



Universidad
Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES EN
DISTINTOS TEJIDOS**

***Study about MSC differentiation
capacity in different tissues***

Autor

BIEL ABAD, ANA

Tutor

DR. LARRAD MUR, LUIS

Co-tutor

PIÑAS SANCHO, JARA

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible que esté presentando este Trabajo Fin de Grado.

A mi tutor, **Luis Larrad**, por ser la guía y la toma de contacto de este trabajo, sobre todo en los primeros momentos.

A **Jara Piñas**, quien ha sido la columna que ha vertebrado este trabajo. Sin su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento este TFG no hubiera salido. Gracias por hacer fácil lo difícil.

Al **Dr. Adrián Hugo Aguinagalde**, amigo y excompañero de carrera, por ayudarme a resolver las dudas que me iban surgiendo conforme hacía este trabajo.

A **Ignacio Poblador**, por el apoyo de todos estos meses y por ser mi guía en los momentos duros.

A **Elena Lantero**, por revisar cada uno de los borradores y estar siempre dispuesta a resolver mis dudas.

A **mis padres y mi hermana**, por ser siempre los pilares que me aguantan y por no dejar nunca de confiar en mis capacidades.

A **mis compañeros de carrera**, por todas las veces que me han escuchado y por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de estos meses.

Al **servicio de Inmunología del Hospital Clínico Lozano Blesa**, por confiar en mí y por dejarme usar sus instalaciones.

Al **Dr. Javier Lanuza**, por convencerme de que no cogiese mi TFG en el departamento de médicas, sino en inmunología.

A la **Universidad de Zaragoza y a sus docentes** por darme la oportunidad de expandir mis conocimientos y por convertirme en la estudiante que soy hoy.

Gracias a todas las personas que directa o indirectamente me han hecho llegar hasta aquí.

ÍNDICE

ÍNDICE	2
ABSTRACT.....	4
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
1. CLASIFICACIÓN	6
1.1. CLASIFICACIÓN SEGÚN POTENCIALIDAD	6
1.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN PROCEDENCIA.....	7
2.- DESCUBRIMIENTO DE LAS MSCs.....	8
3.- CARACTERISTICAS DE LAS MSCs.....	8
4.- MORFOLOGÍA DE LAS MSCs	9
4.1 MORFOLOGÍA SEGÚN LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN	9
4.2 MORFOLOGÍA SEGÚN LA LOCALIZACIÓN	10
5.- METODOS DE OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE LAS MSCs.....	10
6.- POTENCIALIDAD DE LAS MSCs	13
7.- USOS CLÍNICOS Y TERAPÉUTICOS DE LAS MSCs	13
7.1 TEJIDO CARDÍACO Y VASCULAR.....	14
7.2 TEJIDO NERVIOSO.....	14
7.3 TEJIDO ÓSEO	14
7.4 TEJIDO CARTILAGINOSO	15
7.5 OTROS TEJIDOS.....	15
7.6 INGENIERÍA TISULAR.....	15
8.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE LAS MSCs.....	15
OBJETIVOS	18

MATERIAL Y MÉTODOS	19
1.- OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	19
1.1 CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA	19
1.2 MATERIALES DEL CULTIVO CELULAR.....	19
1.3 MEDIO DE CULTIVO.....	19
1.4 MANTENIMIENTO Y CULTIVO CELULAR	20
1.5 VIABILIDAD Y CONTAJE CELULAR.....	20
2.- ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	22
2.1 TECNICAS HISTOLÓGICAS.....	22
2.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA	22
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
RESULTADOS.....	25
1. CULTIVO CELULAR.....	25
2. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS MUESTRAS	25
DISCUSIÓN	31
BIBLIOGRAFÍA	34

ABSTRACT

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotenciales con la capacidad de diferenciarse en diversos linajes celulares. Estas células pueden ser extraídas de numerosos tejidos del organismo y su estudio ha demostrado que pueden diferenciarse in vitro en multitud de tejidos, no obstante aún queda mucho por conocer de éste mecanismo de acción. El objetivo de este trabajo es comparar la diferenciación a tejido cartilaginoso de MSCs derivadas de cartílago y grasa subcutánea. Para ello, las muestras de 4 pacientes fueron obtenidas durante una artroplastia de rodilla en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Se estudiaron los cortes histológicos correspondían a células cultivadas en micromasa en medio de diferenciación condrogénico en pases 1 y 3. Para la comparación entre pases y tejidos se evaluaron según el sistema de evaluación Bern Score. Los resultados obtenidos indican que la muestra derivada de tejido cartilaginoso presentaba una mayor diferenciación a cartílago comparada con la derivada de grasa subcutánea y que esta diferenciación se correspondía con un aumento del crecimiento del área de la muestra.

Palabras clave: Célula madre mesenquimal, diferenciación celular, diferenciación condrogénica, tejido subcutáneo, tejido cartilaginoso

Mesenchymal Stem Cell (MSC) are multipotent cells with the capacity of differentiate into different tissue lineages. These cells can be extracted from many tissues and its study has shown that they can differentiate in vitro in a multitude of various tissues, however there is still much more to know about the mechanism of action. The objective of this work is to compare the capacity of differentiation to cartilage tissue of MSCs derived from cartilage and subcutaneous fat samples. For that purpose, samples of 4 patients were taken during joint arthroplasty surgery in the Clinical University Hospital Lozano Blesa. Histological preparations corresponded to cells cultured in micromase in differentiation chondrogenic medium in passes 1 and 3. To compare passes and tissues we used Bern Score evaluation system. The results derived from cartilage had a greater differentiation to cartilage compared to subcutaneous fat and this distinction corresponded to an increase of the growth of the area of the sample.

Key words: Mesenchymal stem cell, cellular differentiation, chondrogenic differentiation, subcutaneous tissue, cartilage tissue.

