

Caracterización fenotípica de células madre mesenquimales humanas de médula ósea y tejido adiposo. Resultados preliminares

Phenotypic characterization of mesenchymal human stem cell from bone marrow and adipose tissue preliminary results

DraC. Consuelo Macías-Abraham^I, Lic. Lázaro O del Valle-Pérez^I, DrC. José Armando Galván Cabrera^I, Lic. Karelys de la Cuétara Bernal^{II}, Lic. Berta B Socarrás Ferrer^I, Prof. DrC. Porfirio Hernández Ramírez^I, Prof. DrC. José M Ballester Santovenia^I

^I Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

^{II} Centro Internacional de Restauración Neurológica, La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: las células madre mesenquimales (CMM) poseen características fenotípicas y funcionales que les confieren un amplio potencial terapéutico por su posible uso en la terapia celular regenerativa, en el rechazo del trasplante alogénico y en enfermedades inflamatorias crónicas.

Objetivo: evaluar la expresión de moléculas de membrana que permiten identificar la expresión de patrones moleculares característicos de CMM humanas mantenidas en cultivo.

Métodos: se estudió la expresión fenotípica de células mononucleares procedentes de médula ósea obtenidas mediante aspiración medular, separadas por gradiente de Ficoll y cultivadas *ex vivo* entre los pases o subcultivos 3 y 16; y adipocitos cultivados procedentes de la extracción enzimática de tejido adiposo de donantes sanos. Se realizó doble marcaje para las moléculas CD34/CD45, CD34/CD90, CD34/CD117, y CD34/CD44.

Resultados: en los resultados preliminares obtenidos se observó que las células cultivadas procedentes de médula ósea, entre los pases 4 y 8 de cultivo expresaron 45,13 % de células CD34-/CD45- (doblemente negativas), lo que correspondió con el 25,24 % de células CD34-/CD90+ y el 96,90 % de CD34-/CD117-. En las células procedentes de cultivo de adipocitos se observó el 52,3 % de CD34-/CD45- (doblemente negativas), 12,31 % de CD34-/CD90+, 43,31 % de CD34-/CD117- y 64,68 % de CD34-/CD44+. Estos resultados sugieren que ambos cultivos se

diferenciaron a CMM. Las CMM procedentes de adipocitos mostraron el 64,68 % de células con expresión de la molécula de adhesión CD44 a la que se atribuyen propiedades funcionales como el asentamiento tisular.

Conclusiones: estos resultados preliminares permiten corroborar que ambos métodos experimentales de cultivo son efectivos para la obtención de CMM con fines terapéuticos.

Palabras clave: células madres mesenquimales humanas, caracterización fenotípica, medicina regenerativa.

ABSTRACT

Introduction: mesenchymal stem cells (MSCs) have phenotypic and functional characteristics which gives them a broad therapeutic potential for possible use in regenerative cell therapy, allogeneic transplant rejection and chronic inflammatory diseases.

Objective: to evaluate the expression of membrane expression to identify molecular patterns characteristic of human MSCs maintained in culture.

Methods: the phenotypic expression of mononuclear cells from bone marrow were obtained by bone marrow aspiration, separated by Ficoll and cultured *ex vivo* between passages or subcultures 3 and 16 and adipocytes cultured obtained from enzyme extraction of adipose tissue of healthy donor. Double staining was performed for molecules *CD34/CD45*, *CD34/CD90*, *CD34/CD117* and *CD34/CD44*.

Results: preliminary results showed that cultured mononuclear cells from bone marrow between passage 4 and 8 of culture expressed 45,13 % *CD34-/CD45-* cells (double-negative), corresponding to 25,24 % *CD34-/CD90+* cells and 96,90 % of *CD34-/CD117-*. Adipocytes from culture cells showed 52,3 % *CD34-/CD45-* (double-negative), 12,31 % cells *CD34-/CD90+*, 43,31 % *CD34-/CD117-* (double-negative). Our results suggest that both cultures were differentiated to MSCs. Adipocytes from MSCs showed 64,68 % of cells with expression of CD44 adhesion molecule conferring functional homing properties

Conclusions: these preliminary results corroborate that the experimental methods used in cultivation are effective for obtaining MSCs with therapeutic purposes.

