

**ANALISIS DE LA EXPRESION DE MARCADORES DE INMUNOFENOTIPO DE
CELULAS MADRE MESEQUIMALES**

ANGÉLICA ROA LARA

COD. 200113686

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA MECÁNICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
BOGOTÁ, CUNDINAMARCA
2007**

**ANALISIS DE LA EXPRESION DE MARCADORES DE INMUNOFENOTIPO DE
CELULAS MADRE MESEQUIMALES**

**ANGÉLICA ROA LARA
COD. 200113686**

Tesis para optar al título de Magíster en Ciencias Biomédicas

**Director
SANDRA RAMÍREZ CLAVIJO
Licenciada en Biología, M.Sc, PhD**

**Asesor
JUAN CARLOS BRICEÑO
Ingeniero Mecánico, M.Sc, PhD**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA MECÁNICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
BOGOTÁ, CUNDINAMARCA
2007**

Nota de Aceptación:

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Bogotá, 21 de Agosto de 2007

A Dios por dame toda la felicidad

A Nelson y Santiago por ser mi motor y mi razón

A mis padres y mi hermana por ser mis amigos y confidentes

A mi familia adoptiva: mis suegros y cuñados por estar siempre dispuestos a ayudar

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

Nelson, por dame su inmenso amor, su amistad, su confianza y su dedicación.

Mi familia, porque con su amor, sus enseñanzas, su apoyo y sus cuidados me dieron la confianza necesaria para sacar adelante todos mis proyectos incluyendo mi familia y mis estudios.

Familia Bayona Gutiérrez por adoptarme como a una hija y por dedicar su amor y su tiempo al cuidado de Santiago.

Sandra Ramírez, por permitirme hacer parte de su equipo, guiándome y enseñándome con paciencia, por transmitirme sus conocimientos no solo a nivel académico sino a nivel personal y por ser una inspiración para salir adelante con dedicación y entereza.

Juan Carlos Briceño, por brindarme su apoyo, su respaldo y estar dispuesto a prestarme su ayuda y colaboración siempre que lo necesité.

Claudia Mera por ser mi amiga y confidente y brindarme su ayuda incondicional, mostrándome una manera diferente de ver la vida y enfrentarla con responsabilidad.

Olga Lucía Rojas por su inmensa colaboración durante el desarrollo de este proyecto aportando sus amplios conocimientos a nivel de citometría que hicieron posible la obtención, análisis e interpretación de los resultados de este trabajo.

Gamal Zayed, por su colaboración en la toma de muestras y estar siempre dispuesto a prestar su ayuda cuando fue necesario.

Grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Celular y Molecular por acogerme y apoyarme con su ayuda y sus conocimientos,

CONTENIDO

	pag
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. CÉLULAS MADRE	10
1.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	11
1.2.1. Definición.....	11
1.2.2. Nicho y fuentes de obtención.....	12
1.2.3. Características en cultivo.....	13
1.2.4. Marcadores de superficie.....	16
1.2.5. Potencial de diferenciación.....	19
1.3. CAPACIDAD PROLIFERATIVA.....	22
1.3.1. Proliferación y senescencia.....	22
1.3.2. Telómeros y telomerasa.....	23
1.3.3. Telomerasa en Células Madre Mesenquimales.....	25
1.4. CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS.....	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. GENERAL.....	31
3.2. ESPECÍFICOS.....	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1. TIPO DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE SELECCIÓN DE DONANTES VOLUNTARIOS.....	32
4.1.1. Variables de estudio.....	32
4.2. SEPARACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES APARTIR DE ASPIRADOS DE MÉDULA ÓSEA	33
4.3. CONDICIONES DE CULTIVO <i>EX VIVO</i> DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	35
4.4. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE GENERACIÓN CELULAR, CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	37
4.4.1. Ensayo de MTT reductasa.....	37

4.4.2. Ensayo de exclusión azul de Tripán.....	38
4.5. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE COLONIAS MEDIANTE EL ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS FIBROBLASTOIDES (UFC-F).....	39
4.6. EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	40
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	43
5.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	44
5.3. ENSAYO DE UFC-F.....	48
5.4. DETERMINACIÓN DE TASAS DE GENERACIÓN CELULAR Y CURVAS DE CRECIMIENTO.....	50
5.5. DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	56
6. DISCUSIÓN.....	61
7. CONCLUSIONES.....	72
8. RECOMENDACIONES.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	83

LISTA DE FIGURAS

	pag
Figura 1 Curva de crecimiento celular de CMMs	16
Figura 2 Modelos de diferenciación de las CMMs.....	21
Figura. 3 Horquilla-T.....	24
Figura 4 Replicación de los extremos de los cromosomas.....	26
Figura 5 Selección negativa mediante formación de inmuno-rosetas usando RosetteSep™	36
Figura 6 Características morfológicas en los primeros días de cultivo.....	46
Figura 7 Características morfológicas entre el pase 0 y 4.....	47
Figura 8 Diferentes morfologías celulares.....	48
Figura 9 Ensayo de UFC-F.....	50
Figura 10 Resultados de ensayos con MTT.....	52
Figura 11 Curvas de crecimiento en pase 0 y pase 1.....	53
Figura 12 Análisis de las TGC con respecto a la edad de los donantes y a la densidad inicial del cultivo.....	55
Figura 13 Expresión de antígenos de superficie de las CMMs, cultivo primario de fibroblastos y de la línea celular A375.....	57
Figura 14 Cinética de expresión de los marcadores de superficie en CMMs.....	58
Figura 15 Cinética de la Intensidad Media de fluorescencia.....	59
Figura 16 Co-expresión de antígenos de superficie.....	60
Figura 17 Separación de CMMs de un paciente mayor.....	62

LISTA DE TABLAS

	pag
Tabla 1 Distribución de tubos para ensayos de citometría de flujo.....	41
Tabla 2. Información general de los cultivos.....	44
Tabla 3 Tasas de generación celular en las muestras que alcanzaron el pase 2.....	54
Tabla 4 Comparación de TGC en CMMs con diferentes condiciones de cultivo.....	67

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÉLULAS MADRE

Célula madre es el término dado a las células con un potencial muy amplio de diferenciación, que mantienen la capacidad de auto-renovarse indefinidamente. Las células madre o células troncales se clasifican de acuerdo al potencial de diferenciación y de acuerdo a la fuente de obtención. Dependiendo de su capacidad de diferenciación pueden ser totipotentes, pluripotentes o multipotentes. La célula totipotente corresponde al huevo fertilizado, que tiene la habilidad de dar origen a un organismo completo y a tejido extraembrionario. Las células madre pluripotentes pueden producir cualquier tipo de célula derivada de alguna de las tres capas embrionarias de diferentes linajes más no un organismo completo. Y las células madre multipotentes son capaces de dar origen a todos los tipos de células dentro de un linaje específico común derivada de una sola capa embrionaria. Entre las células madre multipotentes se encuentran las células madre neuronales, hematopoyéticas y mesenquimales. Las células madre neuronales son la fuente de todos los tipos de neuronas del sistema nervioso central y periférico, y aparecen durante la formación de la placa neural, precursora en el desarrollo del tubo neural. Estas células tienen la habilidad de generar los tres linajes principales del sistema nervioso: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Baizabal JM et al., 2003).

Según la fuente de obtención, las células madre pueden ser embrionarias o derivadas de tejidos adultos. Las células madre embrionarias son también células pluripotentes obtenidas a partir de la masa interna de células del embrión temprano en la etapa de blastocisto, antes de que ocurra la gastrulación, en humanos aproximadamente al decimocuarto (14) día después de la fecundación. Estas células son capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula somática

encontrada en un organismo adulto (Draper JS et al., 2003). Sus tres principales características son: (i) derivarse del embrión pre-implantación, (ii) ser capaces de proliferar *in vitro* de manera indefinida sin diferenciarse, y (iii) tener un potencial de desarrollo estable para formar las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) después de cultivarlas por tiempo prolongado (Thomson JA et al., 1998).

Dentro de la médula ósea se encuentran dos poblaciones de células madre adultas: las Células Madre Hematopoyéticas (CMHs) y las Células Madre Mesenquimales (CMMs). Las CMHs son aquellas que dan origen a todos los linajes de células encontrados en la sangre: linfocitos, eritrocitos, plaquetas, macrófagos, monocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos (Szilvassy et al., 2003). Las CMMs, también llamadas células del estroma de la médula ósea (MO) tienen la capacidad de diferenciarse en los linajes encontrados en el estroma de la médula, es decir, los elementos no-hematopoyéticos del tejido conectivo: osteoblastos, adipositos, condrocitos y fibroblastos. (Short B et al., 2003).

1.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

1.2.1. Definición

Las CMMs fueron descritas originalmente por Fridenstein et al., como células fibroblásticas adherentes al plástico, aisladas por gradiente de densidad con Percoll y reactivas a los anticuerpos monoclonales SH2 y SH3 (Fridenstein A et al., 1970), luego de demostrar en 1961 que la MO contiene progenitores estromales capaces de dar origen a células de linaje osteogénico (Fridenstein A et al., 1961). Desde entonces, estas células progenitoras derivadas de MO han sido designadas con diferentes nombres que incluyen Unidades Formadoras de

Colonia de Fibroblastos (UFC-F), células estromales de médula, células progenitoras mesenquimales y CMMs, entre otros (Minguell J., et al., 2001; Sethe S et al., 2006; Young H et al., 2004).

Una definición más reciente de CMMs las describe como células estromales con morfología fibroblástica, clonales, adherentes al plástico y capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo la influencia de estímulos adecuados (Gregory C et al., 2005)

Aunque no existen diferencias en cuanto a funcionalidad entre la variedad de nombres utilizados para designar este tipo de células, el término células estromales de médula ha sido utilizado para referirse a las células empleadas como monocapa alimentadora para mantener los cultivos a largo plazo de CMHs o cultivos tipo Dexter (Minguell J et al., 2001;). A partir de estos cultivos, se obtienen las células adherentes de muestras de médula total puestas en cultivo, y sobre éstas se cultivan las CMHs, sirviendo entonces las células estromales para producir el microambiente que favorece el crecimiento y diferenciación en granulocitos y eritrocitos de las CMHs (Prockop D 1997; Gartner S et al., 1980.)

1.2.2. Nicho y fuentes de obtención

Las CMMs se encuentran principalmente en la MO a una frecuencia muy baja, en humanos oscilan entre 1-20 CMMs por 10^5 células mononucleares (Short B et al., 2003; Gronthos y Simmons, 1996). Dentro de la MO existen diferentes microambientes o nichos que facilitan y mantienen en crecimiento las CMHs al proveer de múltiples factores y señales para el mantenimiento tanto de la viabilidad, como de la producción de células maduras en el número requerido y durante el tiempo de vida del organismo (Baksh D et al., 2004). El tejido conectivo

de soporte asociado a un tejido funcional dominante en un órgano se llama estroma, en la MO el estroma corresponde a los elementos no-hematopoyéticos del tejido conectivo que sirven de microambiente, producen moléculas que regulan el crecimiento y que además promueven las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC) (Short B et al., 2003). Entre los componentes celulares de la MO se encuentran las células endoteliales, los fibroblastos, las CMHs y su progenie, las células reticulares, los adipocitos, las células osteogénicas cerca de las superficies óseas, las células vascular-endoteliales y células de músculo liso en las paredes de los vasos (Baksh D et al., 2004; Short B et al., 2003).

A pesar de ser la MO la fuente más aceptada para la obtención de CMMs, también han sido aisladas de otros tejidos como hueso trabecular, tejido adiposo, tejido sinovial, células perivasculares de cordón umbilical de la gelatina de Wharton, músculo esquelético, dientes y sangre periférica (Baksh D et al., 2004; Roufosse CA et al., 2004). Las células aisladas de tejidos diferentes a la MO pueden variar en cuanto a su potencial multilinaje, y puede obtenerse una mezcla de células bipotentes o tripotentes. Es por ello que surge la duda de si las CMMs están naturalmente presentes en tejidos diferentes a la MO, o si ésta es la principal fuente de células multipotentes capaces de participar en la reparación y regeneración de tejidos de origen mesenquimal en respuesta a estímulos apropiados en el organismo adulto (Roufosse CA et al., 2004).

1.2.3. Características en cultivo

Los protocolos usados para aislar CMMs de diferentes especies varían, se pueden separar por gradiente de densidad y tamaño, con percoll o mezclas de Ficoll-hipaque obteniéndose una capa de células mononucleares (Wognum AW et al., 2003; Gregory et al., 2005), entre las que se encuentran las CMMs. Este método facilita la remoción de células maduras más densas como los glóbulos rojos y los

granulocitos. Otros métodos de separación negativa o positiva, por gradiente de densidad usan anticuerpos acoplados a esferas magnéticas que reconocen antígenos de superficie. Por la alta especificidad, se han generado métodos que usan anticuerpos monodonaes en combinaciones particulares para separar y caracterizar subgrupos celulares. También existen métodos para purificar las células o enriquecer las soluciones celulares, llamados de selección positiva, los cuales se basan en el uso de anticuerpos que reconocen de manera específica marcadores de superficie presentes en las células que se desean aislar. Así por ejemplo, en algunos casos las CMMs, posterior a la separación con ficoll son purificadas con base en la detección de marcadores de superficie de CMMs primitivas como el antígeno STRO-1 (Gronthos S et al., 1994). En los métodos de separación negativa se usan anticuerpos dirigidos contra antígenos expresados en células diferentes a las CMMs con el fin de eliminar células no deseadas como es el caso del kit de rosetas RosetteSep (Stem Cell Technologies), el cual se adhiere a los eritrocitos y facilita la precipitación y eliminación de los mismos.

La expansión *in vitro* de las CMMs, se ha evaluado empleando diferentes medios de cultivo, entre ellos Medio Mínimo Esencial de Eagle- α (α -MEM del inglés α -Minimum Essential Medium) (Gronthos S et al., 1994; Conget P et al 1999) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco bajo en glucosa (DMEM-LG del inglés Dulbeccos Modified Eagle Medium – Low glucose) (Shim W et al., 2004) suplementados con 10-20% de Suero Fetal Bovino (SFB). También se han utilizado combinaciones de medios como DMEM-LG y MCDB-201 con factores de crecimiento como factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor transformante de crecimiento β (TGF- β), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), proteína morfogénica de hueso (BMP), factor estimulante de crecimiento granulocito-macrófago (GM-CSF) y factor de crecimiento de célula madre (SCF), entre otros (Reyes M et al., 2005).

Después de la separación, las células mononucleares son cultivadas y las células hematopoyéticas no-adherentes son eliminadas con el cambio de medio que se realiza 24 horas después de la siembra inicial, mientras que las CMMs, debido a su naturaleza, se adhieren al plástico de cultivo y se observan con morfología fibroblástica (Gregory et al., 2005). De acuerdo a variaciones observadas en su morfología, se han descrito tres tipos de CMMs: i) células fibroblásticas elongadas, ii) células delgadas estrelladas y iii); células aplanadas. Las dos primeras son encontradas con mayor frecuencia, proliferan más activamente y son más dadas a formar colonias; mientras que las células aplanadas son células con una menor tasa de proliferación y que reemplazan a las células alargadas a medida que el cultivo permanece en el tiempo (Muraglia A et al., 2000; Liu Y et al., 2003)

En general, luego de la siembra a partir de muestras de MO, las CMMs pasan por una fase inicial lag o de latencia, durante la cual las células se adaptan al medio y a las condiciones de cultivo y no hay proliferación celular. Posteriormente entran a la fase logarítmica o exponencial en donde empiezan a dividirse activamente con un tiempo de doblaje poblacional que varía de 12 a 72 horas dependiendo de la densidad de siembra (Gang E et al., 2007; Gregory et al., 2005; Shim W et al., 2004; Suva D et al., 2004; Conget et al., 1999). Posteriormente, con el crecimiento celular las CMMs entran en una fase estacionaria en donde la tasa de proliferación disminuye, pasando de una morfología alargada y ahusada, a un fenotipo más aplanado. Estas células no presentan cambios significativos en su patrón de expresión génica ni en los marcadores inmnofenotípicos que las caracterizan con un fenotipo indiferenciado durante la expansión en cultivo a largo plazo (hasta 10 pases), aunque si hay una pérdida progresiva de su capacidad proliferativa (Kulterer B et al., 2007) **(Figura 1)**

Figura 1 Curva de crecimiento celular de CMMs

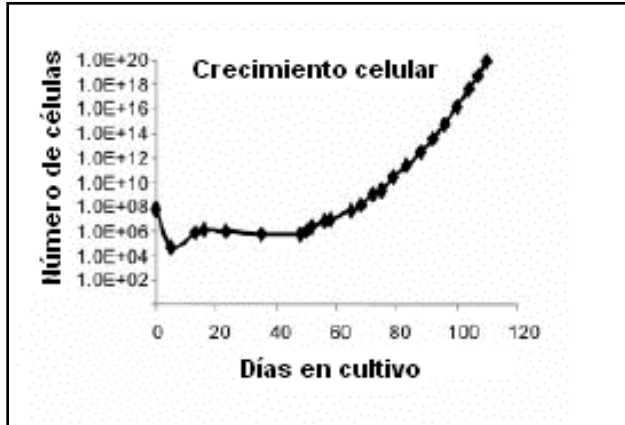


Fig 1: Curva de crecimiento de CMMs seleccionadas con base en la expresión del antígeno de superficie SSEA-4. Modificado de Gang E et al., 2007.