ABREVIATURAS

ADSCs: Adipose tissue-derived MSCs

ALCAM: Activated Leukocyte Cell Adhesión Molecule

BMSCs: Bone Marrow Stem Cells

CFU-F: Colony Unit Forming-Fibroblastoid

CMA: Célula madre adulta

CME: Célula madre embrionaria

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético

ESC: Embryonic stem cell

FA: Fosfatasa Alcalina

GAG: Glicosaminoglicanos

GVHD: Graft Versus Host Disease

H-E: Hematoxilina-Eosina

HSC: Hematopoyetic Stem Cell

ISCT: International Society Celular Therapy

mMSC: Mature Mesenquimal Stem Cell

MSC: Mesenquimal stem cell

PBS: Phosphate Buffered Saline

PG: Proteoglicanos

PRP: Platelet Rich Plasma

RS: Recycling stem cell

TSSCs: Tissue-Specific Stem Cells

INTRODUCCIÓN

La investigación con células madre ha supuesto una nueva manera de comprender la formación de organismos complejos y ha abierto nuevos horizontes terapéuticos para enfermedades que hasta ahora no parecían tener cura. La posibilidad de generar nuevos tejidos que no produzcan rechazo tisular a partir de una progenie celular es una de las metas que la medicina moderna está intentando alcanzar.

El estudio de las MSCs ha supuesto un reto para la investigación moderna, ya que se empezó a conocer de su existencia hasta hace relativamente pocas décadas. Todavía no existe un consenso científico sobre el estudio de estas células debido a que se desconocen muchas de sus características o del funcionamiento de su mecanismo de acción.

Entre los muchos usos que tienen las MSCs, uno de los más destacados y estudiados en la actualidad es el uso de MSCs como tratamiento para enfermedades osteoarticulares. La diferenciación de las MSCs a cartílago y su aplicación en seres humanos como tratamiento es un campo en auge en la investigación científica, aunque todavía no se han logrado resultados definitivos.

1. CLASIFICACIÓN

Las células madre son células presentes desde las primeras etapas de la vida que tienen la capacidad de especializarse en diversos tipos celulares. La característica definitoria de estas células es que a la vez que se dividen en una célula hija o especializada también se autorepican, con lo cual el número de células se mantiene constante. Otra de las características de las células madre es su potencialidad, es decir, la capacidad de diferenciarse en distintos tipos de células (Can et al, 2008).

Hay varias maneras de llevar a cabo la clasificación:

Clasificación según potencialidad

Según su potencialidad las células madre se dividen en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.

- Células totipotenciales: Proviene del latín *totus*, que significa completo. Son las primeras en aparecer tras la fecundación y son las células con mayor potencialidad. Pueden formar tanto tejidos embrionarios derivados de las tres capas embriogénicas (endodermo, mesodermo y ectodermo) como extraembrionarios (placenta, saco vitelino, etc...). Son las únicas capaces de generar un organismo completo por sí solas (Pardo et al, 2005).
- Células pluripotenciales: Del latín *plures*, que significa muchos. Son aquellas que derivan del embrioblasto. Tienen la capacidad de formar las tres capas embriogénicas pero no de formar tejidos extraembrionarios (Can et al, 2008).
- Células multipotenciales: Estas células solo pueden dar precursores de una capa embriogénica (Pardo et al, 2005). La investigación con células madre multipotentes o progenitoras se ve entorpecida por la escasa cantidad que se puede aislar de estas células en los tejidos y que el número disminuye con la

edad. A todo ello se suma que este tipo de células se caracterizan por un lento crecimiento y multiplicación in vitro (Can et al, 2008). Las utilidades clínicas de este tipo de células no obstante se han demostrado muy competentes.

- **Células unipotenciales:** Del latín *unos*, único, como su nombre indica son células que solo pueden diferenciarse en una línea celular. Actúan en tejidos específicos cuando han sufrido daños y son las responsables de la autorenovación fisiológica tisular (Pardo et al, 2005).

Nombre	Tipo de célula (localización)	Potencialidad	Tejidos que puede formar
CME	Etapa de mórula	Totipotente	Estructuras embrionarias y extraembrionarias
CME	Masa interna celular del blastocito	Pluripotente	Estructuras embrionarias (células somáticas y germinales)
CME	Células del epiblasto	Pluripotente	Endodermo, mesodermo y ectodermo
CME	Células del ectodermo, endodermo o mesodermo	Pluripotente	Células somáticas
CMA	Células específicas de tejidos	Multipotentes	Uno o varios linajes celulares dependiendo del tejido (Ej: células madre hematopoyéticas)
CMA	Células asentadas en tejidos	Unipotentes	Un solo tipo celular (ej: miocitos del tejido muscular)

CME: Célula madre embrionaria; CMA: Célula madre adulta

Tabla 1. Tipo de células madre dependiendo de la localización, potencialidad y tejido resultante. (Can et al, 2008)

Clasificación según procedencia

Otra manera de clasificar a las células madre es por su tejido de origen: por un lado tenemos las células madre embrionarias (ESC, Embryonic Stem Cell) que proceden de la masa celular interna del blastocito y por otro lado las células madre adultas o células madre específicas de tejidos (TSSCs, Tissue-specific stem cells) que son aquellas presentes en los organismos adultos. En un primer momento se pensó que estas células sólo podían diferenciarse a un solo tipo celular o, al menos a su misma capa embrionaria; sin embargo varios artículos científicos han descrito que muchos

tejidos adultos podrían contener células con más potencialidad de la que se pensaba. Algunos estudios sugieren que hay células madre adultas que pueden llegar a diferenciarse en las tres capas germinales tal y como sucede con las células madre embrionarias (Tuan et al, 2003)

Las células madre mesenquimales (Mesenquimal Stem Cell, MSC) son un grupo de células multipotenciales presentes en el estroma de tejidos mesenquimales como la médula ósea, el cordón umbilical o los adipocitos, entre otros. (Pitternnger et al, 1999) aunque también se encuentran en otros tejidos no mesenquimales, como comentaremos más adelante.

2.- DESCUBRIMIENTO DE LAS MSCs

La primera evidencia que se tiene de la existencia de células con capacidad multipotencial viene de la mano de dos científicos, el Dr. James A. Till y Ernest A. McCulloch, en 1961. Estos científicos inyectaron células de la médula ósea en el bazo de ratones previamente irradiados y observaron que se empezaban a formar nuevas colonias de células sanguíneas a partir de las células de la médula ósea.