Keywords: human mesenchymal stem cells, phenotypic characterization, regenerative medicine.

INTRODUCCIÓN

La adherencia y la capacidad multipotencial de las células mononucleares (CMN) de la médula ósea de diferenciarse y proliferar a células del tejido al que son trasplantadas, se encuentran directamente relacionadas con la expresión de determinadas moléculas en su membrana o fenotipo de diferenciación y con la interacción de las moléculas de adhesión con sus ligandos a nivel del tejido receptor. La caracterización de las células empleadas en la terapia celular es de gran importancia para el perfeccionamiento de este proceder terapéutico.¹

Las células madre mesenquimales (CMM) son clasificadas como células madre adultas ya que tienen la capacidad de diferenciarse a células neuronales, pulmonares, islotes de células beta pancreáticas, células epiteliales corneales y cardiomiocitos *ex vivo* e *in vivo*, por lo que pueden usarse para el tratamiento de numerosos tejidos dañados y desórdenes degenerativos.²⁻⁷ Las CMM residentes en la médula ósea son designadas también como células estromales y su progenie bien diferenciada localizada en los nichos perivascuales tienen la capacidad de regenerar estroma medular, osteocitos, condrocitos, adipocitos vasos sanguíneos y miocitos *in vivo* e *in vitro*, por lo que se le ha adjudicado a este tipo celular un amplio potencial en la práctica clínica.²⁻⁷

Las CMM poseen propiedades que permiten una obtención y manipulación favorables para su manejo en el laboratorio, como son los altos índices de proliferación en expansiones *ex vivo* y la capacidad de diferenciación a diferentes líneas celulares.⁴ Estas células pueden obtenerse a partir de la médula ósea y se identifican por sus marcadores específicos como CD29, CD44, CD71, CD90, CD13, CD105, SH-3 y STRO-1, así como también del tejido adiposo (células madre derivadas de tejido adiposo) mediante extracción enzimática con lo que se obtiene hasta 40 veces más CMM que de médula ósea.^{4,8} Aunque presentan características fenotípicas muy similares, las CMM derivadas del tejido adiposo expresan marcadores de adhesión específicos como son CD49d (VLA-4), CD106 (VCAM-1) e CD54 (ICAM-1) conocidas por su amplia participación en la interconectividad celular y la respuesta inflamatoria. Sin embargo, no se han descrito diferencias funcionales en la adherencia, crecimiento y diferenciación a otros tipos celulares entre ambas.⁸⁻¹¹

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, del inglés: *International Society of Cellular Therapy*) propuso tres criterios para definir las CMM: deben ser adherentes en cultivo; expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34 y CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos, bajo condiciones estándares de cultivo.^{10,12} Dos aspectos adicionales para clasificarlas como células madre son: 1) las CMM realizan procesos de autorrenovación y 2) son capaces de desarrollar "plasticidad clonogénica" o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo y endodermo.⁶

Se ha demostrado que las CMM humanas inducen inmunosupresión¹²⁻¹⁶ y pueden ser utilizadas como matriz para la expansión de poblaciones enriquecidas de células CD34+ por su potencial terapéutico en la enfermedad de injerto contra huésped.^{17,18} También se les atribuyen potencialidades terapéuticas para las enfermedades autoinmunes, el rechazo de trasplante de órganos y el control de procesos inflamatorios.