1.2.4. Marcadores de superficie

Técnicas como la citometría de flujo y la separación magnética, permiten caracterizar a una población celular de interés según la expresión típica de algunas moléculas de superficie. A pesar de los grandes avances en la inmunofenotipificación de las CMMs, aún no hay consenso acerca de la elección de un marcador específico de superficie que las identifique, como sí ocurre en el caso de las CMHs cuyo marcador característico es CD34. Es por esto que algunos autores sugieren el uso de una combinación de marcadores para seleccionar e identificar CMMs por citometría de flujo o mediante el uso de perlas magnéticas. Entre la gran variedad de marcadores descritos se encuentran CD13, CD44, CD105, CD90, SSEA-4, STRO-1, SH2, SH3 y CD29 (Baksh D et al., 2004; Gronthos S et al., 2003; Gang E et al., 2007)

- CD13 (Proteasa aminopeptidasa-N): este antígeno de superficie de células mieloides es una glicoproteína de 150 kD, codificada por un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 15 en q25-26. En su extremo carboxi-terminal contiene un dominio con un motivo pentapéptido, propio de los miembros

de la superfamilia de metaloproteasas de unión a zinc. En el extremo amino-terminal posee un segmento hidrofóbico intracelular que actúa ya sea como señal para la inserción a la membrana o como segmento estable que la atraviesa (Dixon J et al., 1994). Este marcador es expresado por fibroblastos, osteoclastos, macrófagos, células de estroma, células de músculo liso, células epiteliales, células endoteliales y líneas celulares mieloides, pero no por linfocitos T o B (Dixon J et al., 1994). Aunque su función está relacionada con el tejido en el cual se expresa, esta glicoproteína es un receptor para coronavirus humano y es importante para el ingreso del HIV a la célula, así mismo está involucrada en la degradación de la Matriz Extracelular (MEC) durante la invasión tumoral (Tani K. et al., 2000)

- CD44 (H-CAM): molécula de adhesión que actúa como receptor principal del ácido hialurónico, un glicosaminoglicano abundante en MEC importante para establecer las interacciones celulares entre los linfocitos y el endotelio, durante procesos biológicos como la inflamación, reparación de heridas, remodelamiento del tejido, migración e invasión celular, por lo cual, además de ser un marcador antigénico de diferenciación durante la linfopoyesis, es indicador de malignidad y metástasis (Nakamura H et al., 2004; Ponta H et al., 2003).
- CD105 (Endoglina, SH2): Glicoproteína de membrana celular homodimérica, compuesta de subunidades unidas por puentes disulfuro. Actúa como proteína accesoria, interactuando con receptores de unión a ligando de múltiples miembros de la superfamilia del Factor Transformante de Crecimiento- β TGF- β (Barbara N et al., 1999). Esta proteína es crítica para el adecuado desarrollo de los vasos sanguíneos y las mutaciones en

su gen causan telangiectasia hemorrágica tipo I. En tejidos normales, CD105 se expresa débilmente sobre precursores eritroides, células estromales, células B fetales tempranas y monocitos activados, y es fuertemente expresada sobre sincitiotrofoblastos de placenta a término y células vasculares endoteliales (Fonsatti E et al., 2000).

- CD90 (Thy-1): proteína de membrana anclada a Glicosilfosfatidilinositol con peso molecular aproximado de 35kDa. Su expresión está restringida a células neuronales, una subpoblación de CMHs CD34+, fibroblastos y células endoteliales activadas (Wetzel A et al., 2004). Además, es usada como marcador para timocitos y linfocitos T periféricos (Colter D et al., 2000).
- SSEA-4: es un glicoesfingolípido sintetizado por la acción secuencial de glicosiltransferasas. Se inicia con la glicosilación de la ceramida, que da origen a la lactosilceramida, esta a su vez produce tres series principales de glicolípidos: series lacto o neolacto por la adición de β 1,3-N-acetilglucosamina, series globo por la adición de α 1,4-galactosa, y series ganglio por la adición de α 2,3-ácido siálico. Los glicolípidos de series globo están presentes en muchos tejidos humanos y de otros mamíferos (Fujii Y et al., 2005). El antígeno SSEA-4 se caracteriza porque se superpone a epítopes de carbohidrato sobre glicolípidos de series globo. Su expresión se restringe a embriones pre-implantación debido a que el cambio de series globo a síntesis de series lacto (identificadas por SSEA-1) ocurre a medida que el blastocisto avanza en su desarrollo (Gang E et al., 2007).

Aunque la función de estos antígenos carbohidratos aún se desconoce, es curioso que además de las Células Madre Embrionarias humanas

pluripotentes y células embrionarias, SSEA-4 también esté presente sobre la superficie de CMMs multipotentes. Aunque la evidencia que asocia estos marcadores con el estado de “stemness” es correlativa, sugiere que está involucrado en vías metabólicas especializadas entre CME humanas pluripotentes y CMMs multipotentes (Gang E et al., 2007).

- STRO-1: este es un antígeno de superficie que le confiere a la célula resistencia a la tripsina y se expresa sobre una subpoblación de células óseas y de médula, además sirve de indicador de la capacidad de diferenciación osteogénica de una célula (Stewart K et al., 1999). Aunque se ha reportado la expresión de este marcador en células obtenidas de estroma de MO y algunos investigadores lo usan como método de selección de CMMs (Stewart K et al., 1999; Gronthos S et al., 1994; Simmons P et al., 1991), también hay estudios que reportan que no todas las poblaciones de células estromales de médula ósea expresan este antígeno (Eipers P et al., 2000).

Las CMS expresan en su superficie de forma variable CD13, CD44, CD105, CD90, STRO1, SSEA4, SH3 y SH2, mientras que no expresan moléculas como CD45 y CD34. Gracias a este conocimiento y al diseño de anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos, se pudo definir el inmunofenotipo de una CMM mediante citometría de flujo como una célula CD13+, CD90+, CD105+, CD44+, Stro1+, SSEA4+, CD45- y CD34-.

1.2.5. Potencial de diferenciación

Las CMMs son heterogéneas en cuanto a su potencial de diferenciación. Esto ha sido demostrado ampliamente tanto *in vitro* como *in vivo* y puede ser explicado

debido a que el pool de CMMs contiene no sólo “Células Madre Mesenquimales” puras sino también subpoblaciones en diferentes estados de diferenciación (Baksh D et al., 2004). Este modelo plantea que en las CMMs de la médula ósea pueden encontrarse varias subpoblaciones que son clasificadas recientemente por algunos autores según el tamaño y granularidad de las mismas mediante citometría de flujo: una población primitiva de células madre multipotentes con una amplia capacidad de auto-renovación, que pueden formar todos los tejidos conectivos diferenciados; pero también se encuentran CMMs con diferente potencial multilinaje: cuadra-, tri-, bi- y uni-potenciales. Estas últimas tienen una capacidad de auto-renovación limitada y dan origen a células terminalmente diferenciadas pertenecientes a tipos celulares específicos. Eventualmente, las células más primitivas son eliminadas del pool de CMMs durante el cultivo a largo plazo, por su baja frecuencia con respecto a los fenotipos de CMMs más diferenciados (Baksh D et al., 2004) **(Figura 2)**.

Las CMMs se diferencian en tres linajes principales: osteogénico, adipogénico y condrogénico. Existen diferentes protocolos establecidos con el fin de inducir *in vitro* la diferenciación hacia cada tipo celular, teniendo en cuenta que los nutrientes basales, la densidad celular, la organización espacial, fuerzas mecánicas, factores de crecimiento y citoquinas, influyen de manera importante en la diferenciación de CMMs. Estas células cultivadas en condiciones determinadas son capaces de producir factores autocrinos y paracrinos esenciales para la progresión hacia un linaje determinado (Pittenger M et al., 1999).

Muraglia A et al., 2000 proponen un modelo jerárquico determinístico que dirige el proceso de división de las CMMs. En este modelo *in vitro*, las CMMs se diferencian de manera espontánea hacia un linaje osteogénico, mientras que cuando son inducidas, se presenta primero el linaje adipogénico y luego los linajes osteocondrogénicos, que se separan más adelante en el proceso.

Figura 2 Modelos de diferenciación de las CMMs.

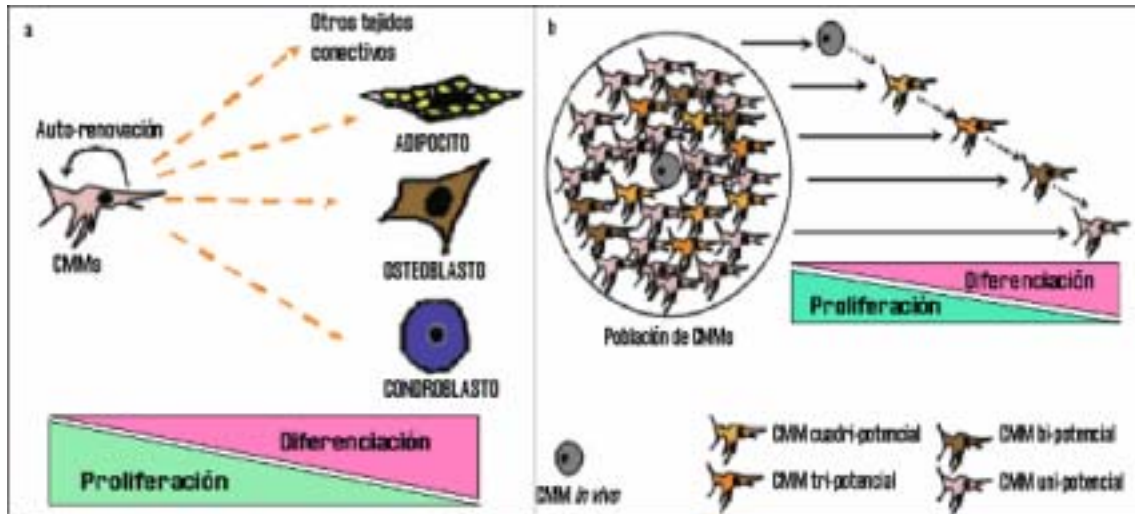


Fig 2: Modelos de diferenciación de las CMMs. (a) Un modelo teórico plantea que las CMMs tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes células maduras incluyendo adipocitos, osteoblastos, condroblastos y células del estroma medular, asimismo poseen capacidad de auto-renovación y proliferación de manera indefinida; sin embargo, a medida que se comprometen con un linaje específico y empiezan a diferenciarse, su capacidad de proliferación disminuye y empiezan a expresar marcadores específicos de linaje. (b) Un modelo alternativo de comportamiento *in vivo* plantea que la población de CMMs comprende varias subpoblaciones celulares con diferentes potenciales de diferenciación (cuadri-, tri-, bi-, y uni-potenciales). Cuando son cultivadas *in Vitro* están presentes todas las subpoblaciones y a medida que son expandidas la capacidad proliferativa disminuye y el potencial de diferenciación se vuelve limitado. Modificado de: Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*, 8, 301-316.

Una teoría que da explicación a la forma en que se regula el proceso de diferenciación de las CMMs, plantea que existen dos compartimentos continuos pero diferentes: uno de células madre y el otro de células comprometidas. El primer compartimento de células madre, alberga CMMs muy primitivas, con amplio potencial de diferenciación que sufren modificaciones transcripcionales para dar

origen a células primitivas sin cambios aparentes a nivel morfológico o fenotípico. Estas células permanecen quiescentes en estadio G0/G1 del ciclo celular hasta el momento en que son estimuladas y empiezan a realizar divisiones asimétricas que dan lugar a dos células hijas, una idéntica a la célula madre y con el mismo potencial de diferenciación, y la otra, una célula precursora con un programa de desarrollo más restringido. Estas últimas células continúan dividiéndose simétricamente, dando origen a células tri-potentes y bi-potentes que permanecen en el compartimento de células madre. El cambio de compartimento hacia células comprometidas se da cuando las células precursoras dan origen a células progenitores unipotentes que van adquiriendo propiedades específicas de linaje que las convierten en células maduras completamente comprometidas, con fenotipos diferenciables (Baksh D et al., 2004). Sin embargo, hasta el momento, no existen muchos estudios que permitan la caracterización fenotípica de superficie de las diferentes subpoblaciones descritas.

1.3. CAPACIDAD PROLIFERATIVA

1.3.1. Proliferación y senescencia

Senescencia y envejecimiento son términos que pueden ser confundidos y que están relacionados con la proliferación celular. Mientras que el envejecimiento es “la suma de las restricciones primarias en los mecanismos regenerativos de organismos multicelulares” (James K & Stolzin A, 2005), la senescencia es específica a nivel celular y se refiere a “la detención irreversible en el ciclo celular” (Hayflick L & Morread P, 1961), por lo tanto implica cambios en la morfología, capacidad proliferativa y hasta en la función. Las CMMs cuando entran en la senescencia cambian su morfología de células ahusadas pasan a ser células grandes y aplanadas, con más prolongaciones que las hace ver más dispersas en

el frasco de cultivo (Sethe S et al., 2005). El potencial de diferenciación también cambia con la edad, la mayoría de estudios coinciden en que las células senescentes conservan un potencial de diferenciación osteogénico, aunque otros trabajos describen un cambio de potencial osteogénico hacia uno adipogénico, denominado “cambio adipogénico” (Sethe S et al., 2005; Ross et al., 2000). Otra característica de las células senescentes es la pérdida del potencial proliferativo asociado con la pérdida telomérica y la no detección de actividad telomerasa.

1.3.2. Telómeros y telomerasa

El telómero es un complejo de proteínas unidas a secuencias de ADN ubicado en el extremo de los cromosomas eucariotas. En vertebrados, estas secuencias están hechas de repeticiones en tándem de $(TTAGGG)_n$ cuyos grupos de guanina están ubicados hacia el extremo del cromosoma en la hebra que va en dirección 5' a 3'. Los complejos telómeros sirven para preservar la integridad cromosómica evitando la fusión entre los extremos de los cromosomas y los eventos de recombinación en o cerca de ellos, también protegen a la célula de la pérdida de ADN durante la división celular. Además, sirven como sitio de anclaje para diferentes proteínas de unión al ADN. La longitud del ADN telomérico humano varía entre cada individuo y al interior de un mismo individuo dependiendo del origen, edad e historia proliferativa de las células estudiadas pudiendo oscilar entre 5000 y 2000 pares de bases (pb) (Greenwood MJ & Landscorp PM, 2003).

La mayor parte del telómero es ADN de doble cadena, sin embargo, el extremo está compuesto por una proyección de cadena sencilla que se dobla sobre sí misma para prevenir la degradación por exonucleasas, formando una estructura protectora particular mediante la unión inusual a través de puentes de hidrógeno

entre guanina y guanina. Esta estructura es conocida como “horquilla-T” (en inglés: “T-loop”) (Figura 3) (Griffith JD et al., 1999)

Figura. 3 Horquilla-T

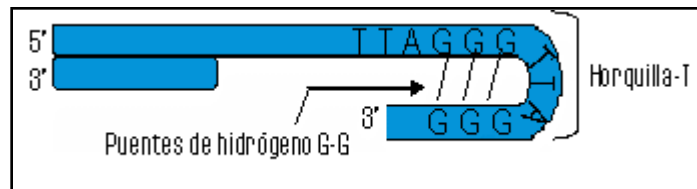


Fig 3: Horquilla T formada por uniones inusuales de puentes de hidrógeno entre guanina-guanina en el extremo de cada cromosoma, cuya función es proteger al ADN de la degradación y eventos de recombinación.

Para que se lleve a cabo la replicación del ADN de manera adecuada, las polimerasas de ADN tienen dos requerimientos importantes antes de iniciar el proceso replicativo. Primero, deben tener iniciadores o primers de ARN que marquen el sitio en el ADN donde la enzima debe comenzar la replicación. Como segundo parámetro, la única dirección en la cual puede replicar la polimerasa de ADN es de 5' a 3' sobre la hebra recién sintetizada. Debido a que las polimerasas de ADN son incapaces de iniciar la síntesis de ADN de la hebra rezagada desde el extremo del ADN lineal y ya que no existen mecanismos conocidos para replicar los iniciadores ó cebadores de ARN de los extremos, el extremo 5' de la nueva hebra queda replicado de forma incompleta y se genera una pérdida de aproximadamente 50 a 200 (pb) de ADN telomérico por cada población de células humanas duplicándose. Esto es lo que se conoce como el problema de la replicación de los extremos (Figura 4) (Watson JD, 1972, Olovnikov AM, 1973).

Con el fin de preservar la capacidad proliferativa y evitar la senescencia replicativa de las células, es necesario mantener la longitud del telómero, esto se logra gracias a la acción del complejo telomerasa. En los seres humanos está compuesto por una ribonucleoproteína, constituida de una parte proteica y una

parte de ARN. La parte proteica tiene actividad de tipo transcriptasa reversa, siendo esta la subunidad catalítica de la telomerasa. La parte de ARN contiene repeticiones AAUCCC, complementarias a la secuencia del telómero, lo que le permite unirse a éste y servir como molde para llevar a cabo la síntesis de ADN y extender la longitud del telómero en dirección 5'-3' (**Figura 4**). A medida que el telómero se extiende por adición de nuevas repeticiones la telomerasa se mueve al extremo recién sintetizado, permitiendo que ocurra elongación adicional. La región de la telomerasa que contiene el ARN se expresa en todos los tejidos somáticos, mientras que la expresión del dominio que contiene la actividad enzimática está restringida a células inmortales como las células del blastocisto y las células tumorales (Wright WE et al., 1996). En la mayor parte del ciclo celular el ADN telomérico está en forma de de horquilla-T, pero durante la fase S, esta estructura se abre para permitir el acceso de la telomerasa (Greenwood MJ & Landsorp PM, 2003).

1.3.3. Telomerasa en Células Madre Mesenquimales

Se ha calculado que las CMMs pierden secuencias teloméricas durante la expansión *in vitro* con cada división a una tasa aproximada de 83pb por cada doblaje poblacional hasta alcanzar un umbral de aproximadamente 10kb, a partir del cual dejan de dividirse y adquieren un fenotipo senescente (Baxter M et al., 2004). Debido a que la longitud telomérica de las CMMs obtenidas de individuos cuyo rango de edad está entre 0-18 años es mayor en comparación con las obtenidas a partir de individuos entre 59-75 años, se presume que la pérdida telomérica también ha ocurrido *in vivo*, anterior a cualquier tipo de manipulación. Siendo la telomerasa la enzima que contrarresta la pérdida telomérica, es de esperar que en células con alta capacidad proliferativa el complejo enzimático esté activo, tal como ha sido descrito para las células tumorales, células de la línea

geminal y células madre embrionarias, hasta cierto nivel en células madre hematopoyéticas, neuronales, de piel y de cripta intestinal (Sethe S et al., 2005).

Figura 4 Replicación de los extremos de los cromosomas.