Posteriormente, en los años 70, fue el doctor ruso Friedenstein y sus colaboradores, quienes demostraron el potencial osteogénico de las MSCs. Aislaron las células de la médula ósea y las describieron como células fibroblastoides que además tenían la capacidad de diferenciarse en otras células de origen mesenquimal. También descubrieron que estas células cultivadas *in vitro* eran muy adherentes a las superficies de los plásticos de cultivo. Debido a estas investigaciones, hoy en día Friedenstein es considerado el descubridor de las MSCs. En 1984 Ashton y su grupo de trabajo publicaron un estudio en el que observaban colonias fibroblastoides derivadas de médula ósea *in vivo* y estudiaron su diferenciación a tejido osteogénico. En 1988 Owen y Friedenstein demostraron la existencia de una "célula troncal estromal" presente en el tejido conjuntivo de la médula ósea capaz de dar origen a diferentes tipos celulares. Cuando se aplicaban diversas condiciones sobre el medio en el que se encontraban estas células se demostró que se podían diferenciar en distintos linajes celulares. (Flores-Figueroa et al, 2006)

Inicialmente las implicaciones que tuvieron estos experimentos fueron aplicadas sólo en el ámbito de la investigación, hasta que se les pudo dar un uso experimental en el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, a pesar de que se habían publicado numerosos estudios sobre las funciones de esta clase de células, no fue hasta 1999 cuando una empresa comercial, Osiris Therapeutics Inc, empezó a utilizar el término de Célula Madre Mesenquimal para referirse a estas células distintas de las hematopoyéticas que tenían capacidad de diferenciarse en otros linajes celulares (Bianco et al, 2008).

3.- CARACTERÍSTICAS DE LAS MSCs

Las MSCs cultivadas *in vitro* tienen una morfología fusiforme y se asemejan a células fibroblásticas. Crecen formando colonias (denominadas Unidades Formadoras de Colonias o CFU). En 2006 la Internacional Society Cellular Therapy (ISCT) elaboró tres criterios para definir a las MSCs (Dominici et al, 2006):

- Las MSCs deben de ser adherentes en cultivo
- Las MSCs deben expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 y además deben de estar ausentes los antígenos hematopoyéticos CD34, CD45, marcadores de macrófagos, monocitos y linfocitos B
- Las MSCs deben de ser capaces de diferenciarse in vitro en osteoblastos, condrocitos y adipocitos en condiciones estándar de cultivo.

Además de estos criterios, también se debe tener en cuenta otras características propias de las MSCs como la "plasticidad clonogénica" o capacidad de diferenciarse en tejidos de las capas embrionarias endodérmicas y ectodérmicas y la "autorenovación" de las células, es decir, que durante la división celular solo una de las células hijas inicia los procesos de diferenciación celular (Tuan et al, 2002).

Los marcadores que hemos mencionado con anterioridad, CD73, CD90 y CD105 son imprescindibles para el correcto funcionamiento de la célula madre mesenquimal. CD73 es una glicoproteína relacionada con procesos de mediación de la adhesión celular en la MSCs. CD90 es una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas cuyo principal ligando es CD45 y se ha demostrado que si las MSCs se someten a un estrés celular mecánico se llegan a diferenciar en células similares a los osteoblastos y su expresión del CD90 se reduce notablemente. Por último, CD105 es otra glicoproteína que se expresa en monocitos y macrófagos activados y una gran multitud de células. Esta proteína interviene en la regulación de los componentes de la matriz extracelular y se cree que tiene una función en la regeneración y reparación vascular (Dominici et al, 2006).

Aunque no están propuestas por el ISCT, otros autores proponen a las moléculas CD44, STRO-1, y CD166 como marcadores de MSCs. CD44 es un marcador que interactúa con el ácido hialurónico, la osteopontina, el colágeno, anquirina, fibronectina y mieloproteasas en los procesos de adhesión, migración y proliferación de las MSCs. STRO-1 se descubrió en 1991 como un antígeno que se expresa en el desarrollo temprano de estas células y que desaparece al diferenciarse las células en osteoblastos, además, como más adelante comentaremos, es una de las moléculas que más se están estudiando como marcador de diferenciación de las MSCs. CD166 o ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule) es un marcador que interviene en la hematopoyesis manteniendo el estado indiferenciado de HSC y MSCs (Romero et al, 2007).

4.- MORFOLOGÍA DE LAS MSCs

La morfología de las MSCs está condicionada por un gran número de variables. En este apartado comentaremos las diferencias morfológicas según capacidad de proliferación, diferenciación y origen de la muestra:

4.1 Morfología según la capacidad de proliferación y diferenciación

A la hora de clasificar las células según su capacidad intrínseca para proliferar y diferenciarse nos encontramos que existen tres tipos principales de células:

- Células tipo I, o RS-I (del inglés, *recycling stem cells*), de morfología fusiforme y pequeña que tienen una capacidad de proliferación muy alta.

- Células tipo II o RS-II que tienen una morfología más grande, aplanada y granular, que proliferan más lentamente.
- Células maduras o mMSC (del inglés, *mature MSC*) que son células que han perdido casi toda la capacidad de diferenciarse pero que aún conservan la capacidad de transformarse en osteoblastos

Al analizar el cultivo de MSCs en un medio de plástico se observó que aquellas células que eran cultivadas a bajas densidades (1,5 o 3 células/cm²) crecían a mucha mayor velocidad de las cultivadas a altas densidades (5000 células/cm²). Esta rápida expansión de MSCs en el cultivo se descubrió que dependía de la presencia de las células RS-I.

A la hora de estudiar el crecimiento de las células se vio que había una fase de poco crecimiento (*lag phase*) durante los primeros 5 días seguida de una fase de crecimiento rápido (*log phase*) y por último una fase de estacionamiento donde no había prácticamente crecimiento.

Mediante citometría de flujo se mostró que los cultivos en fase de estacionamiento contenían mayor cantidad de células maduras mMSC y una pequeña población de células RS-I. Tras volver a cultivar a baja densidad, aparecían de nuevo las células RS-II y durante la fase de crecimiento rápido el número de RS-II disminuía a la par que el de células RS-I aumentaba.