Tres mecanismos fundamentales contribuyen al efecto supresor sobre la reacción alogénica:¹²⁻¹⁴ 1) son hipoinmunogénicas, pues no expresan antígenos de clase II y otras moléculas coestimuladoras; 2) previenen la respuesta de las células T indirectamente a través de la modulación de las células dendríticas, durante su maduración pueden inhibir la expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígenos como CD1a, CD40, CD80, CD86 y HLA-DR¹⁹ y actúan directamente inhibiendo la función de las células asesinas naturales (inhibiendo la proliferación y producción de IFN) y las células T CD4+ e inducen un fenotipo regulador CD4+/CD25 alto, CD4+/CTLA-4+, CD4+/CD25+/CTLA-4+;²⁰ y 3) inducen un microambiente supresor local a través de la producción de prostaglandinas e interleucina-10.¹³ Esta acción inmunorreguladora es comparable con la referida en la tolerancia materno-fetal y similar a la descrita en los mecanismos de evasión o escape del tumor a la respuesta inmunológica norma.⁹

Por su importancia para la introducción en la práctica clínica, se evaluó la expresión fenotípica de moléculas de membrana que permitieran identificar y confirmar la expresión de patrones moleculares característicos de CMM humanas en células procedentes de CMN de médula ósea y de tejido adiposo mantenidas en cultivo, en ambos casos a partir de donantes sanos, obtenidas por primera vez en Cuba.

MÉTODOS

Características de la muestra

CMM procedentes de cultivo *ex vivo* de CMN humanas de médula ósea obtenidas mediante aspiración medular y CMM procedente de tejido adiposo de un donante adulto sano para cada caso, respectivamente.

Métodos de obtención celular

Las CMN de médula ósea procedentes de extracción medular mediante biopsia se aislaron por el método manual de Boyüm modificado.¹ Se cultivaron en medio α MEM (del inglés, *minimal essential medium á modificación*, Sigma Aldrich) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 2 mM de L-glutamina (Sigma) a 37 °C y atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %, con cambios de medio de cultivo cada 3 días. Cuando las células cubrieron completamente la superficie de cultivo (confluencia del cultivo), se desprendieron mediante tratamiento enzimático con tripsina (Sigma Aldrich) al 0,25 % y nuevamente se cultivaron, lo que constituyó el pase o subcultivo inicial. Para los estudios propuestos, las células se procesaron de esta forma hasta 16 subcultivos y los tiempos de cultivo entre cada subcultivo oscilaron entre 2 y 17 días en dependencia de la confluencia celular.

El tejido adiposo fue obtenido de una donante sana de 24 años sometida a abdominoplastia estética bajo anestesia general, luego de suscribir su consentimiento informado. La separación de adipocitos se realizó mediante el método descrito por Bunnell y col. con algunas modificaciones.²¹ Se extrajeron 50 mL de tejido que fueron lavados con una solución buffer fosfato salino (PBS pH 7.2) y finamente cortado hasta obtener fragmentos de aproximadamente 2 mm. Para llevar a cabo la digestión enzimática se resuspendió el tejido en igual volumen de PBS que contenía 0,25 % de colagenasa III (Sigma Aldrich); se incubó la mezcla durante 1 h a 37 °C y posteriormente se filtró la solución mediante una membrana de nylon de 100 μ m (Falcon) y se centrifugó a 1 200 g durante 10 min para obtener el botón celular. El sobrenadante se descartó y al botón se le realizaron dos lavados en PBS con penicilina estreptomocina al 1 %, ambos seguidos de centrifugaciones a 1 200 g durante 10 min. El botón obtenido se sembró en frascos de cultivo a una densidad de 2×10^4 cm², con medio de proliferación formado por DMEM suplementado con 20 % de SFB (Gibco) y 1 % de solución de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomocina). Se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ durante 24 h; después se realizó el primer cambio de medio para eliminar los eritrocitos residuales. Posteriormente, el medio fue cambiado cada 3 días hasta alcanzar una confluencia de más del 70 % del cual se obtuvo la muestra para su caracterización inmunológica.

Citometría de flujo

La caracterización de las CMM se realizó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos para diferentes moléculas específicas de la membrana celular mediante doble marcaje: CD34/CD45, CD34/CD90, CD34/CD117, y CD34/CD44.

