



VALORACIÓN DE ALTERNATIVAS AL USO DE SUERO FETAL BOVINO EN EL CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS

Junio 2015

Trabajo fin de grado

ALUMNO:

GARCÍA TORRALBA, ESMERALDA

6º CURSO DE GRADO EN MEDICINA. GRUPO 1

DIRECTOR:

Dr. LARRAD MUR, LUIS

SERVICIO DE INMUNOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA

Me gustaría agradecer a todos aquellos que, en cierto modo y consciente o inconscientemente, han contribuido a hacer posible este trabajo fin de grado, con una mención especial a:

*El **Dr. Larrad Mur, Luis**, por aceptar el proyecto que ha despertado mi interés en el campo de la investigación.*

*El **Dr. Rubio, Emilio**, por recibirme y orientarme en el análisis estadístico.*

*A **Jara**, por su paciencia, su ánimo y su sonrisa siempre oportuna.*

*A **Paula**, por su perseverancia, templanza y por confiar en mí desde el principio.*

*A todo el **equipo de investigación del Servicio de Inmunología** del H.C.U. Lozano Blesa, por amenizar, sin duda, el lugar de trabajo.*

*A **Sara**, por contrarrestar mi pesimismo hasta en los peores momentos.*

*A **mi familia**, con los que tengo la suerte de contar para todo y por siempre.*

*A **todos mis compañeros**, por tantos años compartidos. Gracias a vosotros todo fue mucho más llevadero.*

*A la **Universidad de Zaragoza**, por la oportunidad.*

Y, con eterno agradecimiento, a aquellos que me apoyan en los momentos de agobio, en los que la irracionalidad gana terreno a la recompensa por el esfuerzo de un trabajo bien hecho.

Abreviaturas empleadas

BSA: Bovine Serum Albumin

CCK-8: Cell counting Kit-8

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ESCs: Células madre embrionarias (Embryonic Stem cells)

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico (basic Fibroblast Growth Eactor)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein IsoThioCyanate)

GMP: Buenas prácticas de fabricación (Good Manufacturing Practices)

HLA: Antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte Antigen)

HSCs: Células madre hematopoyéticas (Hematopoietic Stem Cells)

MSCs: Células madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells)

PBS: Phosphate Buffered Saline

PE: Ficoeritrina (PhycoErythrin)

SAB: Suero AB

SD: Desviación estándar (Standard Deviation)

SFB: Suero fetal bovino

INDICE

RESUMEN.....	1
PALABRAS CLAVE.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Antecedentes	3
1.1. Células madre.....	3
1.2. Clasificación.....	4
1.3. Características	5
1.4. Obtención.....	5
1.5. Aplicaciones.....	7
1.6. Riesgos	8
1.7. Expansión <i>in vitro</i> de las MSCs.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1. Obtención y cultivo celular	13
3.1.1. Materiales de cultivo celular.....	13
3.1.2. Preparación de los medios de cultivo.....	14
3.1.3. Aislamiento de células mesenquimales en cartílago articular.....	14
3.1.4. Mantenimiento y condiciones de cultivo.....	15
3.1.5. Deprivación de suero.....	15
3.1.6. Contaje y estudio de la viabilidad celular.....	16
3.1.7. Determinación de la viabilidad celular por el método de Mosmann...	17
3.2. Técnicas de microscopía.....	18
3.3. Citometría de flujo.....	18
3.3.1. Anticuerpos.....	18
3.3.2. Fenotipado de células mesenquimales derivadas de cartílago articular humano por citometría de flujo.....	20
3.4. Análisis estadístico.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
4.1. Análisis morfológico de MSCs de cartílago en SFB y SAB.....	22
4.2. Estudio de la viabilidad celular mediante la técnica de Mosmann.....	23
4.3. Análisis fenotípico de MSCs de cartílago humano cultivadas en medio enriquecido con SFB y SAB.....	25
4.4. Discusión.....	28
5. CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32

Resumen:

Las células madre mesenquimales (MSCs) suponen, en la actualidad, una importante fuente de recursos en los campos de la terapia celular y la ingeniería de tejidos. Sin embargo, la mayoría de protocolos para su aislamiento y cultivo aún contemplan el suero fetal bovino (SFB) como suplemento del medio, lo que supone un riesgo potencial para las infecciones y reacciones inmunes. Con la finalidad de encontrar sustitutos adecuados al suplemento con SFB, se ha considerado la elaboración de medios químicamente definidos, lo que se ha visto dificultado en gran medida por la riqueza de componentes del SFB. Por este motivo, alternativas humanas que permitan conservar las características celulares y clínicamente relevantes de las MSCs han de ser estudiadas. Este trabajo se presenta con la intención de evaluar el uso de suero humano AB comercial y de un *pool* de plasmas humanos A- como alternativa al empleo de SFB para el cultivo de las MSCs. Para ello, se estudió la viabilidad celular y el inmunofenotipado en los diferentes medios. El crecimiento celular fue menor que en el control de SFB 10% en los medios suplementados con suero AB (SAB) 5%, SAB 10% y *pool* de plasmas humanos, a todos los porcentajes probados. Sin embargo, fue mayor que el control en MSCs con SAB 15% y SAB 20%. No se observaron diferencias significativas en los marcadores de superficie por citometría de flujo entre las células cultivadas con medio suplementado con SFB y SAB humano comercial. Comprobamos que el SAB humano comercial y el *pool* de plasmas humanos pueden ser adecuadas alternativas al empleo con SFB, pero esta afirmación precisa de más estudios a fin de conseguir la mejor alternativa y disminuir todos los riesgos potenciales del SFB.

Palabras clave:

- Células madre mesenquimales - Suero fetal bovino - Suero humano - Plasma humano.

Abstract:

MSCs are currently an important resource in cell therapy and tissue engineering. However, most isolation and expansion protocols for clinical-scale production of MSCs use fetal calf serum as supplement, which poses a potential risk for infections as well as immunological reactions. Chemically defined media production is being considered to find a suitable fetal calf serum substitute, but its development is difficult because of the numerous constituents of fetal calf serum. For this reason, various human blood-derived components have to be investigated. However, these components need to maintain all key cellular and therapy-relevant features of MSCs. In this project, in order to find a suitable fetal calf serum substitute, human commercial AB serum and human A- plasma were studied. We studied cell viability and immunophenotyping for all culture conditions. Cell growth was lower for cells cultured with 5%, 10% commercial serum AB and for these cultured with human A- plasma than the control with 10% fetal calf serum. It was higher than the control for cells with 15% and 20% human commercial AB serum. Besides, important differences in surface markers between MSCs in culture with fetal calf serum or human commercial AB serum were not noticed. We showed that human commercial AB serum and human A-plasma can be good alternatives to fetal calf serum for cartilage-MSCs culture, but more studies are needed to find the best alternative and to remove all fetal calf serum's risks.

Keywords:

- Mesenchymal stem cells - Fetal calf serum - Human serum - Human plasma.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Pocos tipos celulares han conseguido cautivar a tantos investigadores biomédicos en los últimos diez años como lo han hecho las células madre mesenquimales (Ranera, 2012). Pubmed, en 2015, identifica más de 34.000 referencias de “mesenchymal stem cells” y más de 22.000 para “mesenchymal stromal cells”.

Las primeras referencias sobre la existencia de células madre en el organismo, a finales de los años 50, se basan en los experimentos realizados con células madre hematopoyéticas (HSCs) (McCulloch y Till, 1960), pero la capacidad de regeneración de los tejidos ya era conocida con anterioridad. De hecho, hace ya más de 50 años que se emplea la terapia celular, concretamente el trasplante de HSCs, para el tratamiento de inmunodeficiencias, afecciones sanguíneas malignas y ciertos tumores sólidos (Alegre, 2010).

En los últimos veinte años, un impulso notable de este campo dio lugar a la llamada medicina regenerativa, manifestando el potencial terapéutico de las células madre adultas. Aunque inicialmente el interés terapéutico de las MSCs parecía focalizarse en el aprovechamiento de su capacidad de diferenciación para la regeneración de los tejidos y órganos, ahora también se están valorando como potentes moduladores de microambientes en tejidos asociados a enfermedades (Matthew *et al*, 2013).

1.2. Células madre

Las células madre son células progenitoras no especializadas que habitan en nichos en varios órganos y tejidos, pudiendo ser reclutadas para reemplazar células de tejido específicas que han muerto. Actúan como un sistema de reparación, pudiendo dividirse de manera ilimitada durante la vida del individuo o del animal. Poseen dos características fundamentales: en primer lugar, están dotadas de capacidad de auto-renovación mediante división celular; en segundo lugar, bajo condiciones específicas, pueden originar células hijas que se convertirán finalmente por diferenciación en tipos celulares especializados con funciones biológicas únicas, además de poder implantarse tanto en tejidos dañados como en tejidos sanos (Rosenthal, 2003; Körbling y Estrov,

2003; Daley *et al.*, 2003). Hallar en cualquier zona del cuerpo una célula progenitora no diferenciada, con capacidad para diferenciarse hacia células especializadas de tejidos y órganos, supone disponer del almacén ideal de material necesario para reemplazar y reparar tejidos.