Así pues, la conclusión a la que se ha llegado a través de estas observaciones ha sido que las células RS-I corresponden a MSCs jóvenes con un índice de proliferación elevado que dan origen a las células RS-II y estas últimas a las mMSC. Las mMSC son células relativamente maduras que se dividen con lentitud y que nos indican que el cultivo se acerca a su senescencia (Sekiya et al, 2002).

4.2 Morfología según la localización

La morfología de las MSCs también varía en función de su localización; por ejemplo, las células aisladas a partir de la sangre del cordón umbilical presentan una morfología predominantemente ovoide y las aisladas en médula ósea la morfología predominantemente fibroblastoide. Esta variación morfológica depende del antígeno CD90, que se encuentra en la población celular medular y está ausente en las células del cordón umbilical (Romero et al, 2007). Las MSCs derivadas de tejido adiposo también presentan unas características particulares si se las compara con las MSCs derivadas de médula ósea: presentan una morfología más pequeña, tienen mayor capacidad de proliferación, pueden aguantar más pases antes de alcanzar la senescencia y no expresan el antígeno CD106 (Diekman et al, 2009). Las MSCs derivadas de cartílago expresan en un alto porcentaje positividad a CD105 y CD166 y expresan en un bajo porcentaje el antígeno STRO-1 (Alsalameh et al, 2001).

5.- METODOS DE OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE LAS MSCs

Históricamente, el principal tejido de obtención de las MSCs era la médula ósea, no obstante, la técnica presentaba muchos inconvenientes (la extracción resulta muy dolorosa para el donante y suponía riesgos de infección) además de que las MSCs de

la médula ósea se hayan en muy baja proporción dentro de la misma (0.001-0,01% del total de células).

Desde los estudios realizados por Friedenstein y Owen (1988) se conoce que una de las características de MSCs es que su cultivo es heterogéneo tanto en morfología como en capacidad de diferenciación de las células. Esto sucedía debido a que, a la hora de obtener la muestra de la médula ósea, como había muy poca matriz extracelular era muy difícil no arrastrar también otro tipo de células. En consecuencia, al manipular mecánicamente el cultivo (normalmente durante el pipeteo o el pase de células) el tejido estromal y las células hematopoyéticas se mezclaban. Sin embargo, si se sembraban a baja densidad, las células estromales de la medula ósea (BMSCs) se adherían y diferenciaban de las HSC que no eran adherentes. Con el cultivo adecuado, se formaban precursores celulares (CFU-F).

En 1997 Kuznetsov demostró que no todas las CFU tienen el mismo potencial de diferenciación. Éste cultivó células derivadas de distintas CFU de humanos y comprobó que sólo el 58,8% formó tejido óseo efectivo en ratones con lo que demostró que no todas las CFU tenían la misma capacidad para diferenciarse en tejido osteogénico. Para que los estudios fueran replicables, se acordó que era necesario establecer un estándar común para cultivar y diferenciar MSCs in vitro.

El método que hoy en día es el más empleado para la obtención de las MSCs no es muy distinto al que utilizó Friedenstein en su tiempo. La metodología propuesta por este científico consistía en obtener células provenientes de la medula ósea de organismos adultos, y después de un tiempo en suspensión, cultivarlas adheridas en placas de cultivo. Como hemos comentado en el párrafo anterior, el primer problema que se encontraban era la heterogeneidad de los cultivos, sin embargo Friedenstein descubrió que tras varias resiembras predominaban las células que crecían en colonias fibroblastoides.

Varios grupos de investigación están buscando distinguir de manera efectiva las MSCs del resto de células. El principal método es la separación por gradiente de densidad. Este método consiste en aprovechar la densidad de flotación de las células para separarlas mediante ultracentrifugación. En la separación de MSCs se han utilizado dos métodos de separación, el gradiente de Percoll y el gradiente de Ficoll. La principal diferencia entre ambos es el compuesto que se añade a la solución para centrifugar. En el gradiente de Percoll se añade una suspensión de partículas de ácido silícico que presentan baja viscosidad a densidades altas y en el gradiente de Ficoll se añade una solución de polisacáridos sintéticos de alto peso molecular que permite la separación celular de un medio de alta densidad a baja densidad

Caplan en los 90 modificó el método de Friedenstein y consiguió distinguir las MSCs de humanos adultos. Para ello obtuvo medula ósea de aspirados de cresta iliaca de donantes sanos y células de la epífisis femoral. Separó las células por centrifugación en gradiente de Percoll. Después de 3 días de cultivo las células no adherentes se eliminaban y las células adherentes seguían cultivándose in vitro. Las células que permanecieron adheridas tenían una morfología predominantemente fibroblastoide. En la actualidad se sigue utilizando este método, sin embargo, otros grupos han

utilizado el gradiente de Ficcoll para la obtención celular. Ambos métodos son igualmente válidos y se utilizan indistintamente.

Varios grupos de investigación están buscando distinguir de manera efectiva las MSCs del resto de células. El principal método que se ha usado es la separación por gradiente de densidad, sin embargo esta técnica poseía dos desventajas: la primera era que la muestra solía ser frecuentemente contaminada por macrófagos. La segunda fue que debido a la heterogeneidad de las MSCs, solo el 30% de las células que se estudiaban resultaban tener capacidad de ser verdaderas células multipotenciales. Hoy en día se están centrando los esfuerzos en descubrir métodos de obtención de MSCs más puros y menos heterogéneos. Se ha investigado en la separación de MSCs mediante características inmunofenotípicas, sin embargo todavía no se han descubierto marcadores de superficie que nos permitan aislar las MSCs multipotenciales antes de que se hayan desarrollado *in vitro* (Flores-Figueroa et al, 2006).

Es importante recalcar que aunque no haya antígenos específicos de MSCs, sí que existen aquellos marcadores que se expresan en estas células de manera preferencial. Existen hoy en día varias líneas de investigación con anticuerpos monoclonales y diversas tinciones.