Se tomaron 100 µL de cada suspensión celular con una concentración de 1×10^6 células/mL y se incubaron con 10 µL de cada AcMo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) (DAKO) durante 30 min a 4 °C, al mismo tiempo que se realizaba el doble marcaje. Las células se lavaron dos veces con solución balanceada de fosfato (PBS pH 7.2) y se centrifugaron a 1 500 rpm; el botón celular obtenido se resuspendió en 500 µL del mismo PBS y la lectura se realizó en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter) mediante la obtención de 50 000 células en cada caso.

RESULTADOS

Las CMM cultivadas procedentes de médula ósea en el subcultivo 4, expresaron: 59,19 % de células CD34-/CD45- (doblemente negativas para estos marcadores de membrana), con 30,26 % de células CD34- que expresan la molécula CD90+(CD34-/CD90+) y hasta el 91,83 % de células CD34-/CD117- (doblemente negativas para ambas moléculas) y en el subcultivo 8 expresaron 45,13 % de células CD34-/CD45- (doblemente negativas para estos marcadores de membrana), el 21,24 % de células CD34- que expresan la molécula CD90+(CD34-/CD90+) y el 96,90 % de células CD34-/CD117- (doblemente negativas para ambas moléculas) (tabla 1 y figura).

Tabla 1. Expresión de moléculas de membrana en células madre mesenquimales (CMM) procedentes de cultivo de médula ósea

Marcaje con anticuerpos monoclonales	CMM cultivadas Porcentajes de expresión (%) de moléculas de membrana				CMN de médula ósea (%)*
	Pase 3	Pase 4	Pase 8	Pase 16	
CD34PE-/CD45FITC-	33,06	59,19	45,13	44,16	20,79
CD34PE-/CD90FITC+	17,74	30,26	21,24	0,44	1,49
CD34FITC- / CD117PE-	53,99	91,83	96,90	75,51	11,23

CMN: células mononucleares; FITC: fluorocromo isotiocianato de fluoresceína; PE: fluorocromo ficoeritrina; * Porcentaje de expresión de estas moléculas en CMN de médula ósea antes del cultivo.

En las células procedentes de cultivo de adipocitos se observó el 52,3 % de células CD34-/CD45-(doblemente negativas para ambas moléculas), el 12,31 % de células CD34-, que expresaron la molécula de membrana CD90+, hasta el 43,31 % de CD34-/CD117- (doblemente negativas) y una frecuencia de expresión del 64,68 % de células que no expresaban CD34 y expresaron en su membrana la molécula CD44 (CD34-/CD44+) (tabla 2).