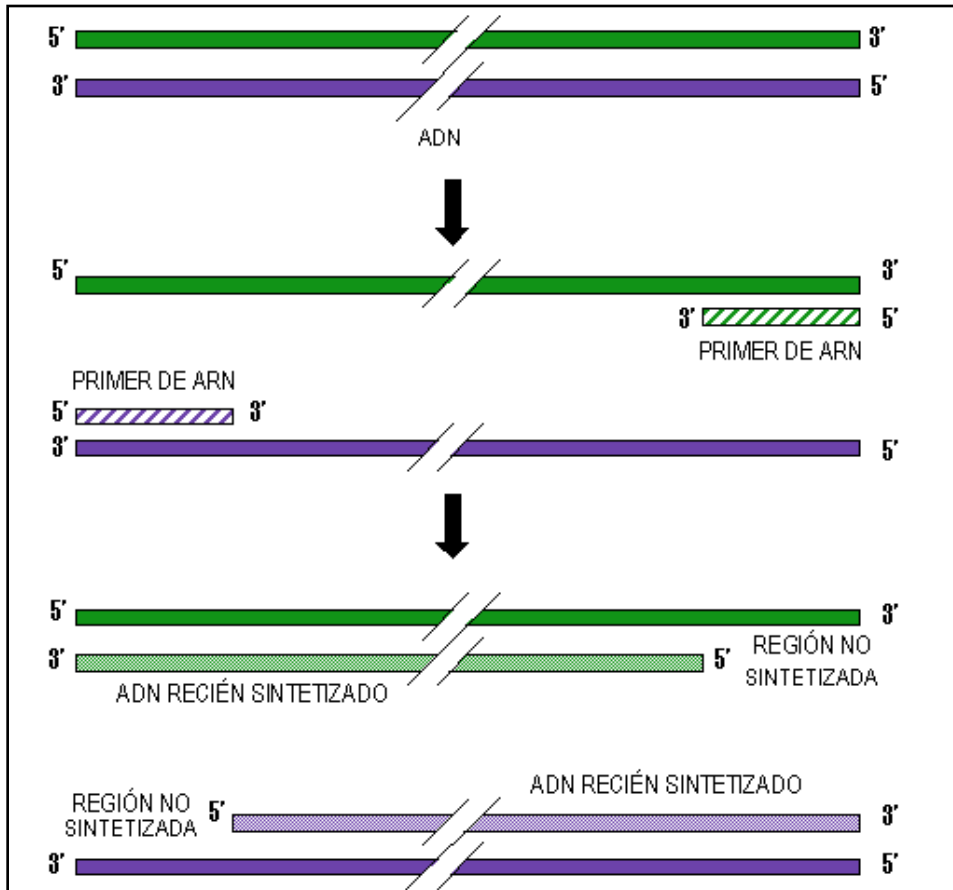


Fig 4: Estado de los extremos de los cromosomas después de la replicación. Modificado de: Lansdorp, P.M. (1995). Telomere length and proliferation potential of hematopoietic stem cells. *Journal of Cell Science*, 108, 1-6.

Sin embargo, estudios en CMMS reportan resultados contradictorios, algunos han reportado una actividad telomerasa (Lee J et al., 2003; Schieker M et al., 2004; Seruya M et al., 2004; Pittenger M et al., 1999; Yoon Y et al., 2005), mientras que

otros no detectan ningún tipo de actividad (Baxter M et al., 2004; Banfi A et al., 2000; Simonsen J et al., 2002; Stenderup K et al., 2003). La diferencia en los resultados puede deberse a la sensibilidad de la técnica usada, al método para cuantificar la actividad telomera y los rangos usados para considerar una actividad negativa. Otra posible explicación es que la actividad telomerasa está siendo inhibida por la expresión de genes de linaje como *CBFA-1*, un gen inductor de linaje osteogénico (Isenmann S et al., 2007) o simplemente que las CMMs con actividad telomerasa constituyen una subpoblación de CMMs poco frecuente (Sethe S et al., 2005).

1.4. CARACTERIZACION DE FIBROBLASTOS

Los fibroblastos son células mononucleares, con morfología ahusada, crecen adheridas y diseminadas en el frasco de cultivo, a altas confluencias son bipolares y con prolongaciones características (Freshney R, 2000). Fueron descritos originalmente en 1867 por Cohnheim como “elementos celulares contráctiles”, descendientes de los leucocitos migrantes (Cohnheim J 1867). Tradicionalmente han sido considerados como células intersticiales responsables de constituir y mantener la estructura tisular y participar en el remodelamiento de órganos (Strutz F et al., 1995). Los fibroblastos sintetizan elementos de la Matriz Extracelular (MEC), la cual está constituida principalmente de colágeno Tipo I y II, fibronectina y proteoglicanos. Se considera que los fibroblastos son heterogéneos en cuanto a su funcionalidad dependiendo del microambiente en el cual se desarrollan. También se les reconoce la capacidad de contribuir al mantenimiento de la proliferación y diferenciación de otras células como las epiteliales (Strutz F et al., 1995) y participar en los procesos de inflamación no sólo por tener la capacidad de responder a señales de tipo químico como las citoquinas, sino también por sintetizar algunas de ellas, por ejemplo las quemoquinas y otros mediadores de la inflamación (Ogawa M et al., 2006).

Cuando los fibroblastos reciben estímulos adecuados pueden diferenciarse en miofibroblastos con propiedades contráctiles gracias a la expresión de miosina y actina α de músculo liso, que les permite participar en la reducción del tamaño de las heridas. La proliferación incontrolada de los fibroblastos da origen a la fibrosis tisular, y el proceso mediante el cual ocurre la reparación tisular luego de algún daño es llamado fibrogénesis (Ogawa M et al., 2006).

En cuanto a su origen Strutz F et al., sugieren que puede ser epitelial, producto de una Transición Epitelial-Mesenquimal (TEM), un mecanismo descrito a nivel embrionario, en el cual las células epiteliales se alejan de las células que las rodean y se desarrollan en células mesenquimales (Strutz F et al., 1995). La TEM se ha descrito *in vitro* cuando células epiteliales adheridas a membranas basales empiezan a expresar citoquinas en respuesta a la disrupción de las membranas por proteasas u otro tipo de alteraciones. Los factores de crecimiento como TGF- β , EGF, y FGF-2 promueven la TEM al unirse a receptores epiteliales con actividad quinasa intrínseca inducida por ligandos. Luego de esto se activan las vías de señalización Ras y Src, que convergen en la activación de programas genéticos que llevan a la pérdida de la adhesión celular y la inducción de la TEM, fenómeno observado en células en cultivo. Otra teoría para explicar el origen de los fibroblastos apunta a la MO, los primeros reportes fueron presentados por Fridenstein et al., quienes demostraron el desarrollo de UFC compuestas de fibroblastos a partir de muestras de MO (Fridenstein A et al., 1970). Debido a que en la MO residen células madre hematopoyéticas y CMMs, se ha especulado sobre la posibilidad de que los fibroblastos tengan origen hematopoyético (Ebihara Y et al., 2006). El grupo de Ogawa et al., recientemente demostró que una población de fibroblastos provenía de células madre hematopoyéticas, reforzando la teoría acerca de la existencia de diferentes poblaciones de fibroblastos

originadas en diferentes tejidos, dicho hallazgo podría ser la base de una nueva manera de clasificar los fibroblastos y miofibroblastos (Ogawa M et al., 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

En los últimas décadas y a pesar de ser un tema sobre el cual se vienen desarrollando investigaciones hace más de quince años, las células madre han despertado gran interés entre la comunidad científica por su potencial uso en terapias regenerativas. La expectativa frente al uso de estas células a nivel terapéutico se debe a la capacidad que tienen de auto-renovarse, es decir, de producir nuevas células hijas con la misma información genética que la célula de origen, y a su potencial de diferenciarse, dando origen a células de diferentes tejidos. Una de las poblaciones de células madre que puede ser hallada en tejidos humanos adultos son las Células Madre Mesenquimales (CMMs) de médula ósea. Estas células con potencial múltiple de diferenciación, pueden producir células como osteoblastos, adipocitos, condrocitos, mioblastos, fibroblastos y células estromales, bajo la influencia de estímulos adecuados. Además, bajo las condiciones apropiadas, son células de fácil recuperación y expansión a nivel de laboratorio. Estas características hacen que las CMMs sean una buena alternativa para el tratamiento de enfermedades degenerativas y para terapias de reemplazo.

A pesar de las bondades presentadas por estas células, antes de ser usadas directamente en pacientes es necesario establecer fuentes adecuadas de obtención y estandarizar las condiciones de cultivo *ex vivo* que permitan una expansión eficiente. Además, debido a que las poblaciones de CMMs obtenidas en cultivo son heterogéneas entre sí en cuanto a su potencial de diferenciación, proliferación, perfil de expresión génica y expresión de marcadores de superficie, es necesario caracterizarlas adecuadamente durante el proceso de expansión *in*

vitro. El análisis del inmunofenotipo basado en los marcadores de superficie de las CMMs permitirá determinar la verdadera presencia de una población de células madre o si hay una mezcla de varios progenitores específicos de linaje.

De tal manera que para poder contar con un número suficiente de células para ser analizadas por citometría de flujo y que sea una población representativa de células es necesario establecer parámetros de cultivo que garanticen su presencia. Por eso, uno de los primeros pasos es elegir la fuente y la ubicación anatómica de fácil acceso para su obtención.

Con este estudio se quiere determinar si a partir de aspirados de médula ósea obtenidos de la metafisis proximal de la tibia es posible obtener cultivos de CMMs adherentes a la superficie de cultivo y con morfología fibroblástica. Asimismo, se espera encontrar tasas de generación celular que varíen entre 12 y 72 horas, tiempo que ha sido reportado en estudios previos, y lograr obtener cultivos que alcancen hasta 7 doblajes poblacionales antes de observar algún cambio en su morfología o en el inmunofenotipo, lo cual podría ser un indicador de que las células están empezando a diferenciarse. Una vez estandarizadas las fases de cultivo mencionadas previamente, se busca determinar el cambio en la expresión de los antígenos de superficie CD13, CD44, CD90 y CD105 los cuales se ha encontrado que son comunes a estas células y que sean una potencial herramienta para su selección, aislamiento y purificación en estudios posteriores. Por lo tanto, a medida que avanza el tiempo de cultivo se espera observar un aumento en el porcentaje de células que expresan los marcadores

Este estudio es uno de los primeros realizados en el país, que llevó cabo una investigación básica sobre la caracterización inmunofenotípica de las CMMs y su correlación con los hallazgos morfológicos y patrón de proliferación bajo las condiciones de cultivo establecidas por el grupo de trabajo, para crear modelos

experimentales que permitan comprobar su verdadero potencial de diferenciación *in vitro* y que puedan ser usadas en futuras aplicaciones en regeneración tisular.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

1. Caracterizar las Células Madre Mesenquimales provenientes de médula ósea humana, según la morfología, el inmunofenotipo y la tasa proliferativa.

3.2. ESPECÍFICOS

1. Obtener cultivos de células madre mesenquimales (CMMs) a partir de muestras de médula ósea humana de metáfisis proximal de tibia.
2. Determinar las características morfológicas, la viabilidad celular y el comportamiento en cultivo de CMMs humanas.
3. Determinar el efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento de las CMMs humanas.
4. Caracterizar inmunofenotípicamente las CMMs humanas durante su expansión *in vitro*, identificando la expresión de los marcadores de superficie específicos: CD13, CD44, CD90 y CD105 .
5. Comparar la expresión de los marcadores de superficie elegidos, entre las CMMs y un cultivo primario de fibroblastos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. TIPO DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE SELECCIÓN DE DONANTES VOLUNTARIOS

El estudio realizado fue de tipo descriptivo, en donde inicialmente se realizó la expansión *in vitro* de las CMMs obtenidas de aspirado de médula ósea. Las células fueron tomadas a partir de donantes voluntarios sanos con aceptación por medio de la aprobación y firma del consentimiento informado (ver anexo 1), que asistieron al servicio de Ortopedia y Traumatología de la Fundación Santa Fe. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: pacientes sanos entre 12-42 años, que requirieron artroscopia quirúrgica de rodilla, con ausencia de antecedentes de enfermedades hematológicas y que no hubieran recibido quimioterapia.

4.1.1. Variables de estudio

1. Características morfológicas, viabilidad y tasa de generación celular de CMMs en el sistema de cultivo establecido.
2. Expresión de los antígenos de superficie CD13, CD44, CD90 y CD105, y ausencia en la expresión de los marcadores CD34 y CD45.

Los abordajes quirúrgicos en los pacientes para la toma de muestra de MO de la metáfisis proximal de la tibia fueron los siguientes:

- En pacientes programados para reconstrucción de ligamento cruzado anterior por vía artroscópica se realizó un abordaje en la cara anterior

interna de la metáfisis proximal de la tibia para la toma del injerto de reconstrucción ligamentaria, que es usual. A través de este mismo abordaje se realizó una punción en la metáfisis proximal de la tibia para la toma de la muestra a estudiar. En este mismo sitio posteriormente durante el procedimiento de reconstrucción ligamentaria se hizo un túnel de aproximadamente 8 mm de diámetro y 40 mm de largo.

- En pacientes programados para artroscopia quirúrgica (menisectomía, condroplastia, sinovectomía), sin reconstrucción ligamentaria, la muestra requirió una punción sobre la cara anterior interna de la tibia, para toma percutánea de la muestra de estudio. Esta punción se hizo en un sitio diferente a los abordajes de la artroscopia.

Posterior al abordaje quirúrgico como se señaló previamente, el médico ortopedista tomó entre 5-20ml de muestra con una aguja de aspirado de MO (Atrion NeedleVise®, Medical Device Technologies, Inc.) de calibre 15, que fueron recogidos en tubos heparinizados estériles. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente protegidas de la luz, hasta su traslado al Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario para su procesamiento dentro de las 3 horas siguientes a su recolección.

4.2. SEPARACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE CMMS A PARTIR DE ASPIRADOS DE MÉDULA ÓSEA

Bajo condiciones de esterilidad las muestras fueron procesadas en una cabina de flujo laminar tipo II se desinfectó el sitio de trabajo con alcohol al 70%. Los aspirados de MO fueron pasados de los tubos heparinizados a tubos Falcon de 15

ml con el fin de determinar el volumen exacto de la muestra recogida. Luego de esto se hizo la separación de células por dos métodos diferentes:

- 1 Separación por gradiente de densidad con Histopaque (Sigma) en una relación 3:1, y centrifugación durante 30 minutos a 2500 rpm.
- 2 Tratamiento previo durante 20 minutos con el cóctel de enriquecimiento RosetteSep® (Stem Cell Technologies, EEUU) con el fin de eliminar las células no deseadas y enriquecer la muestra. Este cóctel contiene una combinación de anticuerpos monoclonales purificados de ratón y rata, unidos en complejos tetraméricos de anticuerpos bi-específicos, que están dirigidos contra los antígenos de superficie celular de células hematopoyéticas humanas (CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b) y contra glicoforina A en glóbulos rojos (**Figura 5**). Luego del tratamiento con el cóctel, la muestra es centrifugada durante 25 minutos a 1400 rpm sin freno.

Algunas muestras fueron procesadas únicamente con un método de separación, y en otras se dividió el volumen total de muestra en dos fracciones para utilizar y comparar los dos métodos de separación de manera simultánea.

Luego de que los tubos cumplieron el tiempo de centrifugación, se observó una capa de células mononucleares, la cual fue recogida con una pipeta Pasteur y pasada a un tubo con 3ml de PBS 1X estéril, para ser centrifugadas a 1800 rpm durante 5 minutos. Luego del lavado con PBS 1X las células fueron incubadas con una solución de lisis de glóbulos rojos que contenía cloruro de amonio 155 mM, bicarbonato de sodio 10 mM y EDTA 0.1 mM, posteriormente se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo DMEM-LG (Sigma) y se tomó una alícuota, que fue tratada con azul de tripán al 0.25% (casa comercial) para contarlas con la ayuda de una cámara de Neubauer.

De acuerdo al número de células obtenidas, la muestra fue dividida en dos fracciones: una fracción se repartió para realizar las pruebas de inmunotipificación por citometría de flujo, en cuyo caso se utilizaron inicialmente 40.000 células al día 0 antes de sembrar las células y sembrar en dos pozos en placa de cultivo de fondo plano de 24 pozos (Corning), cada uno con 1×10^6 células/cm² con el fin de realizar la citometría de flujo a los 8 y 14 días utilizando el total de células presentes en los pozos. La otra fracción de células fue sembrada a diferentes densidades en frascos de 25cm² y 75cm². Las densidades de siembra oscilaron entre 6×10^3 hasta 1×10^6 células/cm² y se definieron de acuerdo a lo realizado previamente por varios autores quienes reportan que a partir del primer pase y en los pases sucesivos, la densidad de siembra debe disminuirse a $3-8 \times 10^3$ células/cm². (Kulterer B et al., 2007; Gang E et al., 2006; Shim W et al., 2005; Bieback K et al., 2004; Wexler S et al., 2003; Pittenger M et al., 1999).

4.3. CONDICIONES DE CULTIVO *ex vivo* DE CMMs

Luego de obtener la fracción de células mononucleares totales o pre-enriquecidas con el cóctel de enriquecimiento, éstas fueron sembradas a densidades entre 6×10^3 hasta 1×10^6 células/cm² en frascos de cultivo de 25cm², 75cm², en placas de 24 pozos para realizar los ensayos de citometría, o en placas de 96 pozos para los ensayos de MTT, de acuerdo al número de células recolectadas luego de la separación.

El cultivo se realizó en medio DMEM-LG bajo en glucosa con L-glutamina (Sigma-aldrich), suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO) y 100 unidades de penicilina/estreptomicina (GIBCO). Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y se les cambió de medio cada 3-4 días. Cuando alcanzaban confluencia del 80%, fueron desprendidas con tripsina al 0.5%

- EDTA al 0.1% durante 2 minutos y resembradas a densidades entre $4-6 \times 10^3$ células/cm².(Gang E et al., 2006).

Figura 5 Obtención de CMMs por el método de selección negativa mediante formación de inmuno-rosetas usando RosetteSep™.

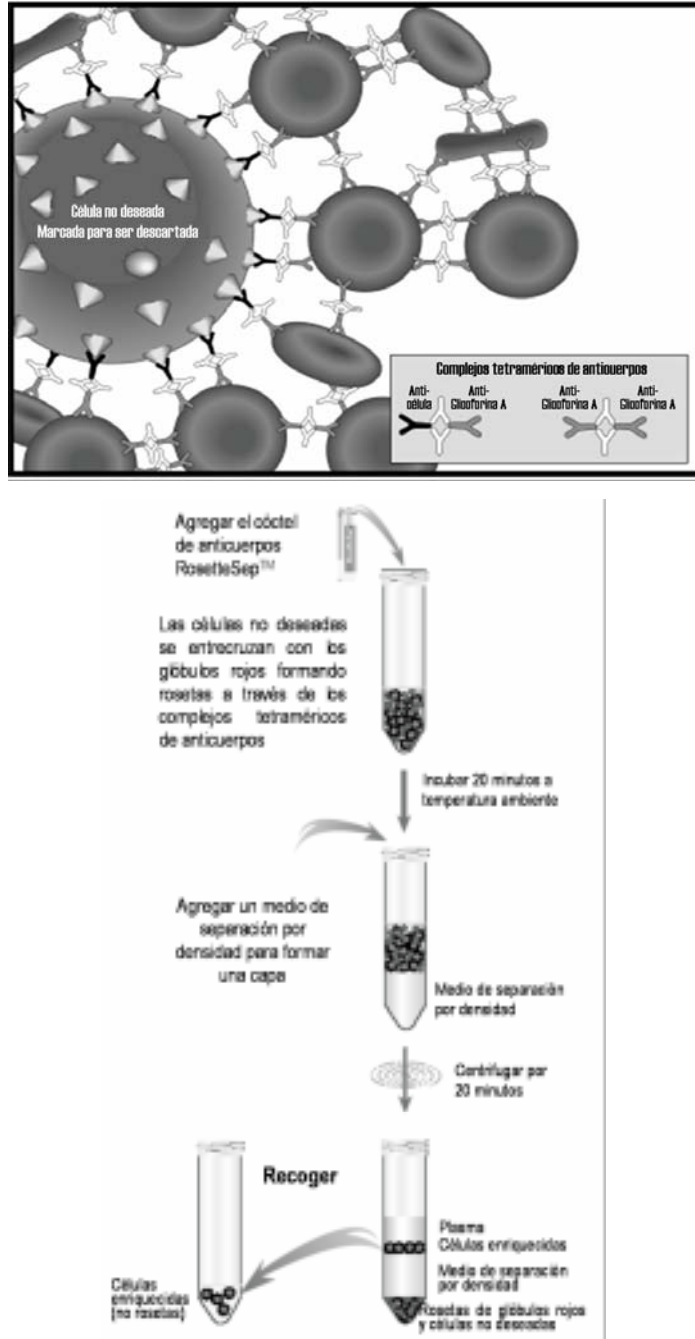


Fig 5: Esquema explicativo del método de enriquecimiento por formación de inmuno-rosetas usando el cóctel de anticuerpos RosetteSep™ Tomado de: StemCell technologies. Recuperado el 30 de abril de 2005 en www.stemcell.com/technical/bulletins.asp

4.4.DETERMINACIÓN DE LA TASA DE GENERACIÓN CELULAR, CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LAS CMMS

La curva de crecimiento se realizó directamente al microscopio superponiendo el frasco de cultivo sobre una cuadrícula de 1mm x 1mm de área y contando el número de células diariamente en una colonia determinada desde el primer día de aparición de células fibroblásticas hasta el día en el que se realizó el primer pasaje.

