de células madre mesenquimales (CMM) en las células movilizadas del estroma medular. Los valores más elevados de células CD34+ en las células madre procedentes de sangre periférica con baja expresión de las moléculas CD117- y DR- sugiere la presencia de células madre hematopoyéticas, hemangioblastos y células progenitoras endoteliales movilizadas a la circulación periférica. Se demostró que tanto las CMN procedentes de MO como de sangre periférica, muestran una elevada expresión de células madre con expresión de la molécula de adhesión CD44 (marcador de CMM), probablemente implicadas en su migración, asentamiento y diferenciación.

Palabras clave: células madre, células progenitoras, medicina regenerativa, células mesenquimales, células endoteliales.

ABSTRACT

Regenerative medicine is a novel therapeutic method with broad potential for the treatment of various illnesses, based on the use of bone marrow (BM) stem cells, whose phenotypic characterization is limited. The paper deals with the expression of different cell membrane markers in mononuclear BM cells from 14 patients who underwent autologous cell therapy, obtained by medullary puncture and mobilization to peripheral blood, with the purpose of characterizing the different types of cells present in that heterogeneous cellular population and identifying the adhesion molecules involved in their adhesion. A greater presence was observed of adherent stem cells from the marrow stroma in mononuclear cells obtained directly from the BM; a larger population of CD90+ cells in mononuclear cells from CD34-/CD45- peripheral blood with a high expression of molecules CD44 and CD62L, which suggests a greater presence of mesenchymal stem cells (MSC) in mobilized cells from the marrow stroma. The higher levels of CD34+ cells in peripheral blood stem cells with a low expression of molecules CD117- and DR- suggests the presence of hematopoietic stem cells, hemangioblasts and progenitor endothelial cells mobilized to peripheral circulation. It was found that mononuclear cells from both the BM and peripheral blood show a high presence of stem cells with expression of adhesion molecule CD44 (MMC marker), probably involved in their migration, settling and differentiation.

Key words: Stem cells, progenitor cells, regenerative medicine, mesenchymal cells, endothelial cells.

INTRODUCCIÓN

Una de las bases fundamentales de la Medicina Regenerativa es el trasplante celular autólogo a tejidos lesionados, de células mononucleares (CMN) provenientes de la médula ósea. Su objetivo es la reparación o disminución del daño hístico a partir de los diferentes mecanismos de acción de estas células implantadas en el tejido u órgano dañado.¹

El estroma de la médula ósea está constituido por la célula hematopoyética y una población heterogénea de células no hematopoyéticas que incluye: células endoteliales, fibroblastos, adipositos, células osteogénicas (subpoblación que ejerce efectos reguladores positivos y negativos sobre la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas)^{2,3} y células adherentes del estroma medular que son capaces de renovarse por sí mismas y diferenciarse en cartílago, músculo, tendón y grasa,⁴⁻⁶ por lo que la médula ósea que no ha sido sometida a métodos de depleción o extracción de poblaciones celulares específicas, contiene ambos tipos de precursores, estromales y hematopoyéticos, y constituye la fuente celular principal para la implantación de células madre en otros tejidos.

En esta novedosa terapéutica se utilizan diferentes tipos celulares, y dentro de los mecanismos involucrados en sus beneficios clínicos se encuentran: la reparación tisular y el aumento de la angiogénesis, la vascularización o ambos efectos.⁷

Recientemente, varias poblaciones de células madre no hematopoyéticas se han descrito en la médula ósea y otros tejidos adultos que incluyen: células madre mesenquimales (CMM); células progenitoras multipotentes adultas (MAPCs, del inglés

progenitor multipotent stem cells); células inducibles de multilinaje adultas aisladas de médula ósea (MIAMI, del inglés *marrow isolated adult multilineage inducible*); células madre multipotentes adultas (MASCs, del inglés, *multipotent adult stem cells*); células progenitoras endoteliales (CPE); OmniCitos y células madre pequeñas parecidas a células embriónicas, conocidas como VSEs (del inglés, *very small embryonic like*).⁸ Todas las anteriores pueden corresponder a poblaciones similares o a poblaciones superpuestas de células madre, denominadas de manera diferente por varios investigadores en diversas condiciones experimentales de aislamiento y expansión en cultivos.