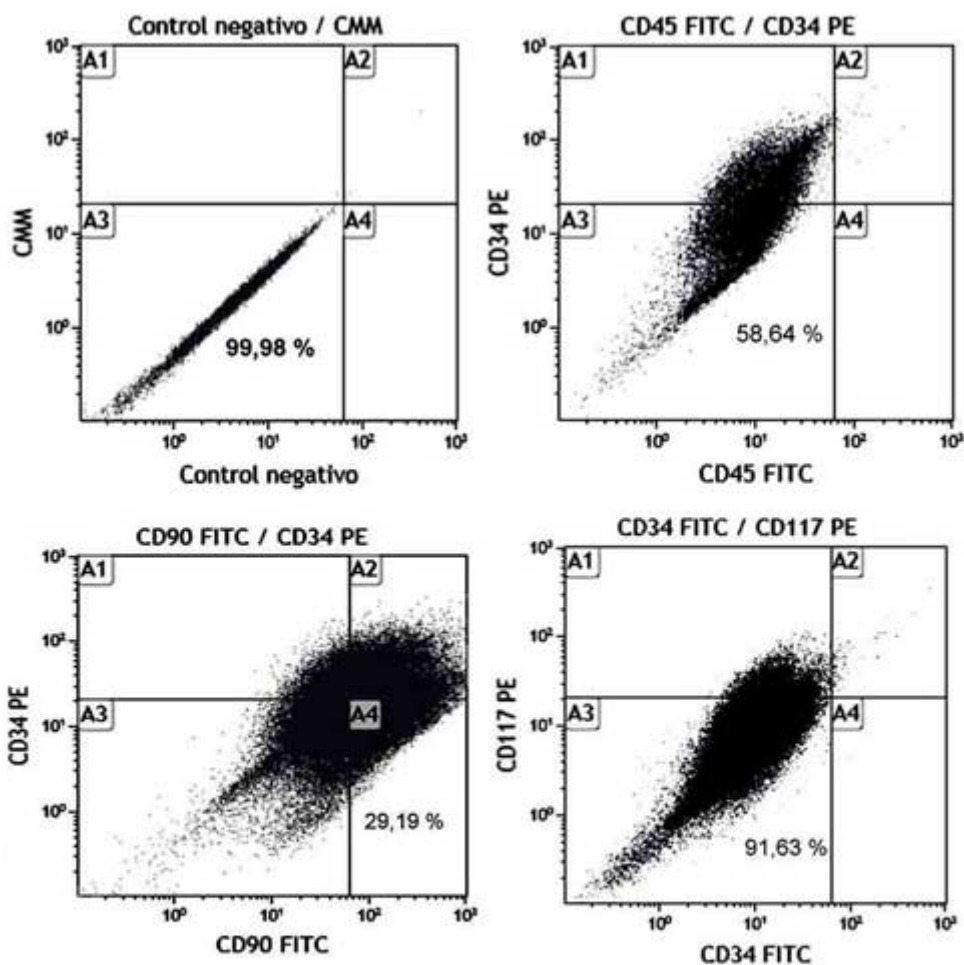


Fig. Expresión de moléculas de membrana en células madre mesenquimales procedentes de cultivo de médula ósea en el subcultivo 4. Se observa el 58,64 % de células CD34-/CD45- (doblemente negativas para estos marcadores de membrana), con el 29,19 % de células CD34- que expresan la molécula CD90+ (CD34-/CD90+) y hasta el 91,63% de células CD34-/CD117- (doblemente negativas para ambas moléculas).

Tabla 2. Expresión de moléculas de membrana en células madre mesenquimales (CMM) procedentes de cultivo de tejido adiposo.

Marcaje con anticuerpos monoclonales	CMM DE ADIPOCITOS Porcentajes de expresión (%) de moléculas de membrana
CD34PE-/CD45FITC-	52,3
CD34PE-/CD90FITC+	12,31
CD34FITC-/CD117PE-	43,31
CD34FITC-/CD44PE+	64,68

FITC: fluorocromoistocionato de fluoresceína; PE: fluorocromoficoeritrina

DISCUSIÓN

Las CMM procedentes de médula ósea mostraron que en los pases 4 y 8 existe una adecuada expresión del patrón de moléculas de membrana específicas de este tipo celular, lo que corresponde con el fenotipo descrito por otros autores.^{7, 21-26}

En el pase 16 se observó el aumento del porcentaje de células que expresan las moléculas CD45/CD34, lo que sugiere la diferenciación espontánea a células neuronales según lo descrito por otros autores.^{27,28} Estos resultados corresponden con una diferenciación espontánea a célula madre neural en estudios inmuno histoquímicos mediante la presencia de nestina y beta tubulina +++.^{1*} Las CMM procedentes de la expansión del cultivo celular hasta el pase o subcultivo 8 constituyen un potencial terapéutico para la terapia celular regenerativa de diferentes enfermedades crónicas, enfermedades inflamatorias y el trasplante alogénico. Sin embargo, las CMM obtenidas a partir del pase 16 sugieren una diferenciación neural espontánea que de ser comprobado, permitirían su uso en el tratamiento de enfermedades degenerativas y lesiones del sistema nervioso.

Las CMM procedentes de adipocitos mostraron un patrón de expresión de marcadores celulares específicos consistentes con este tipo celular y una frecuencia de expresión del 64,68 % de la molécula de adhesión CD44 (molécula de adhesión que se expresa en las CMM), lo que contribuye al asentamiento de estas en diferentes tejidos y su diferenciación celular especializada.