Uno de los marcadores utilizados ha sido la fosfatasa alcalina (FA). Utilizando la citometría de flujo se separaron dos grupos (FA positivos y FA negativos) de células de médula ósea de ratones y al cultivarlos, se demostró que los FA positivos contenían altos niveles de progenitores osteogénicos y carecían de la presencia de células adipocíticas y de macrófagos (Flores-Figueroa et al, 2006).

Otra manera de lograr la caracterización de las MSCs es mediante el uso de anticuerpos que las reconozcan. El anticuerpo que más se conoce en este campo es el STRO-1. STRO-1 es una proteína de membrana que se localiza en el retículo endoplásmico y que parece que tienen un papel relevante en la angiogénesis de las MSCs. No obstante, STRO-1 no se expresa de manera universal en todas las MSCs, ya que MSCs derivadas de tejidos como la membrana sinovial entre otros presentan una baja expresión de esta proteína (Tuan et al, 2014)

Otros marcadores que también prometen obtener buenos resultados son los denominados SH2, SH3 y SH4. Estos anticuerpos fueron extraídos a partir de varias líneas celulares de hibridomas de ratones inmunizados con células mesenquimales humanas expandidas *in vitro*. Estas moléculas reconocían los antígenos de superficie de las MSCs y no reaccionaban con células hematopoyéticas, hueso o cartílago. El anticuerpo SH2 reaccionó con MSCs de médula ósea pero no con células del periostio. (Flores-Figueroa et al, 2006). Estudios en profundidad han descubierto que el anticuerpo SH2 reconoce al antígeno CD105-endoglina y los anticuerpos SH3 y SH4 al antígeno CD73, ambos característicos de las MSCs (Javanzon et al, 2004).

Con las nuevas investigaciones se ha descubierto que se pueden extraer MSCs de casi cualquier tejido adulto. Las últimas revisiones demuestran que se pueden extraer MSCs de tejido vascular, tejido adiposo, tejido cartilaginoso, tejido cerebral, tejido dental, tejido endometrial, placenta, gelatina de Wharton y tejido del cordón umbilical. (Marquez-Curtis et al, 2015).

En particular, el tejido adiposo ha supuesto una de las alternativas más viables para la obtención de MSCs debido a que es un tejido de fácil acceso y mínimo riesgo invasivo. Las MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs, Adipose tissue-derived MSCs) se mantienen durante un periodo de tiempo mayor y tienen más capacidad de proliferación que las MSCs derivadas de médula ósea. También se ha demostrado que las ASCs poseen un potencial osteogénico muy grande, y actualmente el tejido adiposo está considerado como uno de los tejidos más efectivos para la formación de hueso a partir de MSCs (Barba et al, 2013)

6.- POTENCIALIDAD DE LAS MSCs

Como ya hemos comentado en párrafos anteriores, la multipotencialidad es una de las características que definen a las MSCs. Se define a esta característica como la capacidad de las células de diferenciarse en linajes celulares derivados de su mismo tejido o capa embrionaria. Por ejemplo, las HSC son capaces de dar origen a las diversas células sanguíneas (linfocitos, eritrocitos, plaquetas...) ya que todas pertenecen al tejido hematopoyético. En este caso, las MSCs son capaces de diferenciarse en tejido de la capa mesodérmica, es decir, tejido óseo, cartilaginoso, músculo, ligamentos, tendones, tejido adiposo y estromal de la médula ósea (Marquez-Curtis et al, 2015).

Sin embargo estudios más recientes demuestran que las MSCs pueden diferenciarse no solo en tejido derivado de la capa mesodérmica sino también en linajes celulares derivados de otras capas embrionarias. A esta característica se le conoce como plasticidad celular. Se ha demostrado la capacidad de las MSCs para diferenciarse en tejido nervioso, tejido hepático, tejido renal, tejido pancreático, piel, vasos sanguíneos, epitelio ovárico, tejido cardíaco, tejido pulmonar, cerebro, pulpa dental, líquido amniótico y testículos (Ramos, 2015).

Se ha visto que todos los estudios que documentan la plasticidad han usado modelos de tejido dañados, ya que al parecer crea un ambiente favorable para que las células crucen la barrera de la plasticidad, no obstante, los mecanismos por los que esto sucede son desconocidos y aún queda mucho por estudiar de esta característica de las MSCs (Herzog et al, 2003).

7.- USOS CLÍNICOS Y TERAPÉUTICOS DE LAS MSCs

La capacidad multipotencial de las células mesenquimales y su plasticidad le confieren unas características muy interesantes a la hora de utilizarlas como potencial tratamiento de enfermedades. Su uso clínico presente y futuro abarca enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco, pancreático, renal y gastrointestinal, entre otros (Tuan et al, 2002).

Se ha demostrado que las células cultivadas in vitro pueden ser trasplantadas a tejidos in vivo de manera efectiva. En 1983, Piersman demostró que se podían trasplantar unidades formadoras de colonias y células hematopoyéticas humanas de manera efectiva. En su estudio constató que tras inyectar estas células a ratones irradiados e inmunodeprimidos, las células humanas implantadas eran efectivas y formaban tejido funcional.

Otros investigadores efectuaron estudios similares pero en ratones no irradiados. Estudiaron la distribución de células mesenquimales y encontraron presencia de las mismas en medula ósea, bazo y tejido mesenquimal incluso después de un año postrasplante (Allers et al, 2004), superando los resultados de Piersman que solo habían detectado células trasplantadas durante tres meses. Estos resultados apoyaron la hipótesis de que se podían trasplantar MSCs sin necesidad de ningún tipo de quimioterapia o irradiación previa.

Las aplicaciones de las MSCs para la terapia celular y la medicina regenerativa han sido objeto de numerosos estudios. La eficacia terapéutica de las MSCs deriva de su habilidad para secretar un conjunto de moléculas bioactivas que favorecen los procesos de inmunomodulación, angiogénesis y estimulación de la regeneración celular; a la vez que inhiben la apoptosis, la inflamación y la fibrosis. Parece ser que las MSCs son capaces de detectar tejido dañado e inflamado para activar una cascada de factores de crecimiento que inducen a la reparación del tejido (Ambrosio et al, 2015).