La adherencia y la capacidad multipotencial de las CMN de médula ósea de diferenciarse y proliferar a las células del tejido al que son trasplantadas, se encuentran directamente relacionadas con la expresión de determinadas moléculas en su membrana, que determina un particular fenotipo de diferenciación, y con la interacción de las moléculas de adhesión con sus ligandos a nivel de este tejido.

La diferenciación de estos tipos celulares y el conocimiento o caracterización de las células empleadas en esta terapia, es de gran importancia para poder correlacionar el porcentaje de estas, con la forma de terapia, la concentración celular administrada, el esquema de inyección y la evolución clínica de los pacientes, lo que permitirá un perfeccionamiento y una mejor comprensión de este proceder terapéutico.

Por todo lo anterior y lo limitado de este conocimiento, nos propusimos caracterizar la población celular de CMN de la médula ósea y la sangre periférica utilizadas para la terapia regenerativa, mediante la cuantificación de los niveles de expresión de diferentes moléculas de la membrana celular.

MÉTODOS

Características de la muestra

CMN obtenidas de 14 pacientes adultos con criterio de terapia celular regenerativa: 10 poblaciones celulares obtenidas directamente de médula ósea y 4 por movilización de las CMN a la sangre periférica mediante previa estimulación.

Métodos de obtención celular

Las CMN de la médula ósea se obtuvieron por aspirados mediante trócar de biopsia, y se aislaron por el método de gradiente densidad con Ficoll 400-Telebrix 38 (método manual de Boyüm modificado).⁹

Las CMN se movilizaron a la sangre periférica por estimulación de la médula ósea con factores estimuladores de colonias granulocíticas monocíticas (FSC-GM) (LeukoCIM, CIMAB, S.A., La Habana, Cuba). Se aislaron por separación automatizada con máquina separadora Fresenius AS 240 (Fresenius AG, Schweinfurt, Alemania) y se concentraron mediante su programa BMSC (método automatizado).¹⁰

La caracterización de las diferentes poblaciones celulares que contienen las CMN autólogas que se implantaron a los pacientes en la terapia regenerativa, se realizó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos para diferentes moléculas de la membrana celular mediante simple y doble marcaje.

Citometría de flujo

A todas las muestras estudiadas, CMN procedentes de médula ósea y sangre periférica, se les cuantificó la expresión de las moléculas CD34, CD45, CD117, HLADr, CD29, CD14, CD90, CD44, CD62L y CD11a mediante inmunofluorescencia directa por citometría de flujo, como se ha descrito anteriormente.^{11,12}

Se tomaron 100 µL de las CMN, se incubaron con 10 µL de cada AcMo conjugado con fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína o ficoeritrina, DAKO, Dinamarca) durante 30 minutos a 4 °C; los hematíes se lisaron con 1 mL de solución lisante (Becton-Dickinson, EE.UU.); las células se lavaron 2 veces con solución balanceada de fosfato (PBS pH 7,2) a 1 500 rpm; se resuspendieron en 500 µL del mismo PBS y la lectura se realizó en un citómetro de flujo FAC-Scan (Becton- Dickinson, EE.UU.), mediante la adquisición de 50 000 células en cada caso.

En 6 muestras de CMN procedentes de médula ósea se cuantificaron las moléculas de membrana mediante simple marcaje. En 8 muestras de CMN (4 procedentes de médula ósea y 4 de sangre periférica), se utilizó el doble marcaje mediante las siguientes combinaciones de anticuerpos monoclonales: CD34/45, CD45/117, CD45/Dr, CD34/29, CD34/90, CD34/14, CD45/117, y en todos los casos se utilizó el simple marcaje de las moléculas de adhesión CD44, CD62 L y CD11a.