1.3. Clasificación

Existen diversos tipos de células madre:

A) Si atendemos a su potencial de diferenciación, pueden clasificarse fundamentalmente en: totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales.

Las células madre totipotenciales son aquéllas con potencial para originar un individuo completo, pudiendo producir tanto tejido embrionario como tejido extra-embrionario (placenta). Se considera que sólo los estadios iniciales del cigoto constituirían dicho grupo (Verfaillie *et al.*, 2002).

Las células madre pluripotenciales son capaces de diferenciarse a tejidos de cualquiera de las tres capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo, incluyendo las células germinales, pero no tienen capacidad para originar un organismo completo, pues carecen del trofoblasto que daría lugar a la placenta. Las células que proceden de la masa celular interna del blastocisto serían células pluripotentes.

Las células madre multipotenciales pueden diferenciarse hacia distintos tipos celulares de la misma capa embrionaria de la que derivan. Clásicamente, se consideraba a las células madre adultas como células multipotentes, pero algunos de estos tipos, como las células madre hematopoyéticas, son capaces de diferenciar a tejidos procedentes de las tres capas embrionarias (Jiang *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2002).

Además de las anteriores, existen células oligopotentes, que dan lugar a uno o a unos pocos tipos de células, y células unipotentes, que son aquéllas que únicamente pueden diferenciar a un tipo celular (Verfaillie *et al.*, 2002).

B) Desde el punto de vista de su origen, las células madre se clasifican en células madre embrionarias (ESCs), que derivan del embrión, bien del blastocisto o de la cresta gonadal. Son capaces de proliferar indefinidamente, pero presentan limitaciones desde el punto de vista ético. Además, su uso a nivel terapéutico queda restringido por la posible formación de teratomas o teratocarcinomas, consecuencia de su alta tasa de proliferación. Las células madre adultas o somáticas, cuya capacidad de proliferación y diferenciación es más limitada que la de las ESCs, parecen entonces una alternativa más segura y prometedora en el campo de la medicina regenerativa (Alegre, 2010). Un tipo de células madre adultas son las MSCs, núcleo de este trabajo fin de grado.

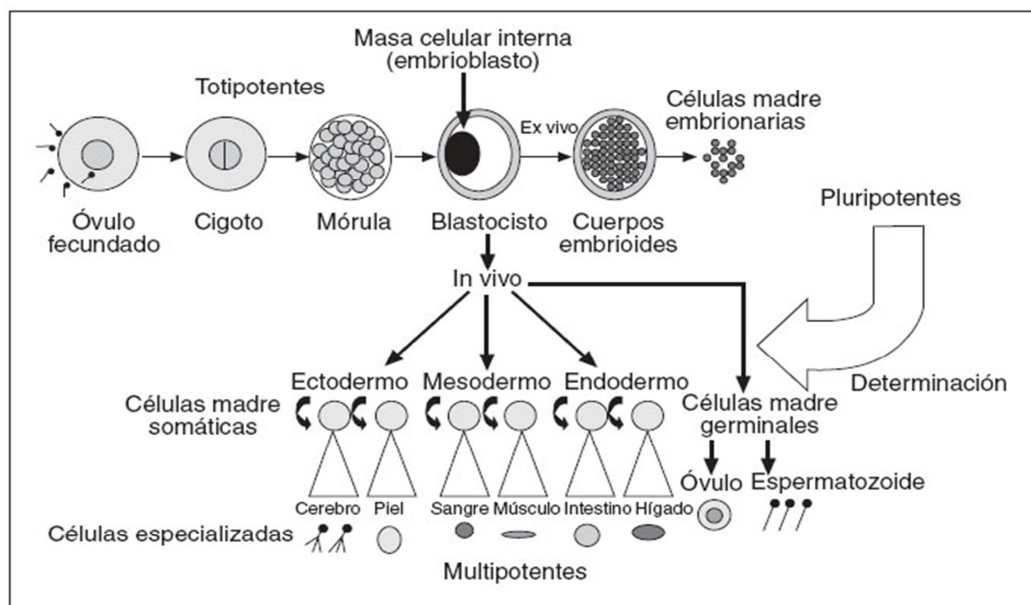


Fig. 1. Embriogénesis humana: potencial y grado de diferenciación. (Bonora-Centelles, A. et al, 2008).

1.4. Características

Las MSCs fueron las primeras células no hematopoyéticas que se aislaron de médula ósea. Se han aislado de varias especies, incluyendo humano, ratón, oveja o perro, entre otras. Representan entre un 2 y un 3% del número total de células mononucleares en médula ósea y pueden ser aisladas y expandidas, durante varios pases de cultivo, sin perder la capacidad para diferenciarse. Son células multipotentes, que adquieren una morfología fibroblástica cuando se ponen en cultivo y se

caracterizan por su capacidad de adhesión durante el cultivo en monocapa. Se debe tener en cuenta que las colonias de MSCs aisladas por adherencia al plástico posiblemente contienen otros tipos celulares, por lo que, se considera, lo único que puede cerciorar que un subconjunto aislado de células adherentes a la placa de cultivo derivadas de médula ósea son verdaderamente MSCs es que las células aisladas demuestran diferenciarse a múltiples linajes celulares (Alhadlaq *et al*, 2004).

Este hecho, sumado a la inexistencia de un marcador de superficie exclusivo para su identificación positiva entre los tipos celulares de médula ósea, lleva a que sea difícil definir las MSCs. Por este motivo, la Sociedad Internacional de Terapia Celular definió en 2006 una serie de estándares que las células aisladas de médula ósea humanas deben cumplir para que puedan ser denominadas MSCs:

1. Capacidad de adherencia al plástico del material de cultivo.
2. Expresión de ciertos marcadores de superficie: más de un 95% de las células en cultivo deben mostrar en su superficie las moléculas CD105 (endoglina), CD73 (SH2 y SH3) Y CD 90 (Thy-1); y menos de un 2% de las mismas deben ser positivas en la detección de CD45 (antígeno común de leucocitos), CD34 (marcador de células precursoras de células hematopoyéticas), CD14 ó CD 11b y CD79 α ó CD 19 ó HLA-DR.
3. Multipotencialidad de diferenciación a osteoblasto, adipocito y condrocito.

Además de los marcadores anteriores, las MSCs expresan niveles intermedios-bajos del antígeno leucocitario humano-I (HLA-I) e insignificantes niveles de HLA-II en su superficie. Tampoco expresan moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 o CD86 (Dominici *et al*, 2006).

Igualmente, las MSCs inhiben la maduración de las células dendríticas, presentadoras de antígenos a las células T (Nauta *et al*, 2006), así como, la proliferación, producción de citoquinas y actividad citotóxica de las células NK y reducen el potencial proinflamatorio de los neutrófilos (Spaggiari *et al*, 2006; Raffaghello *et al*, 2008). De otro lado, las MSCs inhiben la proliferación y producción de citoquinas de las células T, y la citotoxicidad mediada por células TCD8+ contra células

alogénicas, células infectadas por virus y células tumorales (Di Nicola *et al*, 2002, Morandi *et al*, 2008, Prigione *et al*, 2009; Rasmusson *et al*, 2007, Delarosa *et al*, 2009; Gonzalez *et al*, 2009; Gonzalez-Rey *et al*, 2009; Jorgensen *et al*, 2003).

Las propiedades de baja inmunogenicidad y capacidad inmunosupresora hacen de las MSCs células “inmunológicamente privilegiadas” y las convierten en candidatas ideales para el desarrollo de terapias celulares frente a enfermedades autoinmunes o inflamatorias. Esto sugiere la posibilidad de obtener células de distintos donantes, expandirlas *in vitro* y congelarlas para su uso cuando sea necesario.

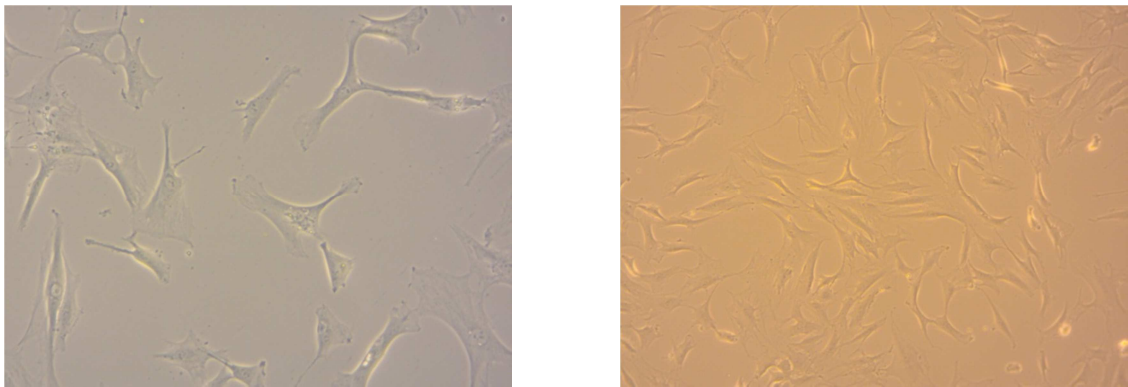


Fig. 2 y 3. Morfología fibroblástica característica de las MSCs en cultivo.