4.4.1. Ensayo MTT reductasa

Para medir la viabilidad celular se usó el ensayo colorimétrico **MTT reductasa (3(4,5- dimetiltiazol -2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio)**, mediante el cual se puede cuantificar el número de células vivas, gracias a su capacidad para reducir las sales de tetrazolio, a cristales de formazán, esta reacción es llevada a cabo por las enzimas reductasas mitocondriales y produce una coloración violeta. El ensayo colorimétrico MTT es ampliamente usado en estudios de proliferación celular que evalúan respuesta a factores de crecimiento y efectos de agentes farmacológicos entre otros (Altman 1976).

Para la determinación de la viabilidad se agregó el reactivo MTT (5 mg/ml) (Sigma) en DMEM-LG suplementado a una concentración final por pozo de 1 mg/ml, se incubó por 120 minutos a 37°C, en condiciones estériles, luego de lo cual se retiró la solución y se disolvieron los cristales con buffer de lisis (Dimetilformamida en agua 15:40 v/v, pH:4.7 ajustado con ácido acético y 40 g de SDS) (Dimetilformamida marca Sigma, SDS marca Invitrogen). Se incubó a 37°C

por 30 minutos luego se agitó para disolver los cristales y se midió la absorbancia a 595 nm.

Se realizó una curva de calibración, sembrando por triplicado en una placa de 24 pozos, un número inicial de 25.000 células, duplicando la cantidad hasta tener 100.000 células en los últimos tres pozos. Se cultivaron por 17 horas, tiempo suficiente para que las células se adhirieran a la placa sin dividirse. Se utilizaron fibroblastos como células control debido a su similitud en morfología y comportamiento en cultivo con las CMMs.

4.4.2. Ensayo de exclusión azul de Tripán

Otro ensayo empleado para el recuento de células viables fue el **de exclusión de azul de Tripán**, que se basa en la capacidad que tienen las células muertas o con ruptura de membrana para captar el colorante, las células vivas no lo captan. Este ensayo hace posible contar de manera directa (en la cámara de Neubauer), el número de células vivas (totalmente redondeadas, refringentes a la luz, sin distorsiones en el citoplasma) y muertas (teñidas de azul, no redondeadas, con grandes distorsiones de la membrana), lo que permite establecer porcentajes de viabilidad celular.

El número de doblajes celulares (NDC) fue obtenido mediante la fórmula

$$NDC = \frac{\text{Log}_{10}(Y / X)}{\text{Log}_{10}2} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde Y es el número de células al final de un período de tiempo y X es el número de células inicialmente sembradas.

La tasa de generación celular (TGC), que corresponde al tiempo que se necesita para que una célula se divida o para que la población celular se duplique, se calculó dividiendo el tiempo (en días) transcurrido en el período X-Y, entre el NDC:

$$TGC = \frac{\text{Tiempo(días)}}{NDC}$$

Ecuación 2

4.5. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE COLONIAS MEDIANTE EL ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS - FIBROBLASTOIDES (UFC-F)

Se utilizó el ensayo de UFC-F descrito por Castro-Malaspina (Castro-Malaspina et al., 1980) con algunas modificaciones. En este ensayo se utiliza el colorante de Giemsa, constituido por una mezcla de azul de metileno y eosina, que es captada por la célula e ingresa al núcleo, allí se une a los grupos fosfatos del ADN en las regiones donde hay grandes cantidades de puentes adenina-timina, y colorea el núcleo de rosado o magenta, el nucleolo en azul oscuro y el citoplasma de gris-azul pálido. Se tiñen las células previamente fijadas en alcohol o formaldehído y no funciona apropiadamente a menos que la preparación sea completamente anhidra (Freshney 2000)

Cuando las células en cultivo en frascos de 25cm², alcanzaron una confluencia del 70%, se les retiró el medio de cultivo, luego se lavaron tres veces con PBS1X (Gibco) y se fijaron con 3ml de metanol al 1% en PBS1X durante 5 minutos. Posteriormente se descartó el Metanol/PBS y se reemplazó con 2ml de solución de Giemsa compuesta de Giemsa al 40% más Tampón Sorensen al 40% en agua, se adicionó de tal forma que cubriera completamente la monocapa de células. Después de 5 minutos se retiró la solución y el frasco fue lavado tres veces con agua destilada. Al retirar el agua, las colonias fueron distinguidas y contadas a simple vista, las células se observaron con ayuda del microscopio invertido.

4.6. EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO DE LAS CMMs MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Los ensayos de citometría de flujo para inmunofenotipificación se realizaron los días 0, 8 y 14 de cultivo y en cada pase hasta el pase 4. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos propios de células hematopoyéticas CD45 y CD34 marcados con el fluorocromo alofococianina (APC), y los anticuerpos dirigidos contra antígenos de CMMs, CD105 don SN6 (Dako) y CD44 clon G4426 (BD Biosciences) marcados con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) y CD90 clon 5E10 (BD Biosciences) y CD13 clon WM15 (BD Biosciences) marcados con Ficoeritrina (PE). Para el análisis de las poblaciones positivas y negativas se usaron controles de isotipo IgG1 de ratón acoplado a FITC y PE (BD Biosciences).

Para cada ensayo de citometría se prepararon 4 tubos con un mínimo de 10.000 células por tubo. Las células fueron lavadas con buffer de tinción para citometría (0.5% albúmina sérica bovina (Sigma), 0.02% azida de sodio (Sigma) en PBS , centrifugadas. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón de células y se procedió a la marcación con los diferentes anticuerpos distribuidos de tal forma que cada tubo tuviera un anticuerpo para células hematopoyéticas y dos para CMMs, cada uno marcado con un fluorocromo diferente (APC, FITC o PE) con el fin de distinguir cada población celular en el análisis posterior de los datos (**Tabla 1**):

Tabla 1 Distribución de tubos para ensayos de citometría de flujo

	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4
Marcador de célula hematopoyética unido a APC	CD45	CD34	CD45	CD34
Marcador de CMM unido a FITC	CD105	CD44	Control de isotipo	Control de isotipo
Marcador de CMM unido a PE	CD13	CD90	Control de isotipo	Control de isotipo

Tabla 1: se presenta la combinación de anticuerpos usada en los cuatro tubos que se montaron para cada ensayo de inmunotipificación por citometría de flujo.

Las células marcadas se incubaron por 30 minutos a 4°C en oscuridad, luego fueron lavadas nuevamente con buffer de tinción y fijadas con el buffer de fijación (1% paraformaldehído en PBS1X). Los tubos se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta el momento de ser analizados en un citómetro de flujo FACSCalibur de 4 colores (Beckton Dickinson). El análisis de las muestras se realizó en el programa CellQuest Software, abriendo una ventana que analizara a las CMMs de acuerdo a su tamaño y granularidad, para posteriormente estudiar la expresión de cada marcador.

Como control se usaron fibroblastos obtenidos de un cultivo primario de prepucios de niños, obtenidos en la Clínica Colsubsidio durante el proceso de circuncisión. También se usó la línea celular A375 de melanoma (American Type Cell Collection, ATCC).

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio es principalmente de tipo descriptivo, aunque para el análisis de las pruebas de citometría se estableció la sensibilidad de la prueba usando una prueba chi-cuadrado, que permitió comparar las proporciones de las células positivas para el control de isotipo y el anticuerpo analizado. Las diferencias entre los porcentajes de células positivas para cada anticuerpo evaluado fueron analizadas mediante pruebas no paramétricas. La significancia de las correlaciones se estableció mediante la correlación de Spearman, en los casos en los que se indique.

5. RESULTADOS

5.1. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Se recogieron un total de 14 muestras provenientes de individuos con un rango de edad comprendido entre los 13 y 37 años, y un volumen de aspirado de médula ósea que osciló entre 3 y 21 ml durante el periodo comprendido entre enero y julio de 2007.

De las 14 muestras obtenidas no se pudieron analizar algunas por diversas circunstancias: las primeras 3 fueron utilizadas para estandarizar el proceso de recolección, y las células en cultivo sembradas a partir de estas muestras no mostraron la morfología esperada y murieron antes de 10 días, las muestras 4, 6, 8 y 10 murieron en el pase 0 ó pase 1 y la muestra 11 no pudo ser procesada debido a problemas técnicos en el laboratorio. Las muestras 4 y 5 fueron separadas únicamente con el cóctel de enriquecimiento RossetteSep® (Stem Cell Technologies), las muestras 1, 2, 3, 10, 12, 13 y 14 sin el cóctel de enriquecimiento y en las muestras 5, 6, 7 y 8 se utilizaron ambos métodos de separación. El número promedio de células obtenidas luego de dicho proceso fue de 55 millones en ausencia del cóctel y 13 millones luego del enriquecimiento con el cóctel (**Tabla 2**).

Tabla 2. Información general de los cultivos.

Muestra	Edad (años)	Volumen promedio de aspirado de médula ósea	Cóctel de enriquecimiento	Número de células mononucleares	Nº días hasta la primera confluencia	Supervivencia
1-260107	22	10ml	N	2,57.E+07		Estandarización toma de muestra
2-290107	37	10ml	N	3,72.E+07		Estandarización toma de muestra
3-020207	40	10ml	N	3,46.E+07		Estandarización toma de muestra
4-230207	42	5ml	S	3,17.E+07	14	Células murieron al P1
5-280208	25	5ml	S	2,91.E+06	14	Mas allá del P2
			N	8,71.E+07	14	Mas allá del P2
6-020307	37	10ml	S	9,20.E+06	14	Células murieron al P1
			N	1,27.E+08	14	Mas allá del P2
7-020307	13	10ml	S	2,71.E+06	14	Mas allá del P2
	13		N	6,85.E+06	14	Mas allá del P2
7-030307	13	3ml	N	6,50.E+06	14	Mas allá del P2
8-280307	15	15ml	S	1,03.E+07		No aparecieron CMMs
	15		N	2,40.E+07	28	Mas allá del P2
9-300307	25	13ml	S	2,01.E+07	27	Mas allá del P2
10-090407	22	10ml	N	2,31.E+07		Células murieron al P0
11-200407		10ml		Muestra no procesada		
12-040507	17	17ml	N	1,04.E+08	19	Mas allá del P2
13-310507	15	21ml	N	1,43.E+08	20	Mas allá del P2
14-010607	19	5ml	N	4,06.E+07	29	Mas allá del P2

Tabla 2. Se recogieron un total de 14 muestras de las cuales, las primeras 3 fueron utilizadas para estandarizar el proceso de recolección. Las muestras 4, 6, 8 y 10 murieron en el pase 0 o pase 1, y la muestra 11 no pudo ser procesada debido a problemas técnicos en el laboratorio. Las muestras 4 y 5 fueron separadas únicamente con el cóctel de enriquecimiento RossetteSep® (Stem Cell Technologies), las muestras 1, 2, 3, 10, 12, 13 y 14 sin el cóctel de enriquecimiento y en las muestras 5, 6, 7 y 8 se utilizaron ambos métodos de separación.

5.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

En los primeros 3 días de cultivo las células sembradas mostraron una morfología redondeada, algunas se mantuvieron en suspensión y otras se empezaron a adherir a la placa de cultivo (**Figura 6 a.**). Entre el día 3-11 de cultivo se pudieron observar las primeras células con morfología ahusada típica fibroblastoide (**Figura 6**

b-c) y se empezaron a observar colonias hasta alcanzar la confluencia del 80% hacia el día 14-29 (**Figura 6 d-f**) en donde se les realizó el primer pase.

En general, las CMMs presentaron una morfología alargada muy similar a la de los fibroblastos, sin embargo, dependiendo del estado de proliferación y de la confluencia celular también pudieron ser observadas otras formas celulares. Las que se encontraban proliferando activamente tenían un aspecto alargado, con la membrana íntegra, baja relación núcleo/citoplasma y sin vacuolas. Cuando hubo pocas células en cultivo y éstas se encontraban separadas presentaron prolongaciones bastante largas y su tamaño fue mayor en comparación con los cultivos con densidades celulares superiores (**Figura 7 a-b**); a medida que los cultivos alcanzaban la confluencia, el tamaño celular disminuyó y se empezaban a observar detritos celulares (**Figura 7 b-c**). Cuando la tasa de proliferación celular disminuía y las células entraban en un posible estado de quiescencia, su morfología típica cambió a una aplanada y de mayor tamaño. (**Figura 7 e-f**). En un mismo cultivo a baja confluencia se observaron células multipolares (**Figura 5.3a**) y células alargadas bipolares o multipolares un poco más redondeadas (**Figura 5.3b**), así como células en división (**Figura 5.3c-d**).

Figura 6 Características morfológicas en los primeros días de cultivo.

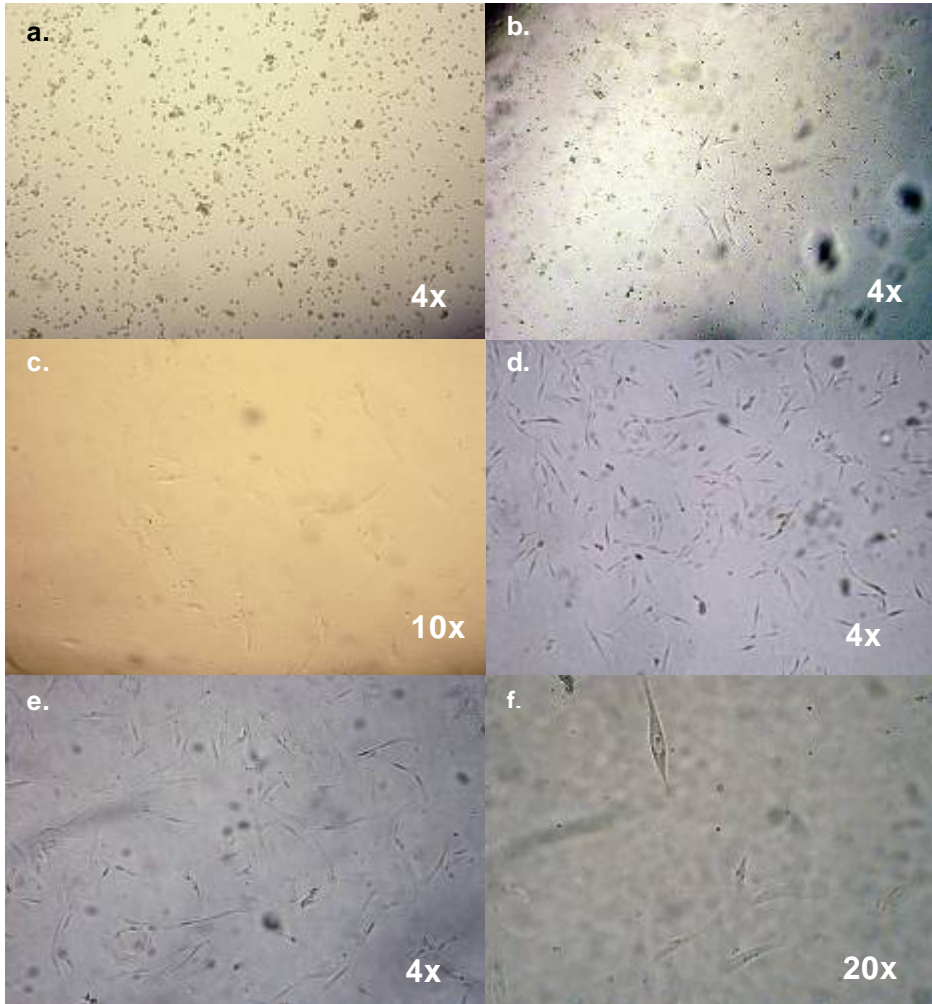


Fig 6: Vista al microscopio invertido de CMMs. **a.** Muestra 4 día 1 de cultivo. **b-c.** Muestra 5 día 5 de cultivo. **d-e** Muestra 4 día 14 de cultivo. **f.** Célula con morfología típica fibroblastoide.

Figura 7 Características morfológicas entre el pase 0 y 4.