Estos resultados permiten corroborar de manera preliminar, que los métodos experimentales de cultivo utilizados en ambos casos son efectivos para la obtención y desarrollo de un banco de CMM con fines terapéuticos.

En la actualidad, es de gran interés ampliar la posible aplicación de la terapia celular como alternativa terapéutica de enfermedades crónicas no transmisibles y asociadas al trasplante y sus complicaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Macías Abraham C, del Valle Pérez LO, Baganet Cobas A, Dorticós Balea E, Jaime Fagundo JC, Lam Díaz RM, et al. Caracterización fenotípica de las células madres de médula ósea utilizadas en la terapia celular regenerativa. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2011;27(2):233-43.
2. Hernández Ramírez P. Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [revista en Internet]. 2009 [Acceso: 14 de enero de 2013];25(1): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892009000100002&lng=es
3. Dahlgren LA. Review of treatment options for equine tendon and ligament injuries: what's new and how do they work? En: 51st Annual Convention American Association Equine Practitioners. Seattle, Washington, USA. 2005. Dic. 3-7.

4. Strem B, Hicok K, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber R, et al. Multipotential Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem. *Keio J Med* 2005;54:132-41.
5. Zuk P, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279-95.
6. 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.
7. Macías Abraham C, del Valle Pérez LO, Hernández Ramírez P, Ballester Santovenia JM. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2010;26(4):256-75.
8. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003;89(2-3):267-70.
9. Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation *in vitro*. Expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;174:249-82.
10. Lakshmi pathy U, Verfaillie C. Stem Cell Plasticity. *Blood Rev* 2005;19:29-38.
11. Rodríguez V. Células Madre: Conceptos Generales y Perspectivas de Investigación. *Universitas Scientiarum* 2005;10:5-14.
12. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm* 2005;2:8.
13. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 2007;149:353-63.
14. Tse WT, Pendleton D, Beyer W, D`Andrea A, Guinan EC. Bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) suppress T-cell activation without inducing anergy. *Cytotherapy* 2001;3:417a.
15. Holyoake TL, Alcorn MJ, Richmond L, Farrell E, Pearson C, Green R, et al. CD34 positive PBPC expanded *ex vivo* may not provide durable engraftment following myeloablative chemoradiotherapy regimens. *BM Transplant* 1997;19:1095-101.
16. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogenic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplant* 2003;75:389-97.
17. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11-20.
18. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-22.
19. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004;13:263-71.

20. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005;90:516-25.
21. Bunnell BA, Flaas M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008 Jun;45(2):115-20. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
22. D' Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (Miami) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiated potential. *J Cell Science* 2004;117:2971-81.
23. 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.
24. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615-25.
25. Clarke E, Wognum AW, Marciniak R, Eaves AC. Mesenchymal cell precursors from human bone marrow have a phenotype that is distinct from cultured mesenchymal cells and are exclusively present in a small subset of CD45^{low}, SH2⁺ cells. *Blood* 2001;98:355a.
26. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredety DM, et al. Isolation and Characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitors cell. *Arthritis and Rheumatism* 2002;46:3349-60.
27. Foudah D, Redondo J, Caldara C, Carini F, Tredici G, Miloso M. Expression of Neural Markers by Undifferentiated Rat Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol*. Published on Line 2012 Oct. doi: 10.1155/2012/820821.
28. Foudah D, Redondo J, Caldara C, Carini F, Tredici G, Miloso M. Human mesenchymal stem cells express neuronal markers after osteogenic and adipogenic differentiation. *Cell Biol Mol Lett* 2013;Jun;8(2):163-66.

Recibido: 22 de julio de 2013.

Aceptado: 19 de octubre de 2013.

Dra. CM. *Consuelo Macías Abraham*. Instituto de Hematología e Inmunología.
Apartado 8070, La Habana, CP 10800, Cuba.
Tel (537) 643 8695, 8268. Fax (537) 644 2334. Email: rchematologia@infomed.sld.cu