1.5. Obtención

Las células mesenquimales, además de obtenerse de médula ósea, pueden aislarse de otros tejidos adultos como tejido adiposo, sangre periférica, cordón umbilical y líquido sinovial. Derivan del mesodermo y, por tanto, son capaces de diferenciar *in vitro* hacia tejidos mesodérmicos como hueso o cartílago, músculo, tejido adiposo y otros tejidos conectivos, pero se ha comprobado que tienen el potencial para diferenciarse además en otros tipos de células como células hepáticas, renales, cardíacas y células neurales. Por lo tanto, los términos descriptivos “pluripotente” o “multipotente” son usados mutuamente para describir la capacidad de las MSCs para diferenciarse en un amplio rango de tejidos de mamíferos (Alhadlaq *et al*, 2004). Asimismo, han demostrado propiedades de angiogénesis, antifibróticas (Matthew *et al*, 2013) y de revascularización de nuevos tejidos formados.

1.6. Aplicaciones

Entre las aplicaciones con las que se han relacionado y dada su capacidad de diferenciación hacia células de linaje osteocondral, las MSCs pueden tener utilidad en enfermedades osteoarticulares como la artrosis o la artritis reumatoide, donde la regeneración del cartílago es clave y cuyo interés fundamental reside en un actual aumento de la prevalencia de forma paralela al incremento de la edad de la población en el mundo desarrollado. En la diferenciación hacia otros linajes celulares, se está estudiando su futuro en el tratamiento de patologías de base inmune, neurológicas, cardiovasculares, gastrointestinales y hematológicas, cuya investigación se ha visto potenciada en los últimos años (Simone, 2014). De todo ello extraemos que las MSCs constituyen actualmente una importante fuente que motiva estudios en los campos de la terapia celular y la ingeniería de tejidos.

El uso de MSCs como agentes inmunosupresores en enfermedades autoinmunes se ha probado con éxito en modelos animales (Bartholomew *et al.*, 2001). Debido a la escasez de estas células, en lo que a cantidad y calidad se refiere, asociado con la edad o enfermedades, se considera la posibilidad del uso de MSCs alogénicas. Además en estos casos, las células mesenquimales derivadas del propio paciente también pueden crear inconvenientes, ya que tendrán la misma carga genética (Alegre, 2010).

1.7. Riesgos

Debido a su elevada complejidad y a su potencial de diferenciación, a sus propiedades inmunosupresoras, la producción de múltiples factores de crecimiento y citoquinas (Simone, 2014) y a su posible inmortalización o transformación durante el cultivo a largo tiempo, el uso de las células mesenquimales, además de numerosas ventajas, también podría reportar algunos riesgos. Así, por ejemplo, la diferenciación hacia tejidos no deseados o la transformación que podría ocurrir cuando las células permanecen mucho tiempo en cultivo (4-5 meses), pudiendo ayudar al desarrollo *in vivo* de tumores. Esto se evita cuando las células se mantienen en cultivo durante

períodos más cortos (6-8 semanas). Es importante, para minimizar los riesgos, usar modelos animales previamente al implante en humanos.

La terapia basada en MSCs se enfrenta actualmente a una fase difícil tras la finalización de muchos ensayos preclínicos y clínicos. Varios ensayos informaron de beneficios moderados, no duraderos, lo que provocó una caída del entusiasmo inicial y señalaron la urgente necesidad de optimizar la eficacia del tratamiento con MSCs. El éxito futuro de la terapia basada en estas células radica en la optimización racional de estrategias terapéuticas, junto con una evaluación adecuada de los factores de riesgo y beneficio (Simone, 2014).

También, las diferencias entre las poblaciones de MSCs derivadas de diferentes tejidos son cada vez más evidentes, presentando un desafío adicional para la elaboración de una definición universal. Las MSCs tal y como se definen en la actualidad son un fenómeno de cultivo *in vitro*, lo que sugiere que la extrapolación de la función de estas células a la actividad *in vivo* debe hacerse con precaución por las razones anteriormente señaladas. Esta limitación destaca la necesidad de estudios directos *in vivo* con MSCs endógenas o una población equivalente fisiológicamente como un paso esencial para el establecimiento de su verdadero papel biológico. Es alentador a este respecto que los estudios recientes han empleado modelos de animales transgénicos para permitir el seguimiento y la evaluación de células MSCs *in vivo*. Los mecanismos subyacentes a la regeneración de tejidos y la modulación inmune con dosis terapéuticas de MSCs también requieren una aclaración adicional, en particular en la medida en que los dos procesos se cruzan. La apreciación más reciente de que las MSCs pueden no mediar en la regeneración de tejidos mediante el reemplazo celular directo también es probable que redirija la investigación en direcciones más fructíferas.

Por último, en vista del potencial clínico extraordinario de las MSCs, una reevaluación del enfoque para el desarrollo de protocolos clínicos basados en confirmaciones de laboratorio y observaciones preclínicas sería oportuna y útil (Armand, 2012).

1.8. Expansión *in vitro* de las MSCs

Una desventaja de la utilización de MSCs con fines clínicos es que se producen en poca cantidad en el tejido de origen, lo que obliga al uso de protocolos de expansión *in vitro* con el fin de lograr un número significativo de células que sean viables para trasplante. Lo ideal sería, por tanto, la expansión *in vitro* de MSCs que lograra una cantidad de células clínicamente relevantes de acuerdo a la guía de buenas prácticas de fabricación (GMP). Actualmente, la falta de estandarización y desarmonía de los protocolos parece impedir el rápido progreso de esta fase transicional. Además, la mayoría de protocolos de aislamiento y expansión emplean aún SFB como complemento de medio, el cual supone una fuente potencial para infecciones y reacciones inmunes; situación que reclama unas condiciones de cultivo xenogénicamente libres. Los medios definidos químicamente son el último logro en términos de estandarización. A pesar de ello, estos medios necesitan preservar todas las características celulares y clínicamente relevantes de las MSCs, lo que implica una composición en factores esenciales óptima por los numerosos constituyentes del SFB, y que condiciona que su desarrollo se esté sólo iniciando. Mientras tanto, varios componentes derivados de sangre humana están siendo investigados, incluyendo plasma, suero humano, suero derivado de sangre de cordón umbilical y derivados de plaquetas (Asli *et al*, 2007; Sven and Karen, 2012). En este contexto, conviene diferenciar los términos de plasma y suero, siendo el plasma la solución líquida y acelular de la sangre, y el suero, el equivalente al plasma sanguíneo, pero sin las proteínas involucradas en la coagulación (fibrinógeno en su mayor parte).

Entre las limitaciones del cultivo con SFB encontramos el que se trata de una mezcla de aproximadamente 1.000 moléculas biológicas, incluyendo factores de crecimiento, hormonas, proteínas y vitaminas, con multitud de componentes aún desconocidos. Su función más destacada es la de proporcionar factores de crecimiento y hormonas, transportadores de proteínas, factores de unión y extensión, aminoácidos y vitaminas, ácidos grasos, inhibidores de proteasas, detoxificación y presión osmótica a los cultivos celulares, lo cual dificulta en gran medida la creación de medios definidos químicamente que consigan la estandarización. Además, la calidad y las

concentraciones de los factores estimulantes e inhibidores del crecimiento varían entre los lotes de SFB, lo que justifica pruebas de optimización entre lotes.

Por tanto, las MSCs cultivadas en un medio alternativo al suplementado con SFB han de ser ampliamente investigadas para verificar que ningún biomarcador y especialmente ninguna característica clínicamente relevante se vea modificada.

Con la finalidad de encontrar un sustituto humano adecuado al empleo de SFB, se presenta este trabajo fin de grado, en el que la comparación entre medio de cultivo suplementado con SFB, suero AB humano o *pool* de plasmas humanos agrupados por grupos sanguíneos A- constituirán la base de tal hipótesis. Para la realización del trabajo experimental y como alternativa al SFB se ha empleado suero alogénico humano comercial del grupo AB, así como, un *pool* de plasmas humanos A-. Generalmente, se emplea suero alogénico humano procedente de donantes AB para evitar la presencia de isoaglutininas, a pesar de que las MSCs no parecen expresar antígenos del grupo ABO. El número de publicaciones referentes al uso de plasma para el cultivo de MSCs es limitada, quizá porque el suero coagulado (que contiene factores liberados de la activación de plaquetas) es mucho más efectivo que el plasma en la promoción de la proliferación celular (Sven and Karen, 2012).

2. OBJETIVOS

El trabajo experimental se ha llevado a cabo en el laboratorio del servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Para su elaboración se han empleado MSCs procedentes de una muestra de cartílago humano.