Específicamente, dentro de cada tejido, se ha visto que la actuación de las MSCs puede tener efectos terapéuticos beneficiosos:

7.1 Tejido cardíaco y vascular

Con respecto a los usos terapéuticos que pueden tener las MSCs, uno de los principales es el uso en el tratamiento de la miocardiopatía isquémica. Se ha demostrado que el trasplante de MSCs diferenciadas a miocardiocitos en tejido isquémico cardíaco produce una liberación de hormonas paracrinas que reducen la apoptosis en el tejido infartado, favorecen la reconstrucción ventricular y mejoran la función cardíaca a medio y largo plazo (Hua et al, 2015).

7.2 Tejido nervioso

Se han llevado a cabo estudios preclínicos con animales que han demostrado una mejoría en la regeneración celular de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer, además de la epilepsia, la esclerosis, el ictus isquémico y la lesión de médula espinal. Aunque los resultados son prometedores, el mecanismo de acción aún es desconocido y debe ser investigado en profundidad antes de que los resultados puedan ser trasladados a humanos (Ambrosio et al, 2015).

7.3 Tejido óseo

Una de las perspectivas más prometedoras del uso terapéutico de las MSCs es la capacidad de diferenciación a hueso. El tejido del se han obtenido mayores resultados ha sido el tejido adiposo y ya se han hecho estudios preclínicos confirmando que es posible la regeneración in vivo a hueso. No obstante, todavía queda mucho por investigar en materia de seguridad y eficacia del uso de MSCs en pacientes con patologías óseas (Barba et al, 2013).

7.4 Tejido cartilaginoso

Uno de los usos terapéuticos de las MSCs ha sido el tratamiento de la osteoartritis. Se ha documentado evidencia de que al inyectar MSCs derivadas de tejido adiposo se producía una regeneración del tejido cartilaginoso y estudios recientes muestran evidencia de la regeneración de cartílago como tratamiento de esta enfermedad. A pesar de todo, el mecanismo por el que se produce esta regeneración sigue sin comprenderse en su totalidad por lo que son necesarios más estudios clínicos sobre la materia (Pak et al, 2016).

7.5 Otros tejidos

Otra de sus aplicaciones terapéuticas ha sido en el tratamiento de la enfermedad de rechazo del injerto alogénico de progenitores hematopoyéticos contra huésped (graft versus host disease GVHD). Maitra et al. estudiaron el papel de las MSCs humanas en esta enfermedad, descubriendo que suprimían la activación de linfocitos T, mejorando la respuesta al trasplante. (Flores-Figueroa et al, 2006).

Otra de las enfermedades donde el uso de la terapia celular regenerativa ha demostrado grandes promesas es en la osteogénesis imperfecta. Esta enfermedad sin cura es un defecto del colágeno y produce la llamada vulgarmente "enfermedad de los huesos de cristal". Horwitz et al. publicaron un estudio en 1999 donde demostraban que tras tres meses después del trasplante de MSCs en niños con osteogénesis imperfecta se había incrementado la velocidad de crecimiento ósea y se había reducido la frecuencia de las fracturas óseas significativamente.

7.6 Ingeniería tisular

En los últimos años ha surgido una nueva área en la medicina regenerativa denominada ingeniería tisular. En la ingeniería tisular, las propias MSCs de pacientes se cultivan en una matriz tridimensional enriquecida con factores de crecimiento y se crean tejidos in vitro que permitan restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos del receptor. La utilización de células o tejidos autólogos en ingeniería tisular implica numerosas ventajas como por ejemplo la reducción significativa del número de infecciones transmitidas desde un donante hacia un receptor, la ausencia del rechazo inmune del tejido trasplantado o la reducción de la morbilidad y mortalidad de los donantes de órganos. En la ingeniería tisular, la generación de tejidos requiere de un soporte biomecánico que actúe de sustituto de la matriz extracelular del tejido de origen. La función de las matrices tridimensionales es procurar la promoción de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células. Además, deben cumplir varios requisitos como que no produzcan toxicidad al degradarse, no estén hechas con material cancerígeno, no provoquen una respuesta inflamatoria y que estén estériles previas a su uso. (Serrato Ochoa et al, 2015)

8.- DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE LAS MSCs

Para empezar a hablar sobre la diferenciación celular a cartílago primero hemos de repasar las características de este tejido. El cartílago es una estructura compleja

formada por tres capas de tejido (superficial, media y profunda) y cada una de ellas tiene distinta composición bioquímica, distintas propiedades biofísicas, distinta tensión y distinta concentración de oxígeno (Quinn et al, 2005). La patología asociada a este tejido suele derivar frecuentemente en osteoartritis articular, una enfermedad con una alta prevalencia en la población de mayor edad y de la que aún no se tiene un procedimiento terapéutico que cure totalmente la enfermedad. (Pak et al, 2016).

Como ya hemos comentado con anterioridad, las MSCs son capaces de diferenciarse en tejido cartilaginoso como ya demostró Pittenger et al. en 1999. La extracción de MSCs adultas puede efectuarse en diversos tejidos; aunque el más frecuente en años anteriores fue la extracción de MSCs del tejido de medula ósea, hoy en día se prefiere la extracción de tejido adiposo ya que es más accesible, presenta menos riesgo y las MSCs aisladas de tejido adiposo presentan una gran capacidad de diferenciarse a cartílago (Pak et al, 2016).

El uso de MSCs para su diferenciación a cartílagos extraídos de distintos tejidos muestra diferencias a nivel de capacidad de proliferación. En un estudio de Martínez-Lorenzo se analizó las diferencias con respecto a la capacidad de proliferación de tejido de la medula ósea, grasa hofa y fluido sinovial. Las células extraídas de grasa hofa demostraron mayor capacidad de proliferación que la derivada de medula ósea aunque el riesgo de extracción de la grasa hofa era mucho mayor que el de la medula y el líquido sinovial presentaba una capacidad de diferenciación condrogénica muy reducida. Otro factor a tener en cuenta con respecto a la diferenciación de las MSCs es la edad del paciente. Existe una controversia en la literatura científica sobre si la edad influye negativamente en la diferenciación, como defiende Bergman et al (1996) o por el contrario no se han demostrado diferencias significativas (Martínez-Lorenzo et al, 2007).