RESULTADOS

En las CMN procedentes de extracción directa de la médula ósea se observó una mayor expresión de las moléculas de membrana específicas que corresponden con el patrón de expresión de las poblaciones de células madre adherentes del estroma medular CD34-/CD45-/DR-/CD29+/CD14-/CD117- comparadas con el fenotipo de moléculas de membrana descrito para la célula madre hematopoyética CD34+/CD45-/CD117+/DR+ (figs. 1 y 2).

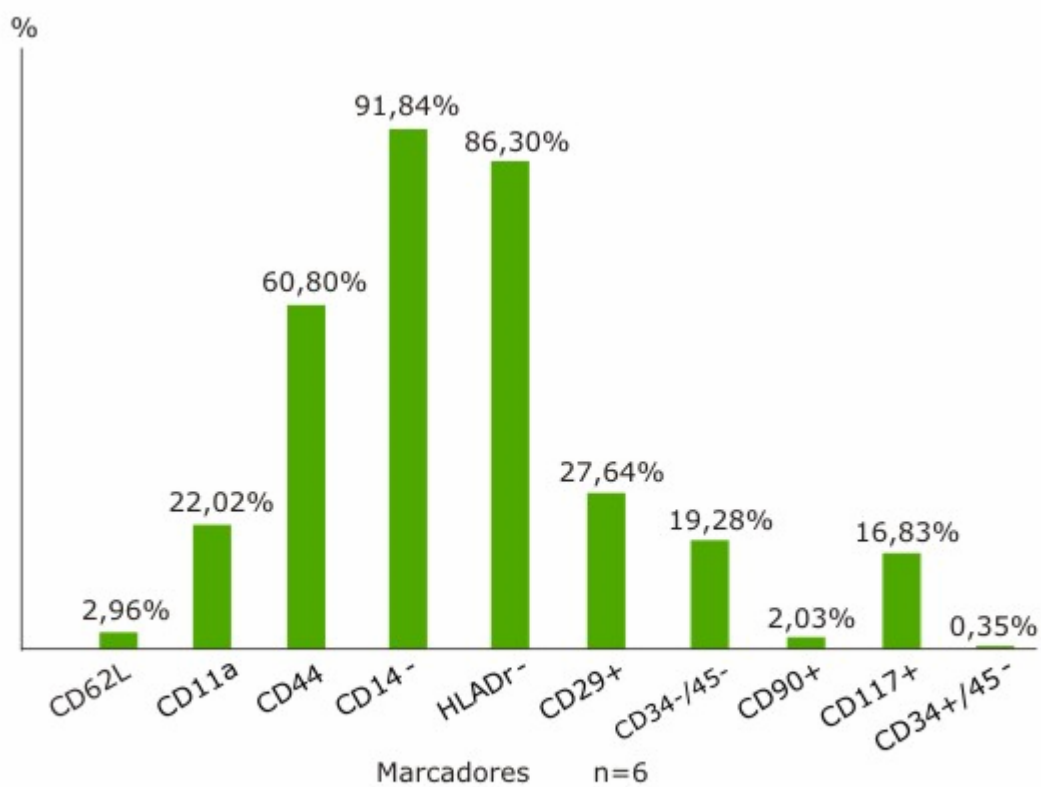


Fig. 1. Expresión fenotípica de marcadores de membrana (mediana) de células madre obtenidas por punción de médula ósea mediante simple marcaje.