Los objetivos fueron:

- Aprendizaje del manejo de material de laboratorio, medidas de asepsia y trabajo en condiciones de esterilidad, así como mantenimiento y cultivo de MSCs con fines experimentales.
- Estudiar las diferencias en la expresión de marcadores de superficie de MSCs humanas de cartílago y su viabilidad, según el medio de cultivo.
- Manejo de técnicas de microscopía e imagen.
- Evaluación en la búsqueda de alternativas humanas al empleo de SFB para el cultivo de MSCs mediante la suplementación del medio de cultivo con SFB, SAB comercial y plasma humano.
- Interpretación y análisis estadístico de los resultados.
- Búsqueda de recursos en bases científicas y metodología para la correcta elaboración de informes experimentales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención y cultivo celular

3.1.1. Materiales de cultivo celular

La muestra de cartílago que hizo posible la recolección de las MSCs procedía de un varón de 77 años intervenido por el Servicio de Traumatología del propio hospital para una artroplastia de rodilla motivada por una artrosis. El paciente había sido informado de tal procedimiento existiendo copia del consecuente consentimiento. La muestra fue transportada al laboratorio en frascos estériles que contenían PBS (Phosphate Buffered Saline). El peso inicial de la muestra fue de 3.5 g.

El desarrollo de los cultivos se realizó en frascos de cultivo de 25 cm² (T25) y 75 cm² (T75) (*BD Falcon*) con tapón de rosca con filtro, utilizando unos volúmenes finales de medio de 6 ml y 12 ml, respectivamente. El resto del material de plástico estéril, tubos para centrifugación, placas de cultivo y pipetas se obtuvieron de *BD Falcon* y *TPP*. Los tubos para centrifugación en minifuga fueron de *Eppendorf* y los sistemas de filtración para la esterilización de soluciones, fueron de *Millipore*.

Para el mantenimiento de los cultivos celulares se empleó el siguiente medio de cultivo:

- α -MEM GlutaMAX medium (*GIBCO*).
- 1% (v/v) de antibióticos (100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml estreptomicina, *Sigma-Aldrich*).
- 0.1% (v/v) de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, 1 μ g/ml, *Sigma-Aldrich*).

Suplementado con:

- 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, *Biochrom AG*) ó
- 2,5%, 5% ó 10% (v/v) de suero humano AB comercial (*Human serum type AB (male), SIGMA*) ó

- 2,5%, 5% ó 10% (v/v) de un *pool* de cinco plasmas humanos agrupados por grupo sanguíneo A- que contenía 2UI/ml de heparina sódica 1% (*Hospira Prod. Farm y Hosp, S.L*), procedentes de donantes sanos del Banco de Sangre y Tejidos.

3.1.2. Preparación de los medios de cultivo

Previo descongelación de las alícuotas, se añadieron las cantidades necesarias de SFB, SAB, *pool* de plasmas A-, antibióticos y bFGF al volumen correspondiente de medio α -MEM GlutaMAX (una vez atemperado), y se pasó todo ello por un sistema de filtrado de 0.22 micras de poro conectado a una bomba de vacío. Este paso tiene la finalidad de esterilizar, intentando eliminar posibles microorganismos y partículas no deseadas.

3.1.3. Aislamiento de células mesenquimales en cartílago articular

El protocolo que se llevó a cabo en el momento del aislamiento se inició con el cálculo del peso de la muestra recibida que posteriormente se trasvasó a una placa de Petri de 10 cm con un pequeño volumen de PBS. Se consiguió separar la muestra del hueso y fragmentarla con bisturí del nº 23, trasvasando a un falcon de 50 ml el tejido limpio. Se volvió a pesar la muestra una vez eliminados componentes del tejido conectivo y otros que no eran de nuestro interés. Para la digestión enzimática, se añadió solución Colagenasa A (2 ng/ml) (*Roche Diagnostics*) preparada en medio de cultivo + 2% BSA (Bovine Serum Albumin), en una proporción de 10 ml Colagenasa A por 3 g de tejido, manteniendo en baño a 37°C con agitación (120 rpm), overnight. Después de 12-18 horas, se añadió el mismo volumen de medio MSC + SFB 10% (v/v) para neutralizar la colagenasa y se procedió a filtrar la muestra, primero con un filtro de nylon de 100 μ m y, después, con uno de 40 μ m, pasando la muestra a un falcon de 15 ml. Para retirar el SFB, se centrifugó la muestra a 1800 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de medio sin suero. De nuevo, centrifugación a 1600 rpm durante 10 minutos y descarte del sobrenadante. Por último, se resuspendió el pellet en 1 ml de medio sin suero y se procedió a realizar el conteo celular en cámara de Neubauer (*Apartado 3.1.6. de Material y métodos*). La

densidad de sembrado a pase 0 fue de 10^4 células/cm², en un frasco de cultivo de 25 cm² (T25).

3.1.4. Mantenimiento y condiciones de cultivo

Las células se cultivaron en un incubador (Binder) a 37°C y atmósfera húmeda de 5% de CO₂. A las 24 horas de haber sido sembradas tras el aislamiento, se cambió el medio de cultivo para descartar las células no adheridas. A partir de aquí, el medio se renovó cada 3 ó 4 días. Cuando el cultivo, a pase 0, alcanzó una confluencia aproximada del 80% (en nuestro caso, unos diez días), las células se soltaron del T25 mediante tripsinización para proceder a su posterior expansión. A tal fin, se desechó el medio de cultivo completo, las células se lavaron dos veces con PBS, retirando los restos mediante pipeta para evitar la dilución de la tripsina, y se añadió 500 µl de solución de tripsina al 0,25%, 1mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*Sigma-Aldrich*). Se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se bloqueó la tripsina con medio completo (4 veces el volumen añadido de la solución de tripsina) para neutralizar la acción enzimática. A continuación, toda la muestra se transfirió a tubos de fondo cónico y se centrifugaron a 1200 rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml del medio de cultivo correspondiente.

La viabilidad celular se valoró a través del método del azul Trypan, que se describe en el *apartado 3.1.6. de Material y métodos*. Finalmente, las células fueron sembradas a una densidad de sembrado de 2000 células/cm² en el pase 2 y de 4000 células/cm² en los restantes. Durante el proceso de expansión, se determinó que la frecuencia de la renovación del medio de cultivo debía ser de dos veces por semana.

3.1.5. Deprivación de suero

Las MSCs se cultivan rutinariamente en medio suplementado con 10% de SFB. Con el objetivo de cambiar el medio de cultivo de las células de uno de los frascos y de una de las placas de 96 pocillos al medio con suero comercial AB se procedió primero a su deprivación. Este método consistió en, una vez alcanzada una confluencia óptima, retirar el medio completo, realizar dos lavados con PBS y añadir 6 ml de medio sin suero de ningún tipo, para a las 48 horas (período de tiempo en el que las células

consumen los restos de SFB que pudiera haber) proceder a la tripsinización y expansión ya en medio suplementado con el correspondiente suero (o plasma, en su caso).

3.1.6. Contaje y estudio de la viabilidad celular

Para establecer la viabilidad celular, en el momento del aislamiento y después de cada pase, se empleó el método del azul Trypan. La base de este método es que el azul Trypan es un colorante no permeable cuando la membrana celular se haya intacta, considerando a estas células como células vivas. En cambio, es capaz de penetrar en células muertas en las cuales la integridad de membrana está alterada, por lo que, estas células muertas, al microscopio óptico, mostrarán una coloración azulada.

El contaje celular se llevó a cabo en un hemocitómetro (cámara Neubauer). Este método, además de determinar la viabilidad celular, tiene la fundamental aplicación de permitirnos conocer el volumen exacto de células de las que disponemos en nuestra solución obtenida a lo largo de todos los pasos anteriores y, así, permitirnos sembrar a la densidad celular que necesitemos de forma bastante exacta para su expansión. El proceso consistió en tomar una alícuota de la suspensión celular, previa homogenización, diluyéndola en el mismo volumen (solución 1:2 ó 50 μ l:50 μ l) de una solución de Trypan Blue al 0,4% (*Sigma*) en un tubo *ependorf*. Para evaluar la viabilidad celular se consideró el número células vivas respecto del número total de células, siendo en todos los casos superior al 95%.

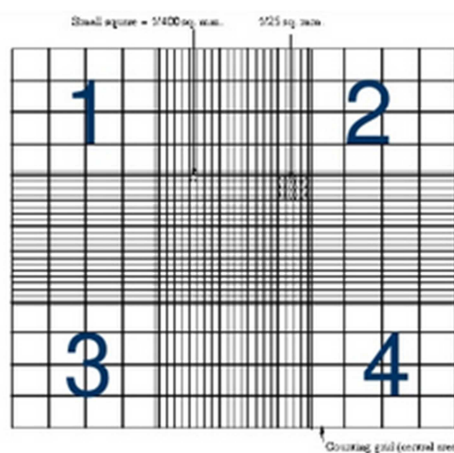


Fig. 4. Contaje celular en los cuatro cuadrantes de las esquinas del hemocitómetro.

A continuación, se adjunta explicación para el cálculo de la densidad. En primer lugar, aplicamos la fórmula para el cálculo de la densidad:

$$\text{densidad} = \text{número de células/volumen (ml)}$$

de donde, el número de células será la suma de todas las células contadas en los cuatro cuadrantes, y el volumen será el volumen total de los cuadrados contados. Cada lado de un cuadrante mide 0.1 cm, por lo que, el área contada = $0.1 \text{ cm} \times 0.1 \text{ cm} = 0.01 \text{ cm}^2$. La profundidad de la cámara de Neubauer es 0.1 mm = 0.01 cm, por lo que el volumen de un cuadrante será: $0.01 \text{ cm}^2 \times 0.01 \text{ cm} = 0.0001 \text{ cm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$.