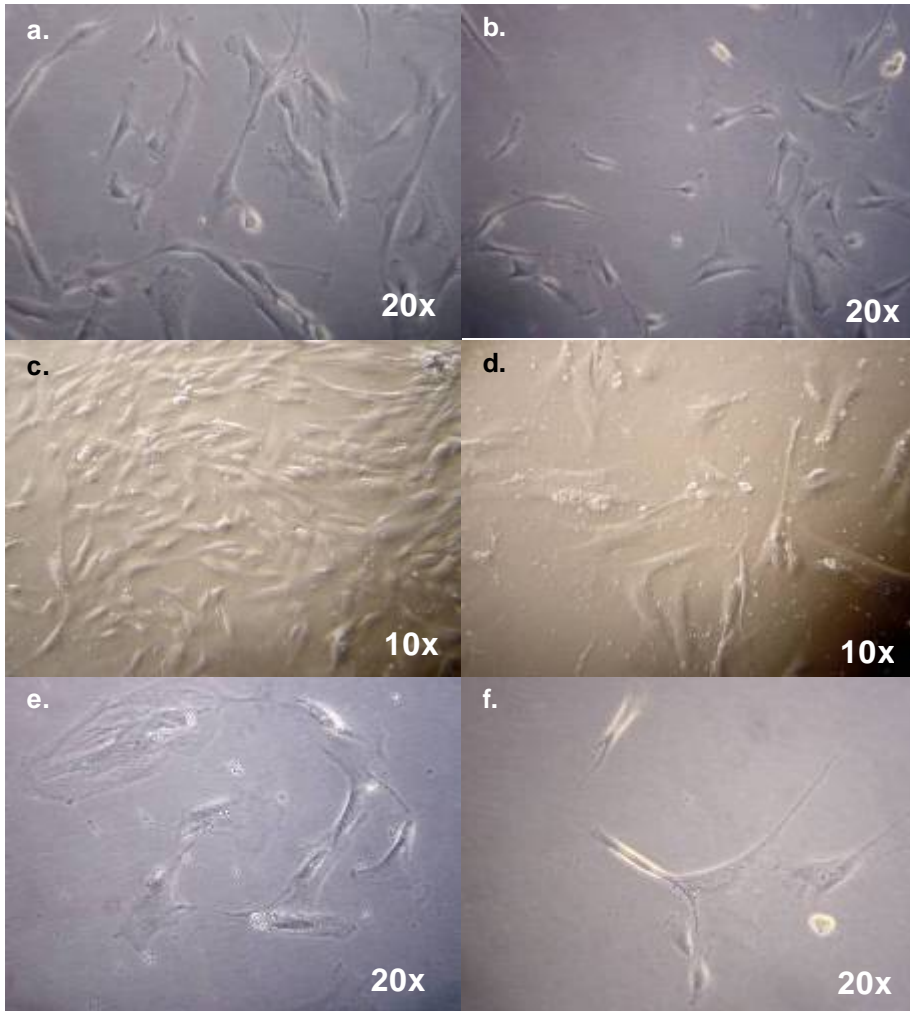


Fig 7:Vista al microscopio invertido con contraste de fases de fases de CMMs. **a-b.** Muestra 9 pase 0 día 28 de cultivo. **c.** Muestra 8 pase 1 día 24 de cultivo colonia al 80% de confluencia. **d.** Muestra 8 pase 1 día 24 de cultivo colonia al 40% de confluencia. **e-f.** Muestra 7-2 pase 4 células grandes y aplanadas

Figura 8 Diferentes morfologías celulares.

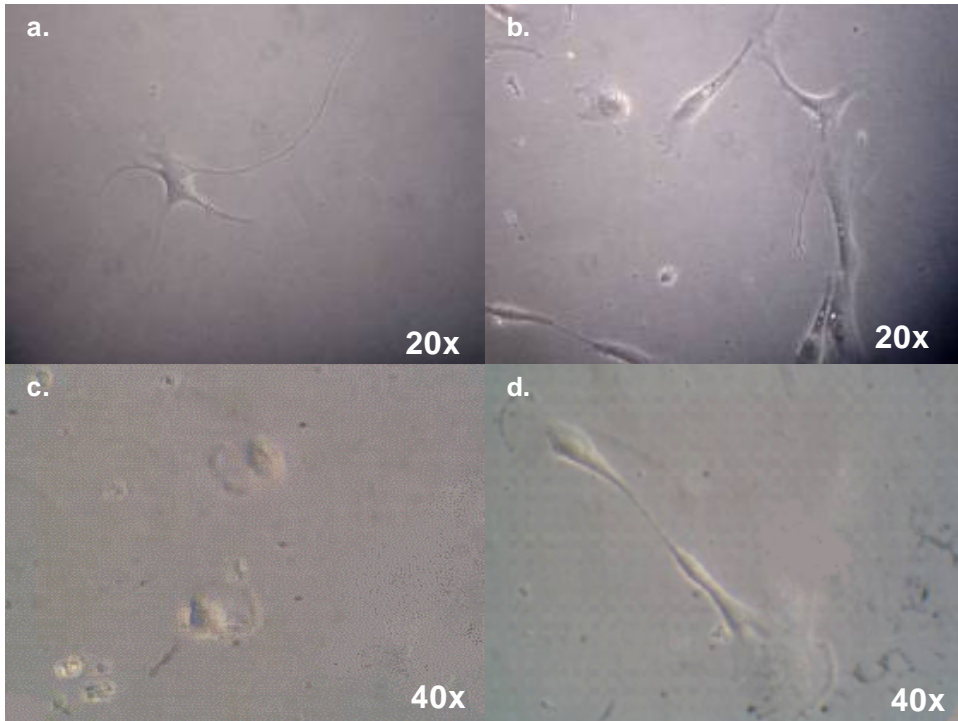


Fig 8: Vista al microscopio invertido de contraste de fases de las CMMs. **a.** Muestra 5 pase 4 célula multipolar. **b.** Muestra 5 pase 4 células alargadas bipolares y redondas. **c-d.** Muestra 12 día 8 de cultivo, células en división.

5.3. ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS FIBROBLASTOIDES

Mediante el ensayo de UFC-F se compararon las diferentes densidades de siembra con el fin de determinar la densidad óptima para obtener un mayor número de colonias de gran tamaño. Debido a que el número de células recogidas era limitado, y este ensayo implicaba el uso total del frasco, por lo cual las células no podían continuar en cultivo, solamente se realizó el ensayo con las muestras 12 y 13, las cuales presentaron una gran cantidad de células luego de la separación inicial.

Se empezaron a observar colonias entre el cuarto y sexto día de cultivo. El número de colonias aumentó progresivamente hasta estabilizarse hacia el día octavo y a partir de ese punto solamente aumentó el tamaño de las colonias. En la **Figura 9 a** se pueden observar las colonias de células sembradas a diferentes densidades celulares: 1×10^6 , 4×10^5 y 2×10^5 células/cm², en frascos de 25cm² y la **Figura 9 b-c** muestra las colonias observadas con la ayuda del microscopio invertido. El mayor número de colonias (10-14) se obtuvo sembrando a una densidad celular inicial de 1×10^6 células/cm². Asimismo, las colonias obtenidas a esta densidad presentaron un mayor tamaño en comparación con otras densidades de siembra. Teniendo en cuenta el número de colonias obtenido se calculó la frecuencia de CMMs en las células sembradas. En teoría una sola célula debe ser capaz de dar lugar a una colonia, sin embargo las observaciones de este estudio permitieron establecer que es necesario el contacto célula-célula para inducir la proliferación y que se requirió un mínimo de tres células para que se desarrollara una colonia, como se comprobó mediante la observación directa durante los conteos diarios. De acuerdo a estos datos se calculó que por cada 10^5 células sembradas habían 0.1-0.2 CMMs.

Figura 9: Ensayo de UFC-F.

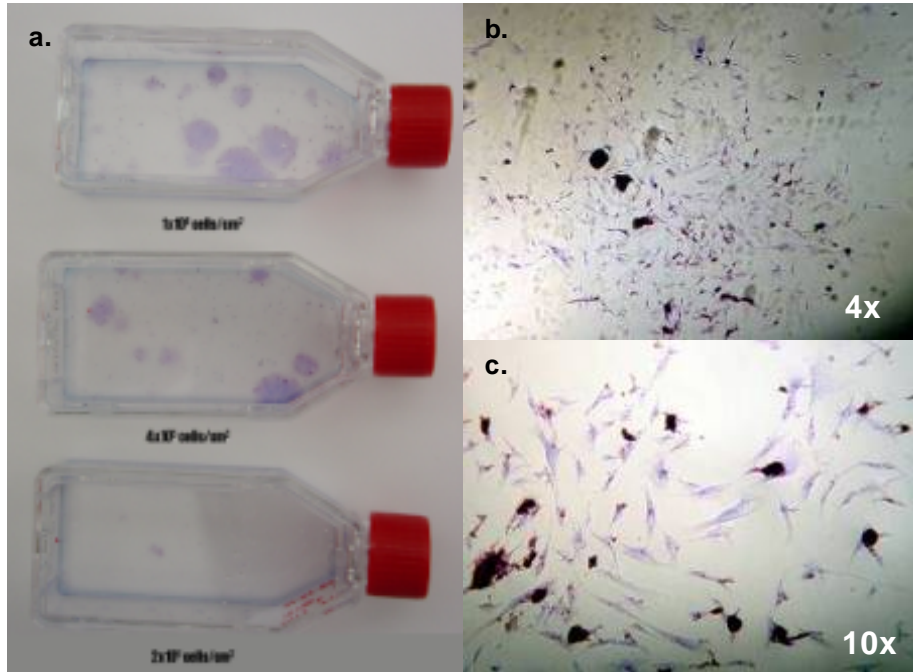


Fig 9: Se muestra el ensayo de UFC-F a diferentes densidades de siembra con la tinción de Giemsa. **a.** Comparación de colonias a diferentes densidades de siembra: 1×10^6 , 4×10^5 y 2×10^5 células/cm² en frascos de 25cm². **b-c.** Vista al microscopio de las colonias teñidas con coloración de Giemsa.

5.4. DETERMINACIÓN DE TASAS DE GENERACIÓN CELULAR Y CURVAS DE CRECIMIENTO

Las TGC fueron determinadas realizando conteo celular con azul de tripán al inicio y al final de cada pase. Adicionalmente en cada pase se sembraron 10.000 células/pozo por duplicado en placa de 24 pozos con el fin de realizar el ensayo de MTT a los 10 días después de la siembra para corroborar los resultados obtenidos con el azul de tripán, ya que en algunas ocasiones fue difícil contar las células usando este método a pesar de ser evidente la presencia de células en el frasco de cultivo.

En la **Figura 10 a-b** se observa la formación de cristales de formazán luego de la tinción con MTT a las 17 horas de siembra para CMMs y fibroblastos. En el pozo con CMMs hay más células redondas, no adheridas por completo a la placa de cultivo (**figura 10 a**), mientras que en el pozo con fibroblastos se observó el total de células completamente adheridas (**figura 10 b**). La **Figura 10 c-d** muestra las curvas de calibración obtenidas para CMMs y fibroblastos en una placa de cultivo de 24 pozos.

No fue posible realizar la curva de crecimiento celular para los primeros días de cultivo contando las células con azul de Tripán ni tampoco mediante el ensayo del MTT, debido al insuficiente número de células CMMs, por lo tanto, se diseñó una cuadrícula de 1mm x 1mm para realizar el conteo directo al microscopio de las células en cultivo a medida que aparecían colonias. Cada colonia se marcaba y día a día se contaba el número de células por colonia. Al final se tomó el promedio de células de las diferentes colonias. Esta metodología solo se llevó a cabo con las muestras 12, 13 y 14 entre el día 0 y 15 (**figura 11 a**) y con las muestras 8 y 9 entre los días 32 y 47 de cultivo (**figura 11 b**) ya que con el resto de muestras se intentó realizar la curva con azul de tripan y con MTT. En los primeros días de cultivo las curvas de crecimiento tuvieron un comportamiento de tipo exponencial, mientras que después del pase 1 las curvas tuvieron un comportamiento logarítmico, con entrada a la fase estacionaria hacia el día 45 de cultivo.

Figura 10 Resultados de los ensayos con MTT.

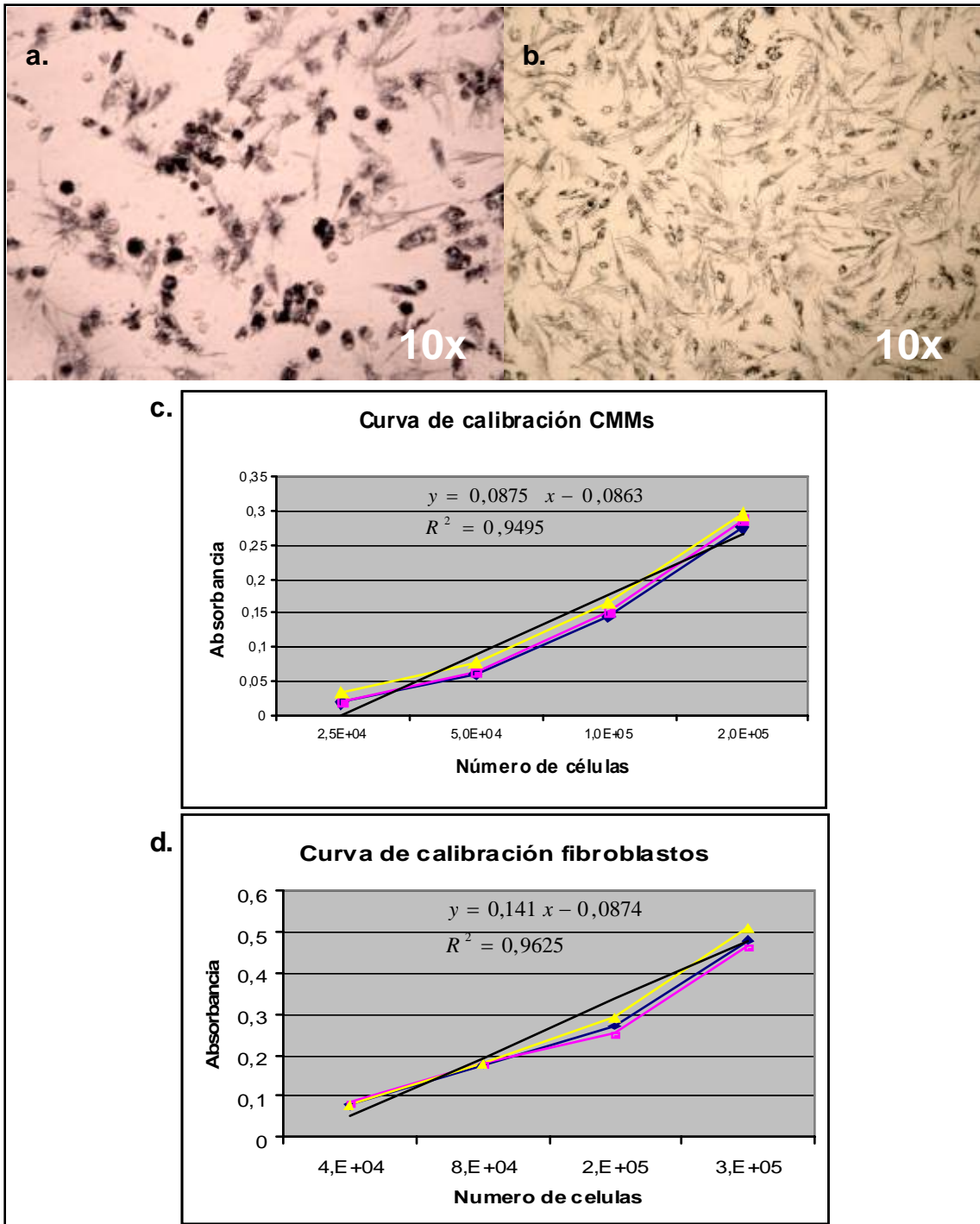


Fig 10: a. Formación de cristales de formazán en CMMs a las 17h de haber sido sembradas. **b.** Formación de cristales de formazán en fibroblastos a las 17h de haber sido sembrados. **c-d.** Curvas de calibración para CMMs y fibroblastos en placa de 24 pozos.

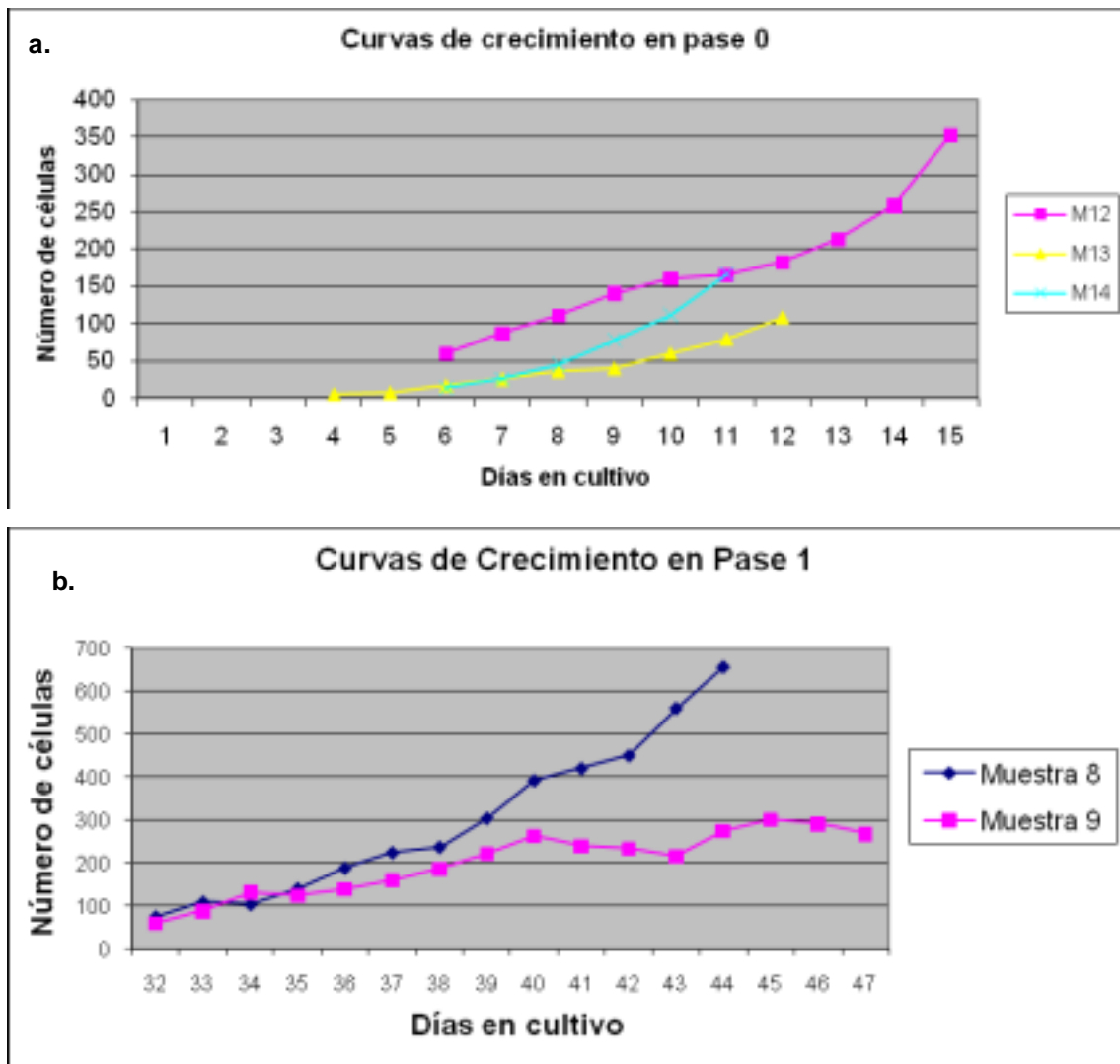


Fig 11. se muestran las diferentes curvas de crecimiento. a. Curvas de crecimiento en el pase 0 entre el día 0 y 15 de cultivo para las muestras 12, 13 y 14. b. Curvas de crecimiento en el pase 1 entre el día 32 y 47 de cultivo para las muestras 8 y 9.