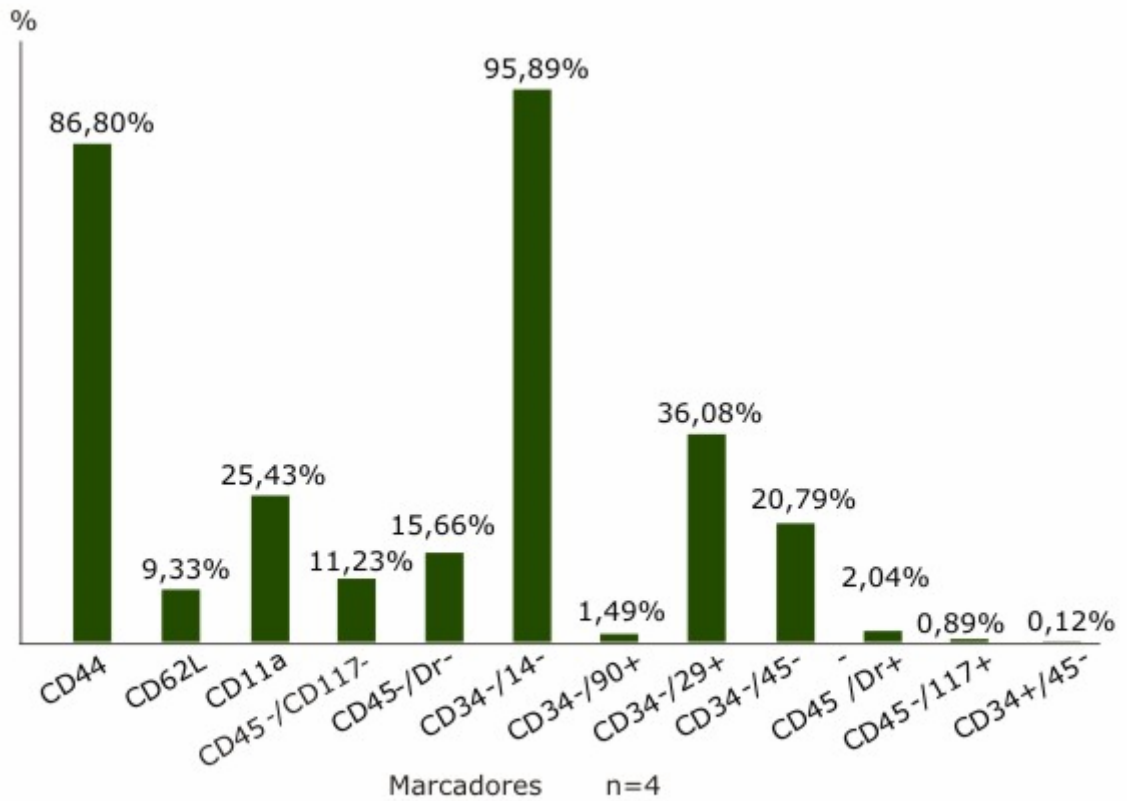


Fig. 2. Expresión fenotípica de marcadores de membrana (mediana) de células madre obtenidas por punción de médula ósea mediante doble marcaje.

Sin embargo, se observó un incremento del valor de la molécula CD90+ en las CMN procedentes de sangre periférica CD34-/CD45- previa estimulación con FSC- GM; y de las moléculas CD44 y CD62L en comparación con los valores observados en las CMN obtenidas por punción de la médula ósea (fig. 3).