De lo cual, se deduce que:

$$\text{densidad celular} = \text{células contadas} \times 1 \times 10^4 \text{ ml} \times \text{dilución/nº de cuadrantes contados} = \text{células/ml}$$

Como solemos contar los cuatro cuadrantes (contamos hasta un mínimo de 100 células) y el factor de dilución es 2:

$$\text{densidad} = \text{células contadas} \times \frac{1}{4} \times 2 \times 10^4$$

3.1.7. Determinación de la viabilidad celular por el método de Mosmann

Se utilizó el método Mosmann para determinar la viabilidad celular de los cultivos con los tres medios diferentes, a saber, medio con SFB, suero humano comercial AB y *pool* de plasmas humanos A-, a las distintas concentraciones.

Para ello, se sembraron las MSCs en una placa de 96 pocillos (*Falcon*), a una densidad de 4000 células/ cm^2 , con un volumen de medio de 150 μl /pocillo. Previamente se prepararon las distintas suspensiones celulares con los diferentes medios, haciendo los cálculos necesarios para que al dispensar 150 μl de cada suspensión se añadiera el número de células que nos interesaba por pocillo.

El medio se fue renovando hasta lograr una adecuada confluencia de las mismas. Conseguida la misma, se añadieron 8 μl de colorante CCK-8. Se sembraron los correspondientes blancos (pocillos sin células) para cada tipo de medio. Las MSCs cultivadas con 10% SFB se utilizaron como control.

Tras 4 horas de incubación a 39°C, se homogeneizaron las placas en un agitador de placas (*Orbital mini, Ovan*) a 70 rpm durante 10 minutos. Para finalizar, se midió la absorbancia a 450 nm empleando un lector de microplacas (*Las, srl A3*).

3.2. Técnicas de microscopía

Para la visualización de las muestras se utilizaron los microscopios invertidos DMIL (*Leica*) y Primo Vert (*Zeiss*) del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, ubicados en el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. La toma de fotografías de los cultivos se llevó a cabo en este último microscopio, que lleva una cámara AxioCam ERc 5s incorporada, para lo que se utilizó el programa ZEN 2012 SP1.

Para el conteo de células en cámara de Neubauer mediante la técnica anteriormente descrita (*Apartado 3.1.6. de Material y métodos*) se empleó el microscopio óptico (*West Germany, Zeiss*) disponible en el mismo servicio.

3.3. Citometría de flujo

El fenotipado de las células se realizó por citometría de flujo utilizando anticuerpos contra distintos marcadores de membrana marcados con fluorocromos con el fin de identificar y caracterizar las células.

3.3.1 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados estaban marcados, indistintamente, con los fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE). Sus características se recogen en la Tabla 1:

Antígeno	Distribución	Función	Referencia	Concentración (Dilución)
CD13	Células mieloides	Procesamiento antigénico	BD Pharmigen (555394)	5 µl (1/10)
CD 31	Monocitos, plaquetas, granulocitos, células endoteliales	Receptor de CD 38, adhesión	BD Pharmigen (555445)	5 µl (1/10)
CD 34	Precusores hematopoyéticos, endotelio vascular	Adhesión, se une a CD62-L, marcador de células madre	Beckman coulter (IM1870)	5 µl (1/10)
CD 36	Adipocitos, plaquetas, monocitos, células endoteliales, líneas de células tumorales humanas	Receptor de proteínas de la ECM, adhesión, fagocitosis	BD Pharmigen (555454)	4 µl (1/12,5)
CD 44	Células hematopoyéticas y no hematopoyéticas excepto plaquetas, hepatocitos	Receptor del ácido hialurónico, adhesión	Beckman coulter (IM1219)	5 µl (1/10)
CD 73	Subpoblaciones de linfocitos T y B, células epiteliales y endoteliales, MSCs	Co-estimulación de linfocitos T, adhesión linfocitos a endotelio, ecto 5' nucleotidasa	BD Pharmigen (550257)	4 µl (1/12,5)
CD 90	Células humanas de hígado fetal, de cordón umbilical, de médula ósea, neuronas	Diferenciación de HSCs y neuronas, adhesión, transducción de señales	BD Pharmigen (555595)	12 µg/ml
CD 105	Células endoteliales, subpoblaciones de médula ósea	Adhesión, respuesta celular a TGF-β1, angiogénesis embrionaria	Beckman coulter (A07414)	5 µl (1/10)
CD 133	Subpoblaciones de HSCs, células epiteliales y endoteliales	Desconocida	MACS (130-080-801)	3 µl (1/16.6)
CD 166	Células hematopoyéticas, endoteliales, fibroblastos, MSCs de médula ósea	Adhesión	Beckman coulter (A22361)	4 µl (1/12.5)
HLA-DR	APC, linfocitos T activados, células B	Presentación de péptidos a los linfocitos CD4+	BD Pharmigen (555561)	5 µl (1/10)

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

3.3.2 Fenotipado de células mesenquimales derivadas de cartílago articular humano por citometría de flujo

Los cultivos en medio con SFB y SAB, al alcanzar una confluencia celular del 80-90%, se sometieron a tripsinización (*apartado 3.1.5 de Materiales y Métodos*) y se recogieron las células, que posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm durante 7 minutos. Previo descarte del sobrenadante, se preparó una suspensión celular de 210.000 células (30.000 células por cada pareja de anticuerpos que vamos a utilizar, 7 en total) en 400 µl de PBS-EDTA 2 mM. Las suspensiones se incubaron con 8 µl de bloqueante (*Purified Rat Anti-mouse CD16/CD 32 (Mouse BDFc Block, BD Pharmigen)*). Éste tiene la finalidad de bloquear receptores inespecíficos de la membrana, durante 5 minutos a 4°C. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 50 µl de la suspensión celular bien resuspendida al volumen correspondiente de anticuerpos marcados (Ver Tabla 2) previamente dispensado en tubos de citometría de flujo (*BD Falcon*). Se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos y seguidamente, las células se diluyeron con PBS-EDTA 2mM hasta un volumen final de 400 µl.

Finalmente, se analizó la expresión de estos marcadores en MSCs, utilizando el citómetro de flujo Epics- XL (*Beckman*). Para el tratamiento de los datos se utilizó el programa Expo 32 ADC, definiendo la población celular en base a los parámetros de tamaño y complejidad.

En la Tabla 2, se recoge el volumen utilizado de los distintos anticuerpos:

Antígenos		Volumen
No marcados		0 µl
CD 90	FITC	6 µl
CD 13	PE	
CD 34	FITC	8 µl
CD 166	PE	
CD 44	FITC	8 µl
CD 133	PE	
CD 31	FITC	8 µl
CD 105	PE	
CD 36	FITC	7 µl
CD 73	PE	
HLA-DR	PE	5 µl

Tabla 2. Volúmenes de los diferentes anticuerpos empleados en citometría de flujo.

3.4. Análisis estadístico

En el proceso de recogida de datos y su posterior evaluación gráfica se empleó el programa Microsoft Excel versión 2010.

Hipótesis

Para facilitar la comparación y dado que son datos repetitivos, a fin de controlar las diferencias, supondríamos que los datos siguen distribuciones normales.

En la valoración de los resultados obtenidos a través de la técnica de Mosmann, dispondríamos de la media y de la desviación estándar como estadísticos. Se emplearía el test ANOVA de análisis multivariante, en caso de que más de dos medias fueran en apariencia muy distantes. Si sólo dos medias son las que aparentemente precisan de comparación, consideraríamos innecesario aplicar ANOVA y emplearíamos el test de de la t Student para datos independientes, relacionando dichas medias. Previamente recurriríamos a la distribución F de Snedecor para el contraste de varianzas.

En el fenotipado por citometría también se ha utilizado la media y la desviación estándar, al igual que en la técnica anterior, pero sólo consideraríamos el análisis con tests estadísticos en caso de que los resultados obtenidos impresionasen de no característicos.

En cualquier caso, un valor $p < 0,05$ sería considerado estadísticamente significativo.

Tras la hipótesis inicial, finalmente, por el volumen de datos obtenido debido a la limitación temporal y previo acuerdo con los especialistas en bioestadística, se decide que los datos son insuficientes para alcanzar una significación estadística representativa, por lo que, nos limitaremos al análisis a través de Excel de los resultados obtenidos, utilizando la media y las desviaciones estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha descrito desde el inicio de este trabajo, el objetivo fundamental ha sido la evaluación de las alternativas de SAB comercial y *pool* de plasmas humanos A- al empleo de SFB como suplementos del medio para el cultivo de MSCs derivadas de cartílago humano.

Por tanto, con dicha finalidad se procedió al análisis de la viabilidad mediante conteo celular y método Mosmann, así como a su caracterización fenotípica por citometría de flujo una vez alcanzada una adecuada confluencia celular tras varios pases de cultivo, según se describe en los correspondientes apartados de *Material y métodos*.