Las tasas de generación celular calculadas pueden verse en la **Tabla 3** y van desde 24 hasta 160 horas, con una mediana de 42 horas, es decir, desde 1 hasta 7 días. En la **Figura 12a** se muestra la TGC comparada con la edad del paciente, después de haber hecho un análisis de correlación de Pearson no se observa una relación

entre estas dos variables. En cambio al analizar la TGC respecto a la densidad celular en el momento de iniciar el cultivo (figura 12b) se determinó que- la densidad celular para obtener la menor TGC fue 4×10^5 células/cm². La TGC antes del primer pase se determinó contando directamente las colonias de un mismo frasco de cultivo, con la ayuda del microscopio invertido y durante varios días sucesivos.

Tabla 3 Tasas de generación celular en las muestras que alcanzaron el pase 2

Muestra	Edad (años)	Coctel de enriquecimiento	N° días hasta la primera confluencia	Tasa de generación celular (días)	Tasa de generación celular (horas)
12-040507	17	NO	19	3,4	81,6
13-310507	15	NO	20	2,2	52,8
14-010607	19	NO	29	1,2	28,8
6-020307	37	NO	14	1,3	31,2
7-020307	13	NO	14	1,01	24,2
7-030307	13	NO	14	0,7	16,8
8-280307	15	NO	28	3,7	88,8
5-280208	25	SI	14	2,71	65
7-020307	13	SI	14	1,05	25,2
9-300307	25	SI	27	6,7	160,8
Media			19,3	2,397	57,52
Mediana			16,5	1,75	42

Tabla 3: Las tasas de generación celular fueron calculadas de acuerdo al número inicial de células sembradas y al número final de células recogidas en el siguiente pase para las muestras que alcanzaron pases superiores al pase 1.

Figura 12: Análisis de las TGC con respecto a la edad de los donantes y a la densidad inicial del cultivo.

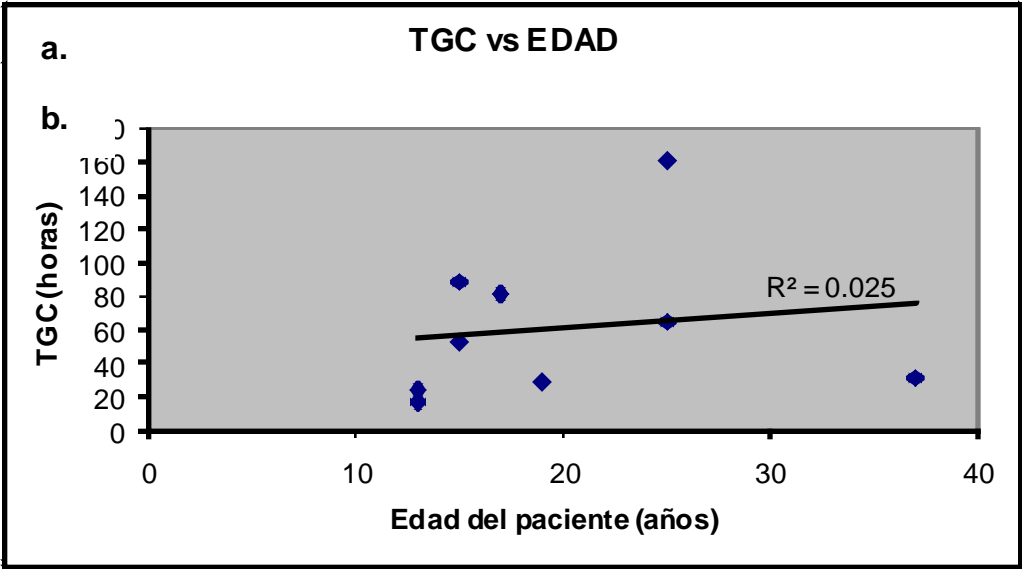


Fig 12. **a.** Tasas de generación celular comparadas con la edad del paciente del cual se tomó la muestra. **b.** Tasa de generación celular comparada con la densidad celular al iniciar el cultivo.

5.5 DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para estudiar la especificidad de expresión de algunos marcadores descritos como característicos de las CMMs, se analizó su expresión en fibroblastos provenientes de un cultivo primario y en la línea celular A375. Una vez se marcaron las células con los anticuerpos correspondientes y se hicieron las mediciones en el citómetro de flujo, los datos fueron analizados con el software Cell QuestPro® de Becton Dickinson. Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea por cada célula son: 1) Dispersión frontal de la luz (forward scatter) de la cual se emite un valor proporcional al tamaño celular, y 2) dispersión ortogonal de la luz (side scatter) de la cual se emite un valor proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad interna de la célula. El análisis de expresión de los antígenos de superficie se hizo seleccionando una población del total de células, según el tamaño y complejidad interna, a esta población se le denominó R1 (**Figura 13a**). La selección de esta ventana se hizo de acuerdo a lo que se conoce de estas células, en artículos previamente reportados (Zhu W et al., 2006; Eipers P et al., 2000). En las figuras **Figuras 13b** se puede observar el porcentaje de células expresando los antígenos de superficie para CMMs CD13, CD44, CD90 y CD105 en fibroblastos y la línea celular A375 y en la **Figura 13c** para CMMs.

Figura 13 Expresión de antígenos de superficie de las CMMs, cultivo primario de fibroblastos y de la línea celular A375.

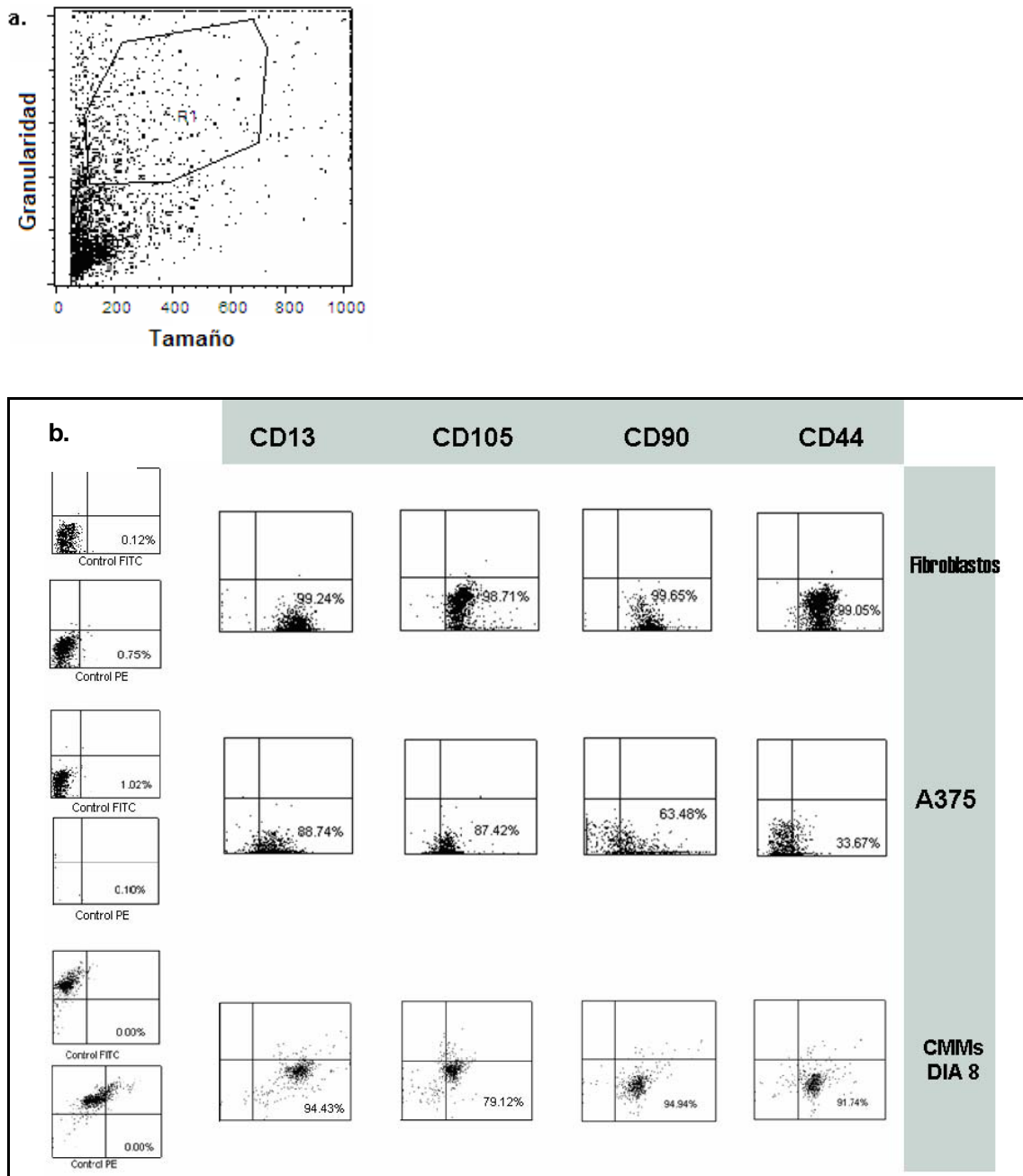


Fig 13: Gráficas obtenidas luego del análisis por citometría de flujo. **a.** Población del total de células escogida teniendo en cuenta tamaño y granularidad R1. **b.** Porcentaje de células que expresan de los marcadores de superficie CD13, CD44, CD90 y CD105 en fibroblastos y la línea celular A375, **b.** y en CMMs.

Figura 14 Cinética de expresión de los marcadores de superficie en CMMs.

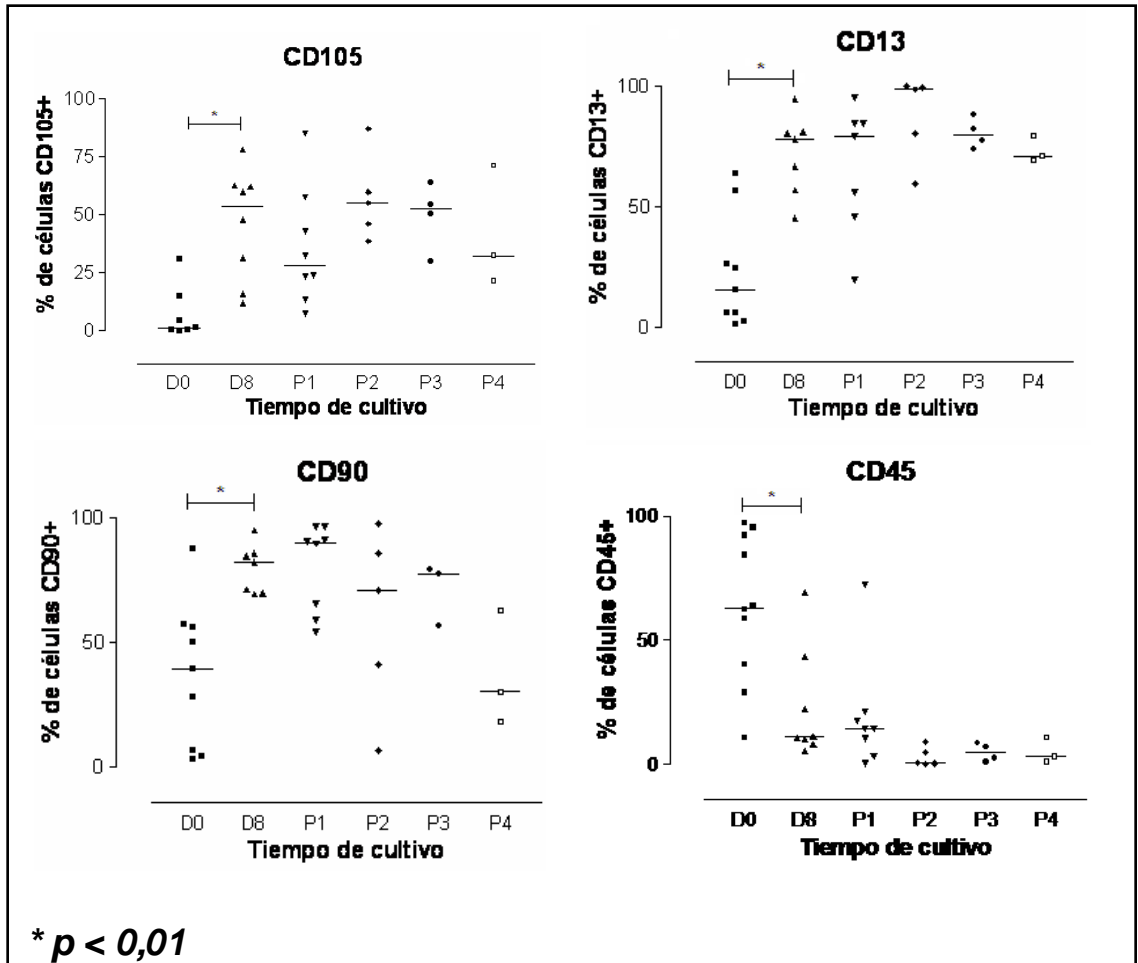


Fig. 14. Se encontró un incremento significativa en el porcentaje de células que expresan CD105, CD13 y CD90 entre el D0 y D8 de cultivo así como una disminución significativa para CD45. No se encontraron diferencias en la expresión de CD44.

Así mismo, en la figura 14 se encuentra el resumen de los resultados obtenidos por citometría de flujo para la expresión de los diferentes marcadores de superficie de las CMMs en los diferentes tiempos de cultivo en los que fueron evaluadas. Se encontró un incremento significativo en el porcentaje de células que expresan CD105, CD13 y CD90 entre el D0 y D8 de cultivo. No se encontraron diferencias en la expresión de CD44.

En la **Figura 15** se observa la cinética de la intensidad media geométrica de fluorescencia (IMGF). La intensidad media geométrica de fluorescencia es un indicativo indirecto de la cantidad de moléculas de interés expresadas en la superficie de una célula. Se puede sugerir que a mayor valor en la IMGF hay un mayor número de moléculas expresadas en la superficie de la célula. Por esa razón se evaluó la intensidad de expresión de CD105, CD13, CD44 y CD90 en los diferentes tiempos de cultivo de las CMMs (rango n=8), encontrando que las CMMs van incrementando la expresión en la membrana de los marcadores CD90 y CD13 iniciando dicho proceso hacia el día 8 de cultivo (medianas 75,070 para CD90 y 180,590 CD13) y llegando a su pico hacia el pase 2 (P2) (2599,390 para CD90 y 1168,550 para CD13). Estos resultados sugieren que las condiciones de epurificación y cultivo *in vitro* de las células permitió obtener principalmente células con fenotipo de CMMs, que para el momento del P2, se encuentran expresando altas cantidades de estos marcadores, cuya meseta de expresión luego del P1 puede sugerir que las mantuvieron su fenotipo y no se dediferenciaron.

Figura 15 Cinética de la Intensidad Media de Fluorescencia.

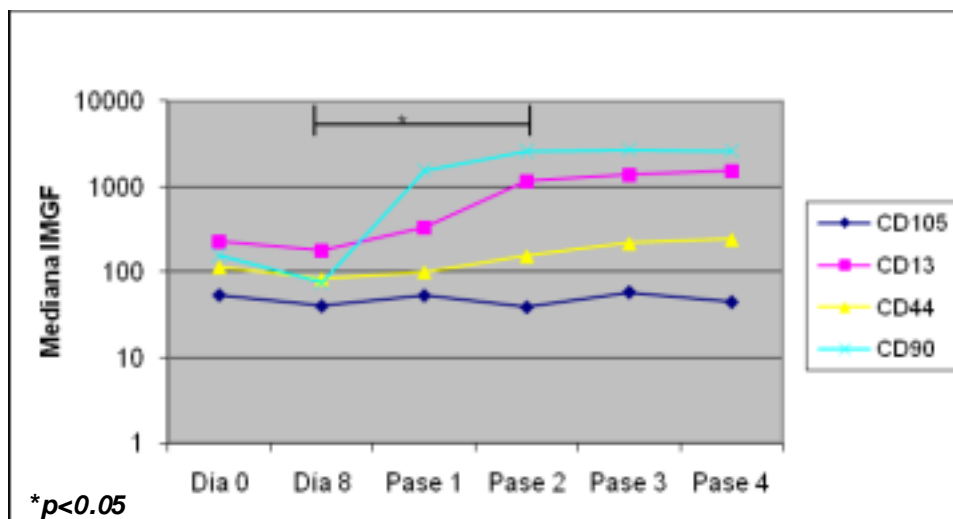


Fig. 15: Se observó un incremento en la expresión en superficie de los marcadores CD90 y CD13 iniciando dicho proceso hacia el D8 de cultivo y llegando a su pico hacia el P1.

Se encontró una correlación entre la expresión de los antígenos CD13 y CD105 para el día 8 de cultivo (**Figura 16a**) a medida que las células se van seleccionando por el cambio de medio, y entre CD90 y CD44 **Figura 16b** en el pase 1 y pase 4 luego de que las CMMS se han purificado.

Figura 16 Co-expresión de antígenos de superficie.