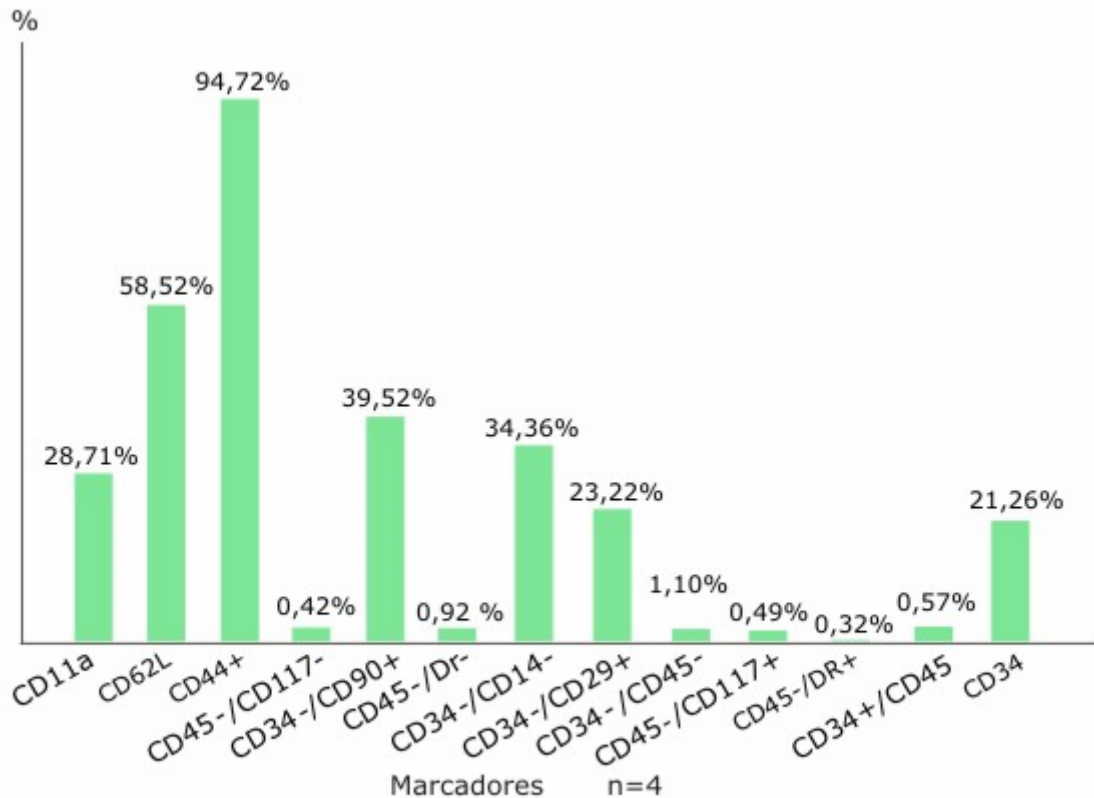


Fig. 3. Expresión fenotípica de marcadores de membrana (mediana) de células madre movilizadas de médula ósea en sangre periférica mediante doble marcaje.

En las CMN de médula ósea y sangre periférica se demostró una elevada expresión de células madre con expresión de la molécula de adhesión CD44, similar en la molécula CD11a (LFA-1), y una mayor expresión de las moléculas de adhesión CD62L (L-selectina) en las procedentes de sangre periférica (figs. 1, 2 y 3).

Se demostró un porcentaje de expresión de células CD34+ más elevado en las células madre procedentes de sangre periférica, con baja expresión de las moléculas CD117- y DR- (fig. 3).

En 11 de los 14 pacientes estudiados, la terapia celular regenerativa mostró criterios de evolución satisfactorios o favorables de acuerdo con los parámetros de evaluación para cada proyecto clínico de investigación.

DISCUSIÓN

En nuestro trabajo se observó un predominio de marcadores de membrana específicos que corresponden con una mayor presencia de células madre adherentes del estroma medular en las CMN procedentes de médula ósea, lo cual se explica por el hecho de que estas: CMM, MAPCs, MIAMI y MASCs, han sido identificadas y caracterizadas como una población de células adherentes derivadas de la médula ósea capaces de diferenciarse a múltiples líneas mesodérmicas.⁸

En general, las células estromales cultivadas, independientemente del método de cultivo empleado, no expresan las moléculas CD45 y CD34 características de la línea hematopoyética. Sin embargo, el fenotipo exacto de la célula precursora estromal o de diferentes poblaciones celulares en la médula ósea humana, aún está en discusión.

Diversos autores plantean que pueden corresponder a poblaciones similares de células madre, denominadas de manera diferente en diversas condiciones experimentales de aislamiento y expansión en cultivos.