4.1. Análisis morfológico de MSCs de cartílago en SFB y SAB

Las células mesenquimales derivadas de cartílago, en los medios de cultivo suplementados con SFB, SAB y *pool* de plasmas humanos A-, fueron visualizados por microscopía invertida, como se describe en el *apartado 3.2 de Materiales y Métodos*. La morfología celular fue fibroblástica, similar en los tres medios de cultivo empleados, sin diferencias morfológicas apreciables (Figuras 5 y 6).

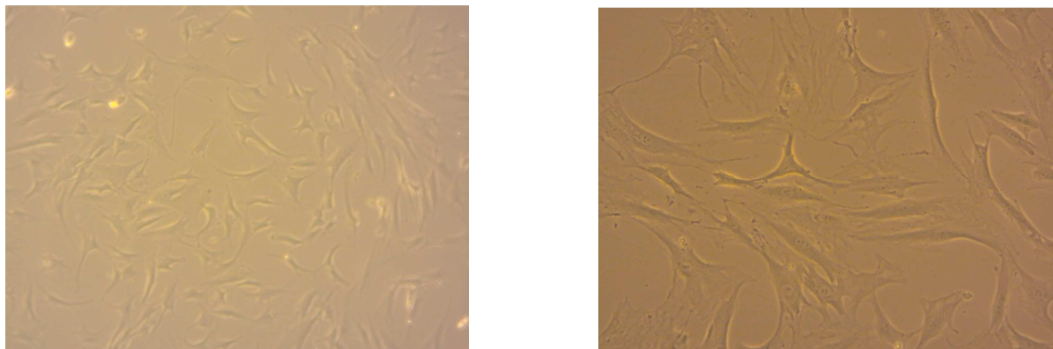


Fig. 5 y 6. MSCs cultivadas en medio suplementado con SFB (*Fig. 5*) y SAB (*Fig. 6*). Visión en microscopio invertido. Las imágenes se realizaron por microscopía de contraste de fases usando el objetivo de 10 x y 20 x, respectivamente, en un microscopio invertido.

4.2. Estudio de la viabilidad celular mediante la técnica de Mosmann

La técnica se realizó dos veces con el objetivo de comparar los tres medios de cultivo. En la primera, se sembraron cuatro columnas de ocho repeticiones (pocillos) en una placa de 96 pocillos. La primera columna contenía MSCs en SFB al 10%, la segunda células mesenquimales suplementadas con SAB 10% y, la tercera y cuarta se consideraron blancos de las dos primeras, según se puede comprobar en las imágenes 7 y 8.

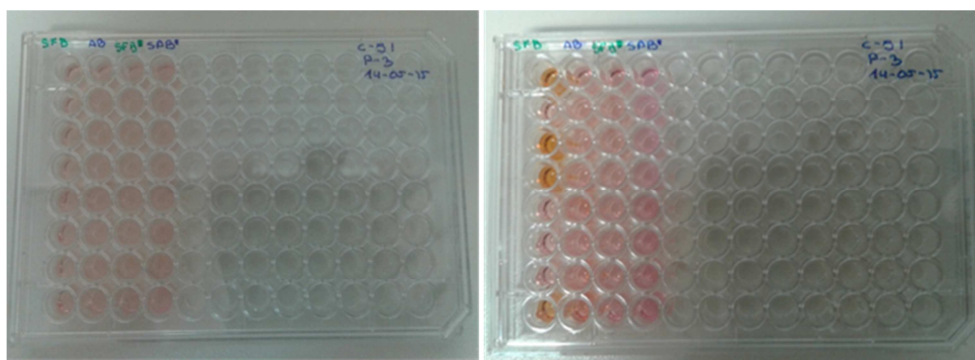


Fig. 7 y 8. Viraje en la coloración de los pocillos tras añadir CCK-8 e incubación (Medios de las columnas por orden: SFB, SAB, Blanco SFB, blanco SAB).

El medio suplementado con SFB al 10% se empleó como control. Las células cultivadas en medio SAB humano comercial presentaron un crecimiento seis veces menor que el control, tal y como se refleja en la Figura 9:

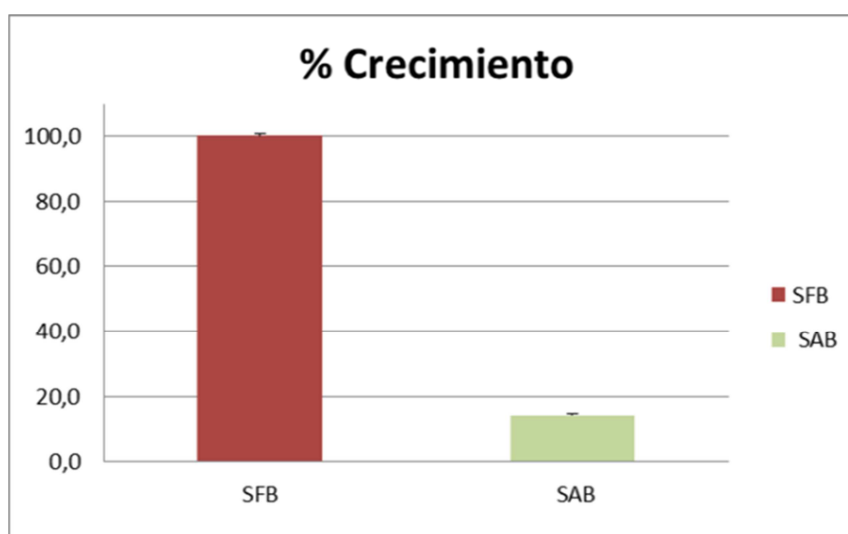


Fig. 9. Viabilidad celular por el método Mosmann en cultivos de MSCs enriquecidos con SFB y SAB. Empleo del SFB como control.

En el segundo experimento, se incluyeron los tres medios de cultivo a distintas concentraciones, junto a una fila de medio sin suero. También se sembraron por columnas de ocho repeticiones. Para ello, se tripsinizó un cultivo con medio suplementado con 10% de SFB, resuspendiendo las células en medio sin suero. Se realizó un conteo con azul Trypan y se sembró la cantidad adecuada de células en cada pocillo, procediéndose a su deprivación durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el medio sin suero, que se reemplazó con el mismo volumen del medio correspondiente. La distribución de la placa fue la siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	SFB 10%	MEDIO SIN SUERO	SUERO AB 5%	SUERO AB 10%	SUERO AB 15%	SUERO AB 20%	PLASMA A- 5%	PLASMA A- 10%	PLASMA A- 15%	PLASMA- 20%	BLANCOS		A
B													B
C													C
D													D
E													E
F													F
G													G
H													H

Tabla 3. Distribución de los medios de cultivo en la placa de 96 pocillos para método Mosmann.

En este caso, y empleando de nuevo el medio suplementado con SFB 10% como control, se comprobó un crecimiento menor de las células suplementadas con SAB al 5% y 10%, de 0,5 y de 0,25 veces menor, respectivamente. En cambio, las células mesenquimales de los medios cultivados con proporciones del 15% y 20% de SAB crecieron en mayor medida que el control, 1,6 y 2,1 veces más, respectivamente.

En cuanto a las MSCs cultivadas en medio suplementado con plasma, el crecimiento fue menor, no superando al del control a ninguna de las concentraciones. Según las mismas de 5%, 10%, 15% el crecimiento fue de la mitad respecto al medio con SFB, en sentido creciente. En cambio, las células en medio enriquecido con 20% de

plasma A- sufrieron un ligero descenso del crecimiento, lo que puede explicarse por un fenómeno de saturación.

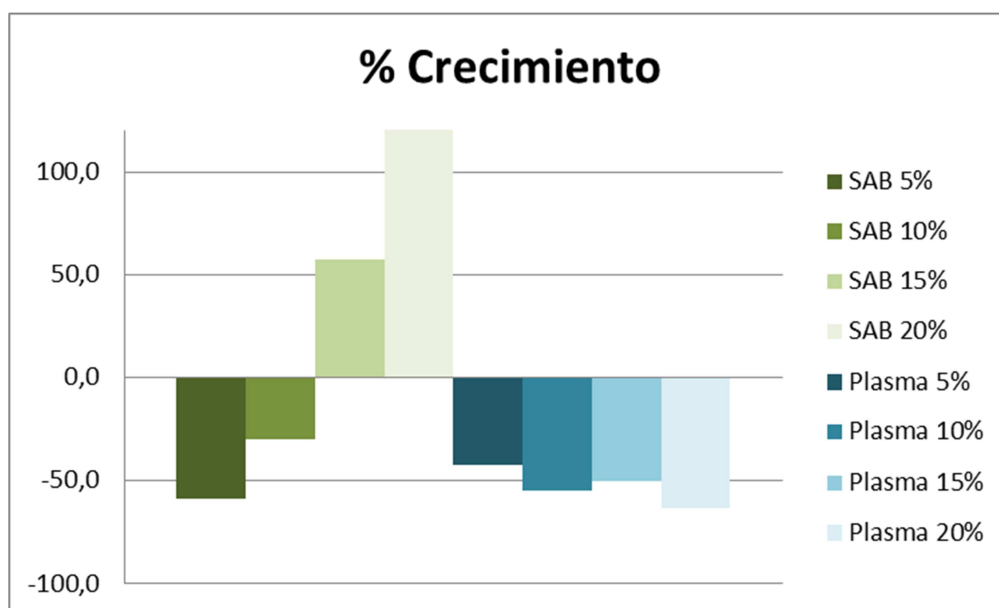


Fig. 10. Crecimiento de los medios suplementados con diferentes concentraciones de SAB y plasma respecto al control de SFB 10%.