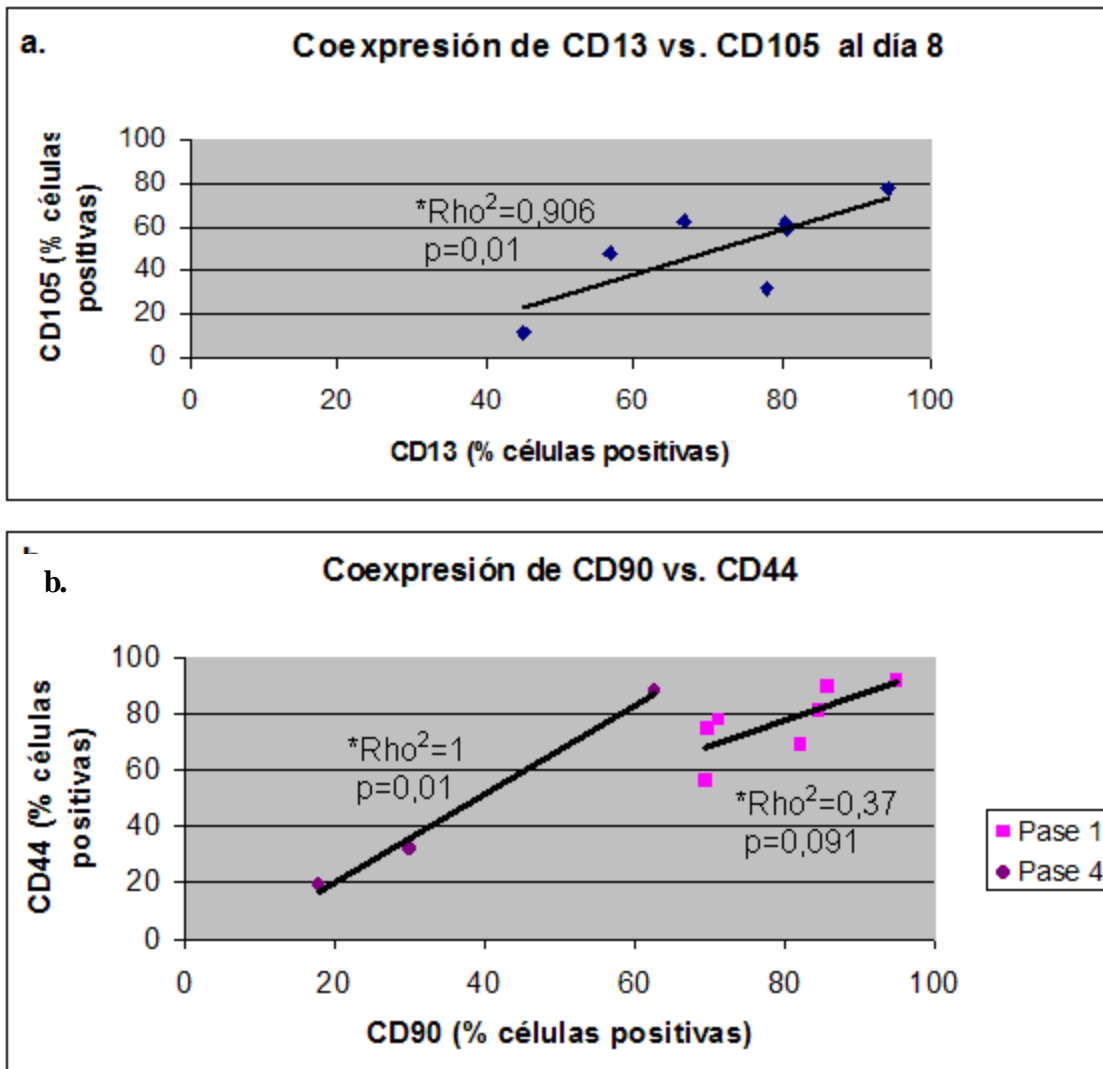


Fig. 16: Se encontró correlación en el porcentaje de células que expresan los antígenos CD105 y CD13 en el día 8 de cultivo (a) y ente CD90 y CD44 en el pase 1 y pase 4 (b)

6. DISCUSIÓN

Las CMMs se describen como células multipotentes por su capacidad para diferenciarse en una variedad de tipos celulares que conforman diversos tejidos. Sin embargo, aun es difícil precisar si hay una verdadera población de células madre, o si la población celular obtenida es una mezcla de varios progenitores específicos de linaje.

La fuente más comúnmente utilizada para la obtención de CMMs es la MO de cresta ilíaca o esternón , sin embargo, también se ha reportado la extracción de CMMs a partir de tejidos mesenquimales de pacientes sometidos a cirugía de rodilla para reconstrucción ligamentaria, mediante aspirados de médula ósea de tibia, o muestras de tejido sinovial, de células del periostio, de tejido adiposo o muscular, obteniendo mejores resultados en términos de expansión y capacidad de diferenciación en células de tejido sinovial, aunque con similares patrones de expresión en la inmunotipificación y la capacidad para formar colonias (Sakaguchi Y et al., 2005).

En el presente estudio, se usaron muestras de médula ósea de metáfisis proximal de tibia debido a que se ha demostrado que esta es una fuente adecuada de CMMs, en comparación con sangre de cordón umbilical y sangre periférica, que permiten el aislamiento de células con morfología fibroblástica que forman una capa homogénea de células adherentes con fenotipo libre de precursores hematopoyéticos y que son capaces de producir UFC granulocito-macrófago, un indicador de la capacidad de reconstituir la hematopoyesis (Wexler S et al., 2002)

Aunque diversas fuentes de obtención han sido utilizadas para la recuperación de CMMs, nuestros hallazgos coinciden con lo reportado por el grupo de Tuli, R et al

2003, que sugieren que la ubicación anatómica de la médula ósea facilita por medio de la circulación presente en el nicho medular, la salida de estas diversas subpoblaciones de CMMs con características de multipotencialidad, a los restos de sitios anatómicos donde estas pueden ser extraídas. Sin embargo, cuando estas CMMs migran a otros tejidos ellas se comprometen con el linaje celular del tejido al que llegan para cumplir con su función de mantenimiento y reparación, comprometiendo y reduciendo cada vez más su potencial. (Tuan R, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003. 5:32-45).

La variación en el volumen y la calidad de la muestra se vio relacionada con la edad del paciente ya que en pacientes más jóvenes se logró obtener una mayor cantidad de muestra con una apariencia menos viscosa al parecer debido a la ausencia de restos de tejido adiposo, los cuales, en muestras de pacientes mayores de 25 años interfirieron con el proceso de separación haciendo más difícil la recuperación de la capa de células mononucleares libres de tejido adiposo y eritrocitos que dificultan la adherencia de las CMMs a la placa de cultivo.

Figura 17 Separación de CMMs de un paciente de 40 años

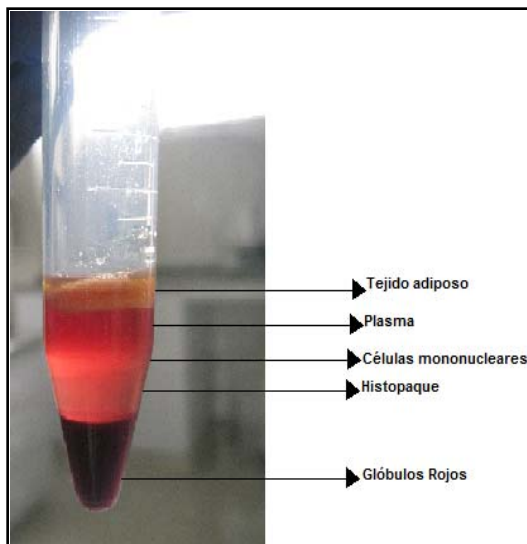


Fig 17. Muestra de MO de un paciente mayor de 40 años. Después de centrifugar la muestra con Histopaque se puede observar la separación de las diferentes capas por densidad celular; en pacientes mayores la médula se reemplaza por tejido adiposo y tejido cortical y la celularidad en la interfase disminuye.

Para el proceso de purificación de las CMMs, pocos reportes se han encontrado en donde se use una combinación de anticuerpos con el fin de hacer selección negativa ya sea usando el mismo cóctel que se usó en el presente estudio para enriquecimiento de CMMs (Shim W et al., 2004; Merino A et al., 2003) o con el uso de otros anticuerpos (Reyes M et al., 2001) para enriquecer la muestra inicial. Contrario a la selección negativa, el uso de anticuerpos específicos como STRO-1 (Gronthos S et al., 1994) o SSEA-4 (Gang E., 2007), es otro método empleado cuando se desean seleccionar poblaciones específicas de CMMs, sin embargo, dada la heterogeneidad de la población celular en cuanto a su patrón de proliferación y diferenciación, se decidió no utilizar un coctel específico sino realizar con el coctel de enriquecimiento RossetteSep.

El uso del cóctel de enriquecimiento resultó en la obtención de 4 veces menos células que cuando no se usó el cóctel, esto debido a que con el cóctel se están eliminando aquellas células que en su superficie expresan los marcadores CD3 de linfocitos T, CD14 de células mieloides, CD19 de linfocitos B, CD38 de precursores hematopoyéticos y CD66b de linaje mielolide, lo cual se vio reflejado durante la caracterización celular en la cual los cultivos obtenidos resultaron libres de células hematopoyéticas. El mayor número de células sembradas al día cero de cultivo, sin el uso del cóctel, probablemente hace que haya un consumo exagerado del medio de cultivo y sus nutrientes, dado que las células hematopoyéticas superan en porcentaje a la minoritaria población de CMMs, haciendo más difícil la selección y adaptación de esta pequeña población celular.

Aunque se ha visto que cultivos de CMMs de diferentes especies usualmente se contaminan con precursores hematopoyéticos, las CMMs humanas son fáciles de expandir y están libres de precursores hematopoyéticos luego de dos o tres pases (Colter D et al., 2000). Esto fue lo que se pudo comprobar en el presente estudio ya que el inmunofenotipo de CMMs fue observado a partir del día 8 de cultivo

indistintamente del uso o no del cóctel de enriquecimiento, y al comparar las TGC de las células sembradas no se observan diferencias significativas cuando el cóctel fue usado o no. Estos resultados sugieren que es posible obtener CMMs con características definidas y con una adecuada capacidad de proliferación, sin necesidad de hacer un enriquecimiento previo al proceso de separación.

En cuanto a la morfología celular de las CMMs se encontró total coincidencia con la reportada previamente en la literatura (Muraglia A et al., 2000; Liu Y et al., 2003). Reportes basados en el uso de citometría de flujo, muestran que cultivos de CMMs con poca actividad proliferativa están constituidos principalmente por una población de células de gran tamaño y de aspecto aplanado, en comparación con cultivos de mayor actividad proliferativa que presentan una morfología ahusada y alargada. Al observar las células fijadas y teñidas con el colorante Giemsa, con la ayuda del microscopio de luz se pudo constatar que las CMMs pertenecen al grupo de células de gran tamaño por superar el de los linfocitos. El citoplasma de las CMMs es agranular, el núcleo es excéntrico, espumoso y heterocromático, además de presentar entre uno a dos nucleolos prominentes (Gronthos S et al., 2003; Merino A et al., 2003), estas características también fueron observadas en las células aisladas para la realización del ensayo de UFC-F.

Aunque las CMMs se seleccionan fácilmente por su capacidad de adherencia a la placa de cultivo, su baja frecuencia hace que se deba sembrar una gran cantidad de células mononucleares. Se ha reportado el inicio de cultivos con un número de células entre 1×10^5 - 2×10^6 células/cm² (Kulterer B et al., 2007; Gang E et al., 2006; Bieback K et al., 2004; Wexler S et al., 2003; Pittenger M et al., 1999) y a partir del primer pase y en los pases sucesivos, la densidad de siembra se disminuye a 3 - 8×10^3 células/cm². (Kulterer B et al., 2007; Gang E et al., 2006; Shim W et al., 2005; Bieback K et al., 2004; Pittenger M et al., 1999).

Para medir la capacidad que tienen las CMMs de formar colonias de tipo fibroblastoide, se estableció la frecuencia de CMMs en el total de células mononucleares y para determinar la densidad celular óptima para el inicio de la expansión celular *in vitro*, se realizaron ensayos de UFC-F (Kulterer B et al., 2007; Sakaguchi Y et al., 2005; Gronthos S et al., 2003; Wexler S., 2002; Sortiropoulou P et al., 2006). El primer grupo en describir el ensayo de UFC-F en CMMs fue el de Castro-Malaspina, quien determinó que la frecuencia de las CMMs en 10^5 células mononucleares era 1-3 (Castro-Malaspina et al., 1980). Estudios más recientes estiman esta frecuencia en 1 en 3.4×10^4 células mononucleares (Wexler S et al., 2002) y 1 en 10^4 - 10^5 células mononucleares (Suva, D., 2004). La frecuencia encontrada en este estudio fue de 0.1-0.2 en 10^5 , un número 10 veces menor al reportado en la literatura pero que está limitado por el hecho de que solamente se realizó el ensayo de UFC-C a dos de las 14 muestras y a que el lugar anatómico de toma de muestra fue diferente al comúnmente usado. Nuestros ensayos fueron con células recuperadas de la metafisis proximal de tibia, y los reportados usaron cresta iliaca, que se cree puedan tener un mayor número de CMMs, aunque aparentemente compartan las mismas características celulares y moleculares. Mediante este ensayo también se pudo observar que se necesita un mínimo de tres células para formar 1 colonia, sin embargo y debido a lo reportado previamente (Jiang Y et al., 2002), queda por establecer la capacidad clonogénica de una sola célula mediante ensayos de diluciones limitantes.

Respecto a la densidad de siembra para iniciar los cultivos, Sakaguchi Y et al., en el 2005 encontraron que con una densidad de 10^4 células/cm² se obtenía un mayor número de colonias y el tamaño de éstas no se veía afectado debido a inhibición por contacto dada por una alta densidad celular. De igual forma, Sotiropoulou P et al., en el 2006 también determinaron que a bajas densidades de siembra como son 5×10^3 - 1×10^4 se obtienen mejores resultados en cuanto al número de células recuperadas en el primer pase, sin embargo, no encontró

correlación aparente entre la densidad inicial de siembra y el potencial de proliferación.

En este trabajo se determinó que la densidad celular óptima para iniciar cultivos de CMMs a partir de aspirados de MO, a la cual se obtiene un mayor número de colonias con una alta actividad proliferativa es de 1×10^6 células/cm². Aunque esta densidad es mucho mayor a la reportada en la literatura, se puede decir que está directamente relacionada con la frecuencia de CMMs encontrada porque, con frecuencias de recurrencia bajas es de esperarse que se necesite un mayor número de células mononucleares al inicio del cultivo para lograr separar y expandir adecuadamente las CMMs. Sin embargo, el dato calculado de la frecuencia probablemente está subestimado con respecto a la frecuencia real ya que de haber solamente 0.1-0.2 células por cada 1×10^5 células sembradas, las posibilidades de encontrar una CMM serían de 1 en 10^6 , por lo tanto la probabilidad de que esta célula pueda expandirse es mucho menor ya que carecería de los estímulos que se generan con la presencia de varias células en un mismo frasco de cultivo, y que son necesarios para inducir la proliferación de células vecinas.

La tasa de generación celular de las CMMs reportadas en la literatura va de 25 a 72 horas aunque presentan gran variabilidad debido a que cada grupo de trabajo difiere en la fuente de obtención de las CMMs y en las condiciones de cultivo (**Tabla 4**). El grupo de Shim W et al., el cual usó condiciones de cultivo que se asemejan a las usadas por nuestro grupo, reportó TGC entre 48-72 horas, las cuales están en concordancia con las encontradas en el presente estudio y que van desde 24 a 160 horas con una mediana de 42 horas. Se puede decir que las condiciones de cultivo como el medio usado (DMEM-LG) y la concentración de SFB (10%) fueron las adecuadas para lograr la expansión de CMMs. Es importante confirmar estos resultados mediante ensayos directos de proliferación

como por ejemplo el marcador CFSE que es incorporado por la célula y que presenta un que mide la proliferación celular por el decaimiento de la fluoresceína a medida que la célula se divide y que puede ser medida por citometría de flujo.

Tabla 4 Comparación de TGC en CMMs con diferentes condiciones de cultivo.

Referencia	Fuente de obtención	Método de separación	Condiciones de cultivo	TGC
Gang E et al., 2007	Médula ósea	Gradiente con Ficoll-Hypaque	α -MEM + 10% SFB, ácido linoleico, albúmina sérica bovina, dexametasona, ácido ascórbico y factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB)	25.2 horas
Shim et al., 2004	Médula ósea de esternón	Coctel RossetteSep	DMEM-LG + 10% SFB	48-72 horas
Suva D et al., 2004	Médula ósea de fémur o cóndilos	Gradiente con Ficoll-Hypaque	IMDM + 10% SFB + PDGF-BB	50 horas
Conget P et al., 1999	Médula ósea de cresta iliaca	Gradiente con Ficoll-Hypaque	α -MEM + 20% SFB	33 horas

Tabla 4. Las TGC encontradas en este estudio van desde 24 a 160 horas con una mediana de 52.8 horas. La tasa de generación celular de las CMMs reportadas en la literatura van de 25 a 72 horas y esta variabilidad se presenta debido a que cada grupo de trabajo difiere en la fuente de obtención de las CMMs y en las condiciones de cultivo. El grupo de Shim W et al., el cual usó condiciones de cultivo que se asemejan a las usadas por nuestro grupo, reportó TGC entre 48-72 horas, las cuales están en concordancia con las encontradas en el presente estudio.

A pesar de que las menores tasas de generación se observaron en los pacientes más jóvenes (13 y 15 años), no se encontró relación entre la TGC y la edad de cada paciente. Esto puede ser explicado porque se sabe que en la médula ósea la población de CMMs es muy heterogénea con respecto a su capacidad proliferativa y de diferenciación. Entonces diferentes muestras de MO contienen diferentes tipos celulares que pueden proliferar a diferentes tasas de generación. Incluso al interior de un mismo cultivo también se ha reportado este tipo de heterogeneidad

y la presencia de células bi- tri- o cuadra-potentes en diferente estado de maduración (Gronthos S et al., 1996).

Al relacionar la TGC con la densidad de siembra se observó que la densidad a la cual se obtuvo una menor TGC, por tanto mayor proliferación fue a 4×10^5 células/cm². Se ha establecido que a bajas densidades de siembra la capacidad proliferativa aumenta (Sakaguchi Y et al., 2005; Colter D et al., 2000) y esto pudo ser comprobado en nuestro estudio. Una posible explicación es que altas densidades celulares se alcanza la confluencia más pronto generando una inhibición por contacto célula-célula y limitando el acceso a los nutrientes que conllevan a una disminución reflejada en las tasas de proliferación.

Mediante la técnica de citometría de flujo fue posible analizar la expresión de los marcadores de superficie CD13, CD44, CD90, CD105, CD45 y CD34 en una población de células seleccionadas de acuerdo a su tamaño y complejidad interna reportados en estudios previos (Zhu W et al., 2006; Eipers P et al., 2000). Las CMMs analizadas se asemejaron en su contenido granular a los basófilos, es decir, mucho más granulares que los linfocitos por ser células inmaduras y su rango de tamaño fue bastante amplio (**Figura 13a**). La población de células pequeñas y agranulares no fue tomada en cuenta por considerarse como células muertas. Colter et al., describen 3 subpoblaciones diferentes de CMMs, identificadas de acuerdo a su tamaño y granularidad. Dos de estas poblaciones son de tamaño pequeño, una agranular y la otra bastante granular, y son descritas como poblaciones transicionales que dan lugar a una población más grande de células medianamente granulares denominadas CMMs maduras (Colter D et al., 2000). Esta última población correspondería a la analizada en este estudio, por ser la población clásicamente descrita (Zhu W et al., 2006; Eipers P et al., 2000). Queda por establecer si se deben considerar en estudios posteriores, las subpoblaciones celulares excluidas en nuestros experimentos, diferenciado por

citometría de flujo células muertas de células transicionales pequeñas y agranulares, mediante tinciones con Ioduro de Propidio.