El incremento del valor de la molécula CD90+ en las CMN procedentes de sangre periférica CD34-/CD45- en comparación con el porcentaje en las CMN de médula ósea CD34-/CD45-, y los valores elevados de las moléculas CD44 y CD62L, sugieren una mayor presencia de CMM dentro de las células movilizadas del estroma medular. La Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT (del inglés, *Internacional Society of Cellular Therapy*), en el año 2006 propuso 3 criterios para definir las CMM: 1) deben ser adherentes en cultivo; 2) expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34 y CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y 3) diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándares de cultivo.^{13,14-17}

Se demostró en las CMN de médula ósea y sangre periférica una elevada expresión de células madre con expresión de la molécula de adhesión CD44, probablemente implicadas en la migración, asentamiento y diferenciación de estas células; y una mayor expresión de CD62L en las células madre obtenidas de sangre periférica, lo que corrobora una mayor representación de CMM dentro de las células movilizadas del estroma medular. Además de los antígenos referidos anteriormente, otros autores proponen moléculas como STRO-1, CD44 y CD166 para la tipificación de CMM. La molécula de adhesión CD44 actúa mediante la interacción con el ácido hialurónico, osteopontina, colágeno, anquirina, fibronectina y metaloproteinasas y participa en los procesos de adhesión, migración y proliferación de las CMM.¹⁸

Los valores más elevados de células CD34+ en las células madre procedentes de sangre periférica con baja expresión de las moléculas CD117- y DR- sugiere que pueden corresponder con la CMH, hemangioblastos y CPE movilizados a la circulación periférica mediante la estimulación de los FSC-GM. La CMH expresa la molécula CD34, también podría coexpresar CD34+/CD133+/FCVE2+. Es por ello que algunos investigadores denominan a estas células como hemangioblastos, considerando a este tipo de célula como un progenitor. La CMH más primitiva se caracteriza por un fenotipo específico: CD34⁻ o CD34⁺/CD38^{-low}/Thy-1⁺ /CD90⁺/Kit⁻¹⁰/Lin⁻/CD133⁺/receptor para FCEV2 (CD34⁺/CD133⁺/RFCVE⁺) bipotencial, del cual derivan ambos tipos celulares, células endoteliales y hematopoyéticas.¹⁹ Se ha demostrado que las células CD34⁺/RFCVE2⁺ procedentes de médula ósea y cordón umbilical son capaces de formar colonias mixtas hematopoyéticas-endoteliales *in vitro* que podrían representar hemangioblastos;²⁰ las CPE y CE expresan también la molécula CD34. El término de CPE se ha utilizado en células que expresan los antígenos CD133, el receptor para el factor de crecimiento vascular endotelial (RFCVE) 2 y la molécula CD34 (células CD34⁺/CD133⁺/FCVE2⁺), que pueden diferenciarse en células de linaje endotelial *in vitro* y contribuyen a la neovascularización en modelos animales de isquemia.²¹⁻²⁵

En nuestro estudio no cuantificamos la expresión de la molécula CD73. Sin embargo, observamos una expresión similar en los porcentajes de la mediana de la molécula CD11a (LFA-1) en las CMN procedentes de sangre periférica y médula ósea y esta molécula de adhesión es una $\alpha 2$ integrina. La molécula CD73 ó 5'ectonucleotidasa, se considera un marcador de linaje para las CMM y se cree que esté relacionada con mecanismos de adhesión celular, ya que se ha encontrado coexpresada con moléculas tipo $\alpha 2$ integrinas, lo que ha postulado a CD73 como un mediador de adhesión celular en CMM.^{26,27} Esto corrobora la mayor representación de células madre del estroma medular adherente en la población celular de la médula ósea utilizada en los pacientes trasplantados.

El aislamiento, la caracterización fenotípica, la expansión en cultivo y el conocimiento de las propiedades funcionales de las CMM, CPE y CE maduras, pueden variar en dependencia de la interacción directa con otras células o de la liberación de factores solubles específicos de cada microambiente.

Podemos resumir que existe una mayor presencia de células madre adherentes del estroma medular en las CMN obtenidas directamente de la médula ósea, y un fenotipo más específico de CMM dentro de las células movilizadas del estroma medular, lo que corresponde con una elevada expresión de las moléculas CD44 y L-selectina probablemente implicadas en su migración, asentamiento y diferenciación. Los valores más elevados de células CD34+ en las células madre procedentes de sangre periférica con baja expresión de las moléculas CD117- y DR-, sugieren que pueden corresponder con las CMH, hemangioblastos y CPE movilizadas a la circulación periférica.