4.3. Análisis fenotípico de MSCs de cartílago humano cultivadas en medio enriquecido con SFB y SAB

Para el fenotipado celular por citometría de flujo se emplearon células en pase 4 de cultivo en medio con SFB y pase 3 en el cultivo con SAB, debido a su menor velocidad de crecimiento.

Las células cultivadas en medio suplementado con SFB analizadas fueron negativas para el marcador hematopoyético CD34, así como las MSCs derivadas de cartílago en medio con SAB (2,66%).

Asimismo, las células mesenquimales en medio con SFB y SAB fueron negativas para CD31 (PECAM-1) y CD36 (glicoproteína IV), marcadores de células endoteliales y de adipocitos, respectivamente.

En el caso de CD133, otro marcador hematopoyético, su expresión fue inexistente para las células cultivadas en ambos medios.

Si nos fijamos en HLA-DR (MHC-II), su expresión fue nula en células con SFB (0.1%), igualmente en células que contenían SAB como suplemento del medio de cultivo (0,33%).

El porcentaje de células que expresaron CD13 (aminopeptidasa N), CD44 (*Homing-associated Cell Adhesion Molecule*, receptor del ácido hialurónico), CD90 (antígeno de diferenciación de timocitos-1) y CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados) detectado fue mayor del 95% en todos los casos y para ambos cultivos. Los porcentajes fueron similares para cada marcador en ambos cultivos.

CD73 (SH3/4) se expresó en un 99,90% y un 99,96%, respectivamente, en los cultivos enriquecidos con SFB y SAB.

La expresión de CD105 (endoglina, SH2) fue elevada en MSCs humanas derivadas de cartílago. En el caso del medio con SFB, fue de 98,46% y de 98,99 en medio suplementado con SAB.

Los resultados de la expresión de los distintos marcadores, analizados por citometría de flujo, se encuentran recogidos en la Figura 11.

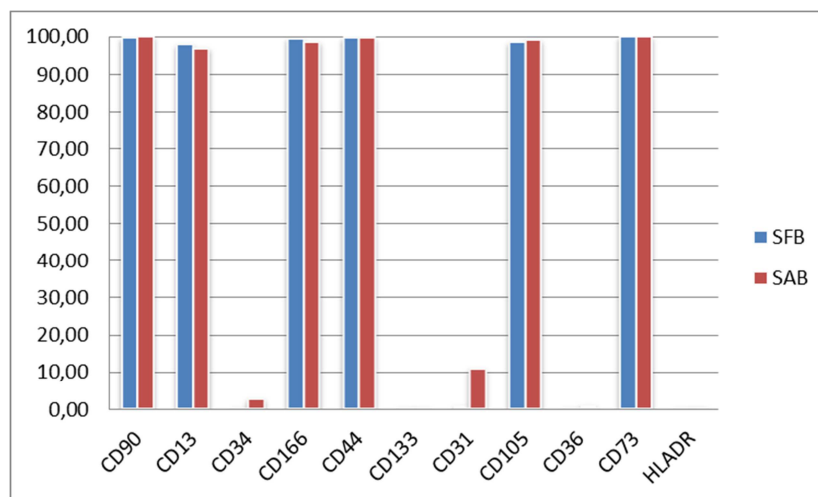


Fig. 11. Fenotipo de MSCs derivadas de cartílago cultivadas en medio suplementado con SFB y SAB, respectivamente.

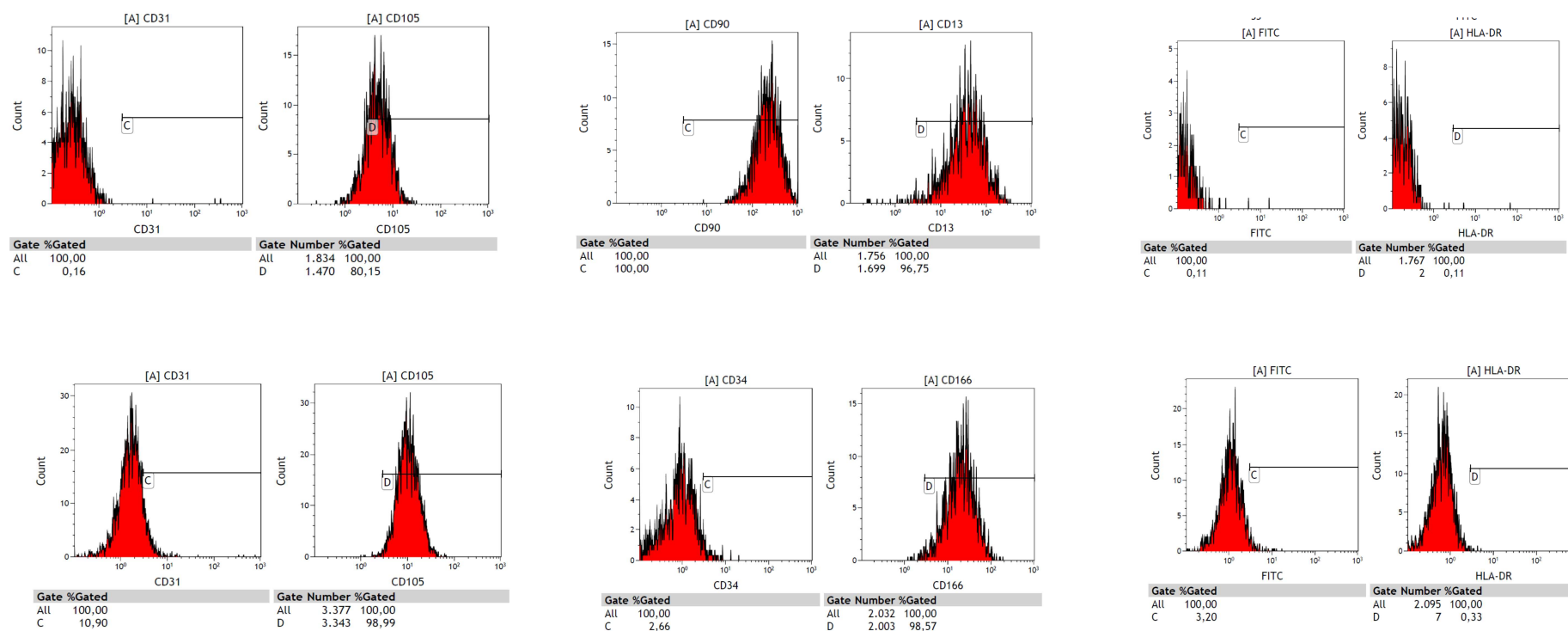


Fig. 12. Selección de histogramas de citometría de flujo, en las que se recoge la expresión de marcadores de membrana en MSCs cultivadas con SFB (columna 1) y SAB (columna 2).

4.4. Discusión

Las células cultivadas en los medios suplementados con SFB, SAB y *pool* de plasmas humanos A-, fueron aisladas en todos los casos con Colagenasa A a partir de la muestra de cartílago. En general, las células cultivadas en medio enriquecido con SFB proliferaron más rápido que las cultivadas con SAB y *pool* de plasmas humanos, con un tiempo entre un pase y el siguiente de 9-10 días, en el primer caso. Las células suplementadas con SAB lograron una confluencia del 80-85% en 14-15 días. Por este motivo, se optó por un primer sembrado de todas las células que se emplearon para los experimentos en medio enriquecido con SFB y posterior privación de suero. Kocaoemer *et al* encontraron una tasa de proliferación mayor en MSCs derivadas de tejido adiposo cultivadas en suero AB humano en comparación con las suplementadas con SFB. La diferencia en la procedencia de las MSCs y el suplemento con suero humano no comercial hacen difícil establecer una comparación entre estos resultados y los de nuestro estudio (Asli *et al*, 2007).

En el estudio de la viabilidad celular se encontraron diferencias en el crecimiento entre los distintos medios, así como, en función de las concentraciones de los mismos. Empleando como control en ambos experimentos realizados el SFB al 10%, se observó un menor crecimiento de las MSCs cultivadas en SAB a las concentraciones de 5% y 10%, obteniéndose en cambio un mayor crecimiento de las mismas cuando se cultivaban en medios con 15% y 20% de SAB.

En cuanto al análisis de la viabilidad de las MSCs en medio de cultivo enriquecido con plasma A-, se vio que la tasa de crecimiento de las mismas respecto al control fue menor, aunque en sentido ascendente según la concentración. La excepción la constituyó el plasma A- a la concentración de 20%, ya que, experimentó un descenso del porcentaje de crecimiento respecto a las concentraciones menores del mismo. Esto puede deberse a un fenómeno de saturación del crecimiento celular por altas concentraciones del medio de cultivo.