Las ADSCs se localizan dentro de la matriz del tejido adiposo, concretamente alrededor de los vasos sanguíneos. Esas células madre pueden ser liberadas de la matriz por un proceso de lipoaspiración con colagenasa, no obstante, el número de células madre que se puede extraer de cada paciente varía mucho entre individuos (Pak et al,2016).

Respecto a los marcadores característicos de diferenciación condrogénica, no se ha demostrado que exista ningún marcador que sea específico de MSCs con capacidad de diferenciarse a cartílago (Martínez-Lorenzo et al, 2009).

Se ha demostrado que las MSCs derivadas de tejido adiposo pueden formar cartílago in vitro bajo la guía de diferentes factores de crecimiento y el tejido resultante expresa las biomoléculas típicas de cartílago (colágeno tipo II y agreganos). Sin embargo se ha visto que aunque expresen las mismas proteínas, la proporción de estas y su distribución difieren mucho de la expresada por el tejido cartilaginoso sano adulto normal. Por ejemplo, el tejido crecido in vitro expresaba menos de un 50% de moléculas que sí se encontraban en tejido humano normal. Esto da como resultado que el tejido crecido in vitro no resulte, de momento, funcional ni operativo para el tratamiento de enfermedades cartilaginosas humanas (Somoza et al, 2014). Yang et al. constataron que las microfracturas de cartílago inducían a la migración de MSCs

derivadas de medula ósea pero que el tejido resultante era fibrocartilaginoso (el cual reduce temporalmente los síntomas clínicos pero que no constituye una solución efectiva a largo plazo de la patología cartilaginosa) (Yang et al, 2011).

Esta aparente falta de potencialidad de las MSCs de dar lugar a cartílago estable puede venir de las restricciones impuestas durante el periodo embriogénico ya que las células madre embrionarias han demostrado evidencia de poder regenerar tejido cartilaginoso (Hwang et al, 2008). Es posible que la causa de esto sea que las funciones y respuestas de los tejidos en desarrollo sean diferentes de las de los tejidos adultos.

A pesar de todo ello, revisiones de meta-análisis han dado a conocer que ha habido ensayos clínicos que han dado resultados positivos en la diferenciación efectiva a cartílago y el tratamiento de patología cartilaginosa. Entre 2010 y 2016 hubo artículos publicados que demostraron una mejoría significativa de la artrosis tras inyectar ADSC, y que además había una relación directa entre el número de células inyectadas y la cantidad de cartílago regenerado. Además, se cree que el plasma rico en plaquetas (PRP, Platelet Rich Plasma) inyectado junto con las células madre puede tener un papel determinante, ya que el PRP libera una serie de factores de crecimiento que pueden favorecer a la correcta diferenciación del cartílago.

Todo ello nos lleva a la conclusión de que el mecanismo de formación de cartílago aún es desconocido y que queda aún mucha investigación que realizar para poder llegar a resultados óptimos que puedan ser aplicados a patologías concretas.

OBJETIVOS

El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio del servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

Los objetivos marcados fueron:

- Interpretación y análisis de los cortes con tinciones histológicas de diferenciaciones in vitro de células mesenquimales.
- Observar y registrar el crecimiento del cultivo de MSCs regularmente.
- Aprender el manejo de técnicas de microscopía e imagen.
- Aprendizaje del uso y manejo del material del laboratorio y de las condiciones de esterilidad para el cultivo celular.
- Interpretar y analizar los resultados obtenidos.
- Hacer una revisión de la literatura científica sobre las células madre mesenquimales.
- Aprender a utilizar las bases de datos científicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

Las muestras celulares derivaron de cuatro pacientes, dos hombres y dos mujeres, del servicio de Traumatología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa con edades comprendidas entre 62 y 76 años que se sometieron a una artroplastia de rodilla. Los pacientes habían sido informados previamente del procedimiento y habían firmado un consentimiento informado por escrito.

Paciente 1: Varón de 62 años, diferenciación de cultivo en pases 1 y 3 de MSCs derivadas de grasa subcutánea y cartílago

Paciente 2: Mujer de 71 años, diferenciación de cultivo en pases 1 y 3 de MSCs derivadas de grasa subcutánea y cartílago

Paciente 3: Varón de 76 años, diferenciación de cultivo en pases 1 y 3 de MSCs derivadas de grasa subcutánea y cartílago

Paciente 4: Mujer de 76 años, diferenciación de cultivo en pases 1 y 3 de MSCs derivadas de grasa subcutánea y cartílago

1.2 MATERIALES DEL CULTIVO CELULAR

El desarrollo del cultivo se llevó a cabo en un frasco de cultivo de 25 cm² (T25) con tapón de rosca con filtro, utilizando unos volúmenes finales de medio de 6ml. El resto del material de plástico estéril, tubos para centrifugación, placas de cultivo y pipetas se obtuvieron de BD Falcon y TTP. Los tubos para centrifugación en minifuga fueron de *Eppendorf* y los sistemas de filtración para la esterilización de soluciones fueron de *Corning*. Se utilizó una cabina de flujo laminar vertical (DANLAF) sobre la que se llevó a cabo la manipulación de los cultivos celulares para garantizar su esterilidad. Se utilizó una incubadora *Binder* a 37° con atmósfera húmeda y 5% de CO₂ donde se incubaron las muestras.

1.3 MEDIO DE CULTIVO

Para el mantenimiento del cultivo celular se empleó el siguiente medio de cultivo (de aquí en adelante le llamaremos medio completo):

- α -MEM GlutaMAX medium (*GIBCO*).

Suplementado con

- 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, *Biochrom AG*).
- 1% (v/v) de antibióticos (estreptomina y estreptavidina).
- 0.1% (v/v) de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, 1 μ g/ml, *Sigma-Aldrich*).