No obstante, los resultados de estudios comparativos entre las CMN obtenidas de médula ósea y colectadas de sangre periférica sin movilización, han sido cuantitativa y cualitativamente heterogéneos de acuerdo con su origen y entre individuos.²⁸ Las células madre y CPE mostraron una mayor presencia en médula ósea y se encontró una correlación positiva muy débil entre los conteos de células CD34+ y los niveles de CPE.²⁸

En la actualidad, es de gran interés continuar profundizando en el estudio de la caracterización de los diferentes tipos celulares por su importancia en el uso terapéutico, y ampliar nuestras posibilidades de trabajo teniendo en cuenta las variaciones observadas según la fuente de obtención y el microambiente donde se desean utilizar, para lograr un mayor avance en la profundización del conocimiento y en el grado de recuperación de los pacientes con terapia celular regenerativa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hernández Ramírez P. Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [serial on the Internet]. 2009 [cited 2009 Dec 15];25(1): Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892009000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
2. Makio Ogawa M, LaRue AC, Watson PM, Watson DK. Hematopoietic stem cell origin of mesenchymal cells: opportunity for novel therapeutic approaches. Int J Hematol. 2010;91:353-59.
3. Verfaillie CM. Soluble factor(s) produced by human marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. Blood. 1993;82:1045-2053.
4. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem. 1997;64:278-94.
5. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng. 1998;4:415-28.

6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
7. Fridenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3:393-403.
8. Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Small stem cells in adult tissues: Very small embryonic-like stem cells stand up!. *Cytometry Part A* 2009;75A:4-13.
9. Boyum A, Lovhaug D, Tresland L, Nordlie EM. Separation of leukocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolarity. *Scand J Immunol*. 1991;34:697-712.
10. Hernández P, Artaza H, Díaz AJ, Cortina LD, Lam RM, Pol N, et al. Autotrasplante de células madre adultas en miembros inferiores con isquemia crítica. *Rev Esp Inv Quir*. 2007;4:204-11.
11. Aramburu J, Balboa MA, Ramírez A, Silva AA, Sanchez-Madrid F, de Landazuri MO, et al. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor $\gamma\delta$ + T lymphocytes. *J Immunol*. 1990;144:3238-47.
12. Macías C, Ballester JM, Hernández P. Expression and functional activity of the very late activation antigen-4 molecule on human natural killer cells in different states of activation. *Immunology*. 2000;100:77-83.
13. Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal stem cells: Isolation in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;174:249-82.
14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Staper Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-17.
15. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. Bone marrow stromal cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19:180-92.
16. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2006;312:2169-79.
17. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28:875-84.
18. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky L, Weinberg K, Barr M, et al. The role of the Hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*. 2006;24:928-35.
19. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lili V, et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* 2002;100:3203-08.
20. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, et al. Vascular endothelial growth factor 165 gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*. 2000;86:1198-1202.

21. Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001;97:3658-61.
22. Rafji S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cells for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-12.
23. Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003;58:390-8.
24. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-8.
25. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-67.
26. Airas L, Niemelä J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S. Differential Regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol*. 1997;136:421-31.
27. Sträter N. Ecto- 5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal*. 2006;2:343-50.
28. Capiod JC, Tournois C, Vitry F, Sevestre MA, Daliphard S, Reix T, et al. Characterization and comparison of bone marrow and peripheral blood mononuclear cells used for cellular therapy in critical leg ischaemia: Towards a new cellular product. *Vox Sanguinis*. 2009;96:256-65.

Recibido: 29 de diciembre del 2010.

Aprobado: 18 de marzo del 2011.

DraC. *Consuelo Macías-Abraham*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 643 8695, 8268, Fax (537) 644 2334. Correo electrónico: ihidir@hemato.sld.cu
Website: <http://www.sld.cu/sitios/ih>