Estos resultados son preliminares y sería necesario hacer un mayor número de pruebas variando la composición de los medios (porcentaje de SAB o plasma) hasta conseguir un crecimiento parecido al control de SFB. Sería conveniente hacer un

estudio de las citoquinas presentes en los distintos medios por si hiciera falta suplementarlas con algún componente extra. Se valorarían además otros suplementos del medio de cultivo como derivados plaquetarios, por ejemplo.

En el fenotipado celular mediante citometría de flujo de nuestro estudio, hemos podido comprobar que las MSCs cultivadas en medio suplementado con SFB y medio con SAB expresan los marcadores propuestos en 2006 por the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy como criterios mínimos para definir las MSC: CD 105, CD 73 y CD 90. Asimismo, en lo referente a los marcadores que no deben expresar para ser consideradas MSCs propuestos por la misma sociedad, observamos que las células cultivadas en medio suplementado con SFB ni las células mesenquimales en cultivo con SAB expresan el marcador hematopoyético CD34. El marcador HLA-DR, cuya expresión debe ser nula según dichos criterios mínimos, lo fue totalmente en las células cultivadas en ambos medios (Dominici *et al.*, 2006).

También, las células mesenquimales cultivadas en medios con SFB y SAB fueron negativas para CD133, otro marcador hematopoyético, CD31, marcador de células endoteliales y CD36, propio de adipocitos, lo que habla a favor de su etiología mesenquimal. Los marcadores CD13 (aminopeptidasa N), CD44 (receptor del ácido hialurónico) y CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados) se expresaron en un elevado porcentaje. Así, algunos autores demostraron que el cartílago articular contiene una pequeña subpoblación de células CD105/CD166-positivas que son capaces de diferenciar hacia condrocitos, osteoblastos y adipocitos y que se encuentran en mayor porcentaje en cartílago con artrosis (Alsalameh *et al.*, 2004; Hiraoka *et al.*, 2006), como es el de nuestra muestra. De hecho, las células aisladas de cartílago articular, en nuestro caso, han mostrado ser positivas para ambos marcadores, en porcentajes superiores al 80%. Este incremento se ha relacionado, bien con el aumento de la proliferación de las células residentes o con el reclutamiento de células procedentes de otras zonas, como la membrana sinovial o el líquido sinovial (Marinova-Mutafchieva *et al.*, 2000).

Por tanto, el fenotipo por citometría de flujo, especialmente el de las células cultivadas en medio con SFB, fue similar al propuesto como criterios mínimos que debían expresar las MSCs para ser consideradas como tales. Además, todas las células aisladas y analizadas, mostraron capacidad de adherencia al plástico del frasco de cultivo, adquiriendo una morfología fibroblástica (Dominici *et al.*, 2006).

A este respecto, a pesar de que todavía no existe un consenso acerca de un marcador único de MSCs (Pittenger y Martin, 2004) y teniendo en cuenta que estos criterios probablemente requieran de modificación en lo que el conocimiento se desarrolla, la importancia de este conjunto mínimo de criterios estándar referidos reside en la intención de fomentar una caracterización más uniforme de las MSCs y facilitar el intercambio de datos entre los investigadores (Dominici *et al.*, 2006).

5. CONCLUSIONES

En primer lugar, en el presente trabajo se han estudiado el potencial proliferativo, la viabilidad celular y las diferencias fenotípicas *in vitro*, de células mesenquimales de cartílago, con el objeto de hallar fuentes alternativas al empleo de SFB para el cultivo de MSCs.

Tras los resultados obtenidos, se pueden extraer las conclusiones que se exponen a continuación:

- El crecimiento de las MSCs en medio suplementado en *pool* de plasmas fue siempre menor que el de las células cultivadas en SFB, independientemente del porcentaje de suplementación. En cambio, el crecimiento de las MSCs en medio suplementado con suero AB humano comercial fue menor que el de las células cultivadas en SFB al 10% a porcentajes bajos (5 y 10%) y mayor a porcentajes altos (15 y 20%).
- La viabilidad de las células no se ve afectada por el cultivo con SAB humano o *pool* de plasmas, en todos los casos fue mayor del 90%.
- La expresión de marcadores de superficie fue bastante similar en MSCs cultivadas con SFB y SAB humano.
- Sería conveniente realizar más experimentos ajustando los porcentajes de SAB o plasma y la composición del medio hasta optimizar los cultivos y conseguir un crecimiento similar al control. Habría que valorar también otras alternativas como el uso de derivados plaquetarios.
- Asimismo, convendría realizar estudios que valoraran la influencia de la edad y la patología.

BIBLIOGRAFÍA

- Alegre, E.** (2010). Caracterización fenotípica y funcional de células mesenquimales para regeneración condral en enfermedades osteomusculares. *Tesis doctoral*. Universidad de Zaragoza.
- Alhadlaq, A., J. Mao, J.** (2004). Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics. *Stem cells and development* 13: 436-448.
- Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T. and Lotz, M.** (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50: 1522-32.
- Bartholomew, A., Patil, S., Mackay, A., Nelson, M., Buyaner, D., Hardy, W., Mosca, J., Sturgeon, C., Siatskas, M., Mahmud, N. et al.** (2001). Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin *in vivo*. *Hum Gene Ther* 12: 1527-41.
- Bonora-Centelles, A., Castell, JV., Gómez-Lechón, MJ.** (2008) Adipose tissue-derived stem cells: hepatic plasticity. *Gastroenterol Hepatol* 31(5):299-309.
- Daley, G., Goodell, M. and Snyder, E.** (2003). Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 398-418.
- DelaRosa, O., Lombardo, E., Beraza, A., Mancheño-Corvo, P., Ramirez, C., Menta, R., Rico, L., Camarillo, E., García, L., Abad, JL., Trigueros, C., Delgado, M., Büscher, D.** (2009). Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 15(10):2795-806.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, PD., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, AM.** (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99(10):3838-43.

- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. and Horwitz, E.** (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-7.
- Gonzalez, MA., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., Delgado, M.** (2009). Treatment of Experimental Arthritis by Inducing Immune Tolerance With Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Arthritis and rheumatism* 60: 1006-1019.
- Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., González, MA., Rico, L., Büscher, D., Delgado, M.** (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58(7):929-39.
- Grant, M., May, W., Caballero, S., Brown, G., Guthrie, S., Mames, R., Byrne, B., Vaught, T., Spoerri, P., Peck, A. et al.** (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8: 607-12.
- Griffin, MD., Elliman, SJ., Cahill, E., English, K., Ceredig, R., Ritter, T.** (2013). Concise review: Adult mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory diseases: How well are we joining the dots?. *Stem cells* 31(10):2033-41.
- Hiraoka, K., Grogan, S., Olee, T. and Lotz, M.** (2006). Mesenchymal progenitor cells in adult human articular cartilage. *Biorheology* 43: 447-54.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B., Reinhardt, R., Schwartz, R., Keene, C., Ortiz-Gonzalez, X., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M. et al.** (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-9.
- Jorgensen, C., Djouad, F., Apparailly, F., Noël, D.** (2003). Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Ther* 10(10):928-31.
- Keating, A.** (2012). Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. *Cell Stem Cell* 10(6):709-16.

- Kinzebach, S., Bieback, K.** (2013). Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Xenogenic-Free Culture Consitions. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 129:33-57.
- Kocaoemer, A., Kern, S., Klüter, H.,Bieback, K.** (2007). Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Stem cells* 25: 1270-1278.
- Körbling, M. and Estrov, Z.** (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349: 570-82.
- Marinova-Mutafchieva, L., Taylor, P., Funa, K., Maini, R. and Zvaifler, N.** (2000). Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint. *Arthritis Rheum* 43: 2046-55.
- McCulloch, E. and Till, J.** (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res* 13: 115-25.
- Morandi, F., Raffaghello, L., Bianchi, G., Meloni, F., Salis, A., Millo, E., Ferrone, S., Barnaba, V., Pistoia, V.** (2008). Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells* 26(5):1275-87.
- Nauta, AJ., Kruisselbrink, AB., Lurvink, E., Willemze, R., Fibbe, WE.** (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177(4):2080-7.
- Pacini, S.** (2014). Deterministic and stochastic approaches in the clinical application of mesenchymal stromal cells (MSCs). *Front Cell Dev Biol* 12: 2-50.
- Pittenger, M. and Martin, B.** (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95: 9-20.

- Prigione, I., Benvenuto, F., Bocca, P., Battistini, L., Uccelli, A., Pistoia, V. (2009).** Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells* 27(3):693-702.
- Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L., Pistoia, V. (2008).** Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 26(1):151-62.
- Ranera, B. (2012).** Células madre mesenquimales equinas: obtención y análisis de sus propiedades *in vitro*. *Tesis doctoral*. Universidad de Zaragoza.
- Rasmusson, I., Uhlin, M., Le Blanc, K., Levitsky, V. (2007).** Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 82(4):887-93.
- Rosenthal, N. (2003).** Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med* 349: 267-74.
- Spaggiari, GM., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, MC., Moretta, L. (2006).** Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107(4):1484-90.
- Verfaillie, C., Pera, M. and Lansdorp, P. (2002).** Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 369-91.