El inmunofenotipo de las CMMs analizadas en este estudio fue CD34⁻, CD45⁻, CD13⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺, fenotipo típico de CMMs (Kulterer B et al., 2007; Bieback K et al., 2004; Wexler S et al., 2002; Reyes M et al., 2001; Pittenger M et al., 1999) mostrando que la población aislada está libre de células hematopoyéticas. Existen reportes de poblaciones con inmunofenotipo de CMMs pero CD34⁺, sugiriendo la existencia de células madre adultas multipotentes que expresen marcadores hematopoyéticos y mesenquimales de manera simultánea (Shim W et al., 2004).

El incremento significativo de CD13, CD90 y CD105 observado entre el día 0 y 8 de cultivo sugiere que para el día 8 de cultivo la gran mayoría de las células ya tienen fenotipo de CMMs. En la literatura se ha descrito que las CMMs en cultivo alcanzan morfología fibroblastoide hacia el día 3 (Gregory et al., 2005; Liu Y et al., 2003; Muraglia A et al., 2000) tal y como se reporta en el presente estudio. Sin embargo, debido a que no se analizó el fenotipo al día 3 no se supo si además de la morfología, estas células ya están expresando los marcadores de superficie. Estos resultados sugieren además que el día 8 de cultivo resulta óptimo para caracterizar la expresión de marcadores de superficie en la mayoría de las CMMs y que para este día, el cultivo ya está enriquecido en CMMs y no en células madre hematopoyética, puesto que solo cerca de un 5% de las células expresan el marcador CD34 al día 8. Por otro lado no se encontraron diferencias en la expresión de CD44, para las mediciones realizadas en diferentes días de cultivo y aunque se desconoce la razón, se sugiere que este marcador está ampliamente expresado en varios tipos de células incluyendo las CMMs, por lo tanto, al no ser específico de CMMs su expresión se ve desde el principio de los cultivos y se mantiene a lo largo de la expansión celular.

El aumento en la intensidad de fluorescencia que alcanza su pico máximo en el pase 2, sugiere que el cultivo *in vitro* de las células permitió obtener principalmente células con fenotipo de CMMs y que para el momento del pase 2, están expresan altas cantidades de estos marcadores, la meseta en cuanto a su expresión luego del pase 2 sugiere que las células se mantienen estables en cuanto a su fenotipo y no se dediferencian. La homogeneidad en la expresión de marcadores durante el tiempo de expansión de CMMs también ha sido reportada entre el pase 0 y el pase 10, mostrando que las CMMs no alteran sus propiedades físicas ni morfológicas durante la expansión *ex vivo*, y que mantienen un fenotipo indiferenciado durante el cultivo a largo plazo a pesar de observarse una pérdida progresiva en la proliferación y ligeros cambios morfológicos en pases más avanzados (Kulterer B et al., 2007).

La coexpresión de los antígenos CD105 y CD13 en el día 8 y de CD44 y CD90 en los pases 1 y 4 sugiere que cualquiera de los dos puede ser indicador del comportamiento del otro en un momento específico del cultivo. En caso de tener que decidir entre CD105 o CD13, cualquiera de los dos podría ser usado para caracterizar las CMMs antes del primer pase, y después del primer pase se podría utilizar CD44 o CD90. Sin embargo, se debe tener precaución con los resultados obtenidos para el pase 4 pues el tamaño de la muestra fue muy pequeño y es necesario aumentarlo para que los resultados sean más conduyentes.

En este estudio se comparó la expresión de los marcadores de superficie comúnmente usados para CMMs con fibroblastos y una línea celular de melanoma A375. A pesar de que se encontró expresión de los marcadores en CMMs, también se encontró una alta expresión de estos antígenos en fibroblastos y la línea celular A375. En fibroblastos esto podría explicarse porque estas células tienen un posible origen en la médula ósea (Fridenstein A et al., 1970; Ebihara Y

et al., 2006; Ogawa M et al., 2006) y aún conservan la expresión de estos marcadores. En A375 la expresión de estos marcadores puede deberse a que las líneas celulares tumorales están dediferenciads, es decir que pierden las características de su tejido de origen y adquieren características de células más primitivas. Sin embargo, también existe la posibilidad de que los marcadores hasta ahora sugeridos como característicos de CMMs se encuentren expresados en otras células y no sean tan específicos de las CMMs como e pensaba. A pesar de que otros estudios ya han comparado la expresión de dichos marcadores en CMMs y fibroblastos (Ishii M et al., 2005), el origen de los fibroblastos no es el mismo y además la expresión en CMMs no tuvo un seguimiento durante la expansión. Sin embargo, esta es la primera vez que se reporta en la literatura el estudio en simultáneo de la expresión de estos marcadores en CMMs obtenidas de cultivo y una línea celular como A375. Ya que la literatura sugiere el uso de otros marcadores como STRO-1 y SSEA-4 (Gronthos S et al., 2003; Gang E et al., 2007), es importante que en estudios futuros se evalúe su expresión. Asimismo, es de gran importancia que otros estudios permitan caracterizar estas células moleculamente.

7. CONCLUSIONES

Aspirados de médula ósea de la metáfisis proximal de la tibia son una buena fuente para obtener CMMs con morfología y características inmunofenotípicas definidas, debido a la frecuencia de CMMs presente y a la menor invasividad en la toma de la muestra. El volumen inicial de la muestra debe aumentarse, para recuperar mínimo 15 ml.

En pacientes más jóvenes se puede recuperar un mayor volumen en el aspirado de MO y hay menor presencia de tejido adiposo, que interfiera en el proceso de purificación y obtención de las CMMs.

Muestras de pacientes más jóvenes (<25 años) presentan menores TGC que podrían reflejar una mejor capacidad proliferativa.

El uso del coctel de enriquecimiento no mostró ninguna ventaja adicional, en los ensayos realizados, sobre las muestras en las que no se utilizó.

La densidad celular óptima hallada, para iniciar los cultivos fue de 4×10^5 cells/cm², y corresponde a las menores TGC, al mayor número de células recuperadas después del primer pase y a la mayor cantidad de UFC-F y con presencia de colonias de tamaños más grandes.

El aspecto morfológico de las CMMs descrito en la literatura se observó entre el día 3 y 11 después de iniciado el cultivo.

Mediante el ensayo de UFC-F se pudo observar que se necesita un mínimo de tres células para formar 1 colonia, aunque se deben realizar ensayos de clonogenicidad si se quisiera asegurar que una colonia se origine a partir de una sola célula madre mesenquimal.

Los ensayos con MTT para CMMS requieren de un elevado número de células, por lo que no es la prueba ideal para realizar curvas de crecimiento, debido a que no se obtienen suficientes células a partir de una misma muestra.

Las CMMS obtenidas presentaron un inmunofenotipo CD34-, CD45-, CD13+, CD44+, CD90+ y CD105+ , indicando que los cultivos realizados están libres de células hematopoyéticas y que el proceso de purificación y expansión fue exitoso.

La inmunotipificación de las CMMS con los marcadores reportados en la literatura no es específica de estas células ya que en los fibroblastos de cultivos primarios y en la línea celular A375 se detectaron altos porcentajes de células positivas para CD13, CD44, CD90 y CD105, reflejando la necesidad de evaluar otros marcadores con mayor especificidad para CMMS.

El porcentaje de células positivas para CD105, CD13 y CD90 aumenta significativamente a partir del día 8 de cultivo (pase 0), y se mantiene constante hasta el pase 2.

La expresión de los marcadores, evaluada por la intensidad media de fluorescencia tuvo un aumento significativo a partir del pase 2, lo que significa que las células empiezan a expresar una mayor cantidad del marcador en este lapso de tiempo.

La correlación entre el porcentaje de células positivas para CD 105 y CD13 en el día 8 (pase 0) y la correlación entre el porcentaje de células positivas entre CD44 y CD90 en el día 14 (pase 1), muestra que la expresión de un marcador puede ser indicador de la presencia del otro, pudiéndose entonces usar únicamente uno de los dos para pruebas posteriores.

8. RECOMENDACIONES

A pesar que la aproximación usada para la obtención de muestras de MO fue adecuada para el propósito del estudio, se recomienda obtener muestras a partir de pacientes más jóvenes para una expansión celular más exitosa.

Realizar ensayos de proliferación directos que permitan evaluar la asociación entre la TGC con la capacidad proliferativa, por ejemplo usar el fluorocromo CFSE y realizar ensayos de clonogenicidad.

Antes del pase uno es suficiente analizar por citometría de flujo uno de los dos marcadores CD105 o CD13, y después del pase 1 CD44 o CD90.

Realizar ensayos de tinción con yoduro de propidio para verificar que las CMMs no tenidas en cuenta para los análisis de citometria de flujo corresponden a células muertas y no a una subpoblacion celular de menor tamaño y granularidad.

Evaluar otros marcadores (SSEA4, STRO 1 y STRO 3) para inmunotipificación de las CMMs que sean más específicos y usar paralelamente técnicas moleculares para análisis de expresión, como por ejemplo RT-PCR.

Comparar expresión y actividad de la enzima telomerasa para complementar los análisis de capacidad proliferativa de las CMMs.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altman, F.P. (1976). Tetrazolium salts and fomazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9, 1-56.
2. Baksh, D., Song, L., & Tuan, R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 8, 301-316.
3. Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Quarto, R., 2000. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* 28, 707–715.
4. Barbara, N. P., Wrana, J. L., & Letarte, M. (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, 27, 584–594,
5. Baxter, M.A., Wynn, R.F., Jowitt, S.N., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., & Bellantuono, I. (2004). Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells following In Vitro Expansion. *Stem Cells*, 22, 675-682.
6. Castro-Malaspina, G., Gay, R.E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., et al. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 56, 289-301.
7. Cohnheim, J. (1867) ubre Entzündung und Eiterung. *Virchows Arch*, 40, 1-79. Citado por: Strutz, F. (1995). The fibroblast –a (trans-) differentiated cell? *Nephrology, dialysis, transplantation*, 10, 1504-1506.

8. Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M., & Prockop, D.J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS*, *97*, 3213-3218.
9. Conget, P.A., & Minguell, J.J. (1999). Phenotypical and Functional Properties of Human Bone Marrow Mesenchymal Progenitor Cells. *J. Cell. Physiol.* *181*, 67–73.
10. Conget, P.A., & Minguell, J.J. (1999). Phenotypical and Functional Properties of Human Bone Marrow Mesenchymal Progenitor Cells. *Journal of Cellular Physiology*, *181*, 67-73.
11. Dixon, J., Kaklamanis, L., Turley, H., Hickson, I.D., Leek, R.D., Harris, A.L., & Gatter, K.C. (1999). Expression of aminopeptidase-n (CD 13) in normal tissues and malignant neoplasms of epithelial and lymphoid origin. *J Clin Pathol*, *47*, 43-47.
12. Ebihara, Y., Masuya, M., LaRue, A.C., Fleming, P.A., Visconti, R.P., Minamiguchi, H., et al. (2006). Hematopoietic origins of fibroblasts, II: in vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. *Experimental Hematology*, *34*, 219-229.
13. Eipers, P.G., Kale, S., Taichman, R.S., Pipia, G.G., Swords, N.A., Mann, K.G., & Long, M.W. (2000). Bone marrow accessory cells regulate human bone precursor cell development. *Experimental Hematology*, *28*, 815-825.
14. Fonsatti, E., Jekunen, A.P., Kairemo, K.J.A., Coral, S., Snellman, M., Nicotra, M.R., et al. (2000). Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clinical Cancer Research*, *6*, 2037-3043.
15. Freshney, R.I. (2000). Characterization. En: Culture of Animal Cells, a manual of basic technique. (4a. Ed.)(235) EE.UU.: Wiley-Liss.
16. Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S., (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells, *Cell Tissue Kinet*, *3*, 393-403.

17. Friedenstein, A.J. (1961). Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium. *Acta Anat. (Basel)*, 45, 31-59.
18. Fujii, Y., Numata, S., Nakamura, Y., Honda, T., Furukawa, K., Urano, T., et al. (2005). Murine glycosyltransferases responsible for the expression of globo-series glycolipids: cDNA structures, mRNA expression, and distribution of their products. *Glycobiology*, 12, 1257-67.
19. Gang, E.J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C.A., Visser, J.W., & Perlingeiro, C.R. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells. *Blood*, 109, 1743-1751.
20. Gartner, S., & Kaplan, H.S. (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 4756–4759.
21. Gregory, C.A., Prockop, D.J., & Spees, J.L. (2005), Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Experimental Cell Research*. 306, 330-335.
22. Gronthos, S. and Simmons, P. J. (1996). The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *Journal of Hematotherapy*. 5, 15-23.
23. Gronthos, S., Graves, S.E., Ohta, S., Simmons, P.J.. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, 84, 4164– 4173.
24. Gronthos, S., Zannettino, A.C.W., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A., & Simmons, P.J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science*, 116, 1827-1835.
25. Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
26. Isenmann, S., Cakouros, D., Zannettino, A., Shi, S., & Gronthos, S. (2007). hTERT transcription is repressed by Cbfa1 in human mesenchymal stem cell populations. *Journal of bone and mineral research*, 22, 897-906.

27. Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., et al. (2005). Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332, 297-303.
28. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keenel, C.D., Ortiz-Gonzales, X.R., et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow *Nature*, 418, 41-49.
29. Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Sheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K. & Trajanoski, Z. (2007). Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 8, 1471-2164.
30. Lee, J.J., Nam, C.E., Kook, H., Maciejewski, J.P., Kim, Y.K., Chung, I.J., Park, K.S., Lee, I.K., Hwang, T.J., Kim, H.J., 2003. Constitution and telomere dynamics of bone marrow stromal cells in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 32, 947–952.
31. Liu, Y., Song, L.J., Liu, W., Wan, Y., Chen, X., & Hu, C. (2003). Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovascular Research*, 58, 460-468.
32. Minguell, J.J., Erices, A., & Conget, P. (2001). Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med*, 226, 507-520.
33. Muraglia, A., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113, 1161-1166.
34. Nakamura, H., Suenaga, N., Taniwaki, K., Matsuki, H., Yonezawa, K., Fujii, M., Okada, Y., & Seiki, M. (2004). Constitutive and Induced CD44 Shedding by ADAM-Like Proteases and Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase. *Cancer Research*, 64, 876–882.

35. Ogawa, M., La Rue, A.C., & Drake, C.J. (2006). Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: its pathophysiologic implications. *Blood*, *108*, 2893-2896.
36. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., & Marshak, D.R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, *284*, 143-147.
37. Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P.A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*, 33-45.
38. Prockop, D.J. (1997). Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science*, *276*, 71-74.
39. Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., & Verfaillie, C.M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, *98*, 2615-2625.
40. Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L., MacDougald, O.A., 2000. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, *289*, 950-953.
41. Roufosse, C.A., Direkze, N.C., Otto, W.R., & Wright, N.A. (2004). Circulating mesenchymal stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. *36*, 585-597.
42. Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis and Rheumatism*, *52*, 2521-9.
43. Sames, K.S., S. Stolzing, A., 2005. Extending the lifespan. Biotechnical, Gerontological, and Social Problems. Medizin und Gesellschaft, Hamburg. Cited by: Sethe, S., Scutt, A., & Stolzing, A. (2006). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Research Reviews*, *5*, 91-116.

44. Schieker, M., Pautke, C., Reitz, K., Hemraj, I., Neth, P., Mutschler, W., Milz, S., 2004. The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *Journal of Anatomy*, 204, 133–139.
45. Seruya, M., Shah, A., Pedrotty, D., du Laney, T., Melgiri, R., McKee, J.A., Young, H.E., Niklason, L.E., 2004. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant*. 13, 93–101.
46. Sethe, S., Scutt, A., & Stolzing, A. (2006). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Research Reviews*, 5, 91-116.
47. Shim, W.S.N., Jiang, S., Wong, P., Tan, J., Chua, Y.L., Tan, Y.S., Sin, Y.K., Lim, C.H., Chua, T., The, M., Liu, T.C., & Sim, E. (2004). Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 481-488
48. Shim, W.S.N., Jiang, S., Wong, P., Tan, J., Chua, Y.L., Tan, Y.S., Sin, Y.K., Lim, C.H., Chua, T., The, M., Liu, T.C., & Sim, E. (2004). Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 481-488.
49. Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A., & Simmons, P.J. (2003). Mesenchymal Stem Cells. *Archives of Medical Research*, 34, 565-571.
50. Simonsen, J.L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S.I., Jensen, T.G., Kassem, M., 2002. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 592–596.
51. Simmons, P.J., & Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78, 55-62.

52. Slater, T.F., Sawyer, B., & Straüli, U.D. (1963). Studies on succinate tetrazolium reductase systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 77, 383-393.
53. Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Slagianni, M., Baxevanis, C.N., & Papamichail, M. (2006). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24, 462-471.
54. Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Salagianni, M., Baxevanis, C.N., & Papamichail, M. (2006). Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24, 462-471.
55. Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., Kassem, M., 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33, 919–926.
56. Stewart, K., Walsh, S., Screen, J., Jefferiss, C.M., Chainey, J., Jordan, G.R., & Beresford, J.N. (1999). Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14, 1345-1356.
57. Strutz, F., Okada, H., Lo, C.W., Danoff, T., Carone, R.L. Tomaszewski, J.E. et al. (1995). Identification and Characterization of a Fibroblast Marker: FSP1. *The Journal of Cell Biology*, 130, 393-405.
58. Suva, D., Garavaglia, G., Menetrey, J., Chapuis, B., Hoffmeyer, P., Bernheim, L., & Kindler, V. (2004). Non-Hematopoietic Human Bone Marrow Contains Long-Lasting, Pluripotential Mesenchymal Stem Cells. *Journal of cellular physiology*, 198, 110-118.
59. Tani, K., Fumitaka, O., Huang, L., Kawano, T., Tada, H., Hariguchi, N., & Sone, S. (2000). CD13/aminopeptidase N, a Novel Chemoattractant for T Lymphocytes in Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 161, 1636-1642.

60. Wetzel, A., Chavakis, T., Preissner, K.T., Sticherling, M., Hausteiner, U., Anderegg, U., & Saalbach, A. (2004). Human Thy-1 (CD90) on Activated Endothelial Cells Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of Immunology*, *172*, 3850-3859.
61. Wexler, S.A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., & Hows, J.M. (2002). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology*, *121*, 368-374.
62. Yoon, Y.S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J.S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D.H., et al., 2005. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* *115*, 326–338.
63. Young, H.E., & Black, A.C. (2004). Adult Stem Cells. *The anatomical record Part A*, *276A*, 75-102.
64. Zhu, W., Chen, J., Cong, X., Hu, S., & Chen, X. (2006). Hypoxia and Serum Deprivation-Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, *24*, 416-425.