1.4 MANTENIMIENTO Y CULTIVO CELULAR

Las células se cultivaron en un incubador (Binder) a 37°C y atmósfera húmeda de 5% de CO₂. El cambio de medio se llevó a cabo cada 3-4 días. Se desechó el medio antiguo y se sustituyó por 6 ml de medio completo.

El pase de las células se realizó cuando superaron el 80% de confluencia en la superficie de la placa.

Como las células se encontraban adheridas fue necesario realizar un proceso de tripsinización para separarlas del frasco de cultivo.

Se procedió a retirar el medio de cultivo y a lavar dos veces con Buffer Fosfato Salino (PBS) para arrastrar las células muertas. Tras esto se añadió la solución de tripsina al 0,25% 1mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich) y se incubó 5 minutos a 37°C a atmósfera húmeda de 5% de CO₂. La tripsina es una proteasa que por sus características digiere las proteínas celulares implicadas en la adhesión celular a la superficie de plástico. Tras esto se procedió al bloqueo de la tripsina con medio completo (4 veces el volumen añadido de la solución de tripsina). Se vertió el contenido a un tubo de fondo cónico y se centrifugó a 1200 revoluciones por minuto durante 7 minutos. Tras terminar la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en medio completo.

La viabilidad se determinó mediante el método azul Trypan y las células se sembraron a una densidad de 2000 células/cm² en 6 ml de medio completo.

1.5 VIABILIDAD Y CONTAJE CELULAR

Para valorar la viabilidad celular se procedió a utilizar el método del azul Trypan. El azul Trypan es un colorante celular que penetra en la membrana celular y tiñe la célula si esta está dañada. Por el contrario, si la célula no presenta alteraciones en su membrana el colorante no permeabiliza y la célula queda intacta. Esto nos permite diferenciar por técnica microscópica si una célula se encuentra viva (sin teñir) o muerta (teñida de azul). Este método se utilizó para hacer un conteo de células efectivas. Para ello se mezcló 50 µl de suspensión celular con 50 µl de solución azul Trypan al 0,4% en un Eppendorf. Para realizar el conteo de células vivas se utilizó un hemocitómetro o cámara de Neubauer.

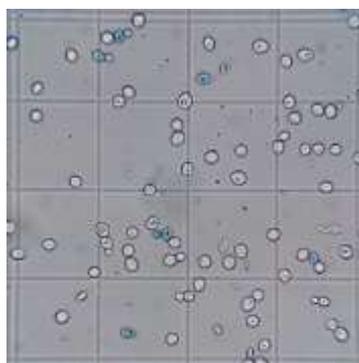


Figura 1. Células marcadas con azul Trypan en un hemocitómetro y vistas al microscopio.

El hemocitómetro consiste en una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos compuesta a su vez por una cámara simple, la porción central, con dos cámaras individuales (superior e inferior), es donde se realiza el conteo de células. Cada cámara está dividida en 9 cuadrantes que a su vez se subdividen en otros 16 más pequeños. El volumen medio de cada uno de los cuadrantes grandes es de 0.1 mm de lado y 0,01 cm de profundidad.



Figura 2. Cámara de Neubauer comercial

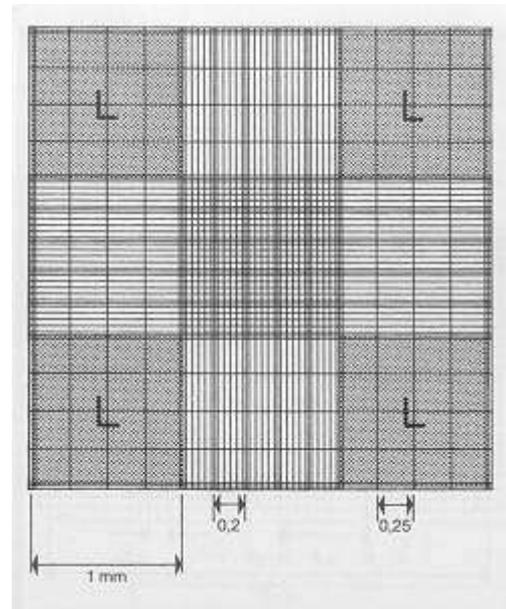


Figura 3. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer

Para realizar el conteo de células se colocó un cubre sobre la cámara de Neubauer y se difundió mediante capilaridad la suspensión celular en ambas cámaras. El conteo se realizó utilizando un microscopio óptico (Zeiss). Se contó las células vivas y muertas en los cuatro cuadrantes externos. Con ese dato se calculó la densidad total del cultivo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad de celular} = \frac{\text{Número de células}}{\frac{1}{2} \times 4 \text{ cuadrantes} \times 10^{-4}}$$

Para el denominador se necesitó conocer tres valores:

- La dilución $\frac{1}{2}$ (50 μl de resuspensión y 50 μl de azul Trypan)
- El número de cuadrantes que hemos contado, 4 en nuestro caso.
- El volumen de la cámara: En la cámara de Neubauer cada cuadrante es 0,1 cm, con lo cual el área es 0,01 cm^2 . Tiene una profundidad de 0,1 $\text{mm}=0,01\text{cm}$ con lo cual el volumen total es $0,01\text{mm}^2 \times 0,01\text{mm} = 0,001 \text{mm}^3 (10^{-4})$

2.- ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

Por falta de tiempo no fue posible realizar la diferenciación del cultivo celular y se me facilitaron en el grupo cortes realizados previamente. Fueron 4 muestras de cartílago y grasa subcutánea de 4 pacientes con edades comprendidas entre 62 y 76 años. Las preparaciones eran de 200.000 células cultivadas en micromasa en 200 µl de medio de diferenciación. Se iniciaron cuando las células se encontraban en fase 1 y 3 del cultivo. Fueron cultivadas durante 30 días y se cambió el medio cada 3-4 días. Una vez finalizados los 30 días se fijaron en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4%.

2.1 TECNICAS HISTOLÓGICAS

Para estudiar la diferenciación celular las muestras se tiñeron con tinción de Hematoxilina-Eosina y Safranina O. Se llevó a cabo en la Unidad de Anatomía Patológica de los Servicios Científico Técnico del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

La tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E) corresponde a una mezcla de hematoxilina con eosina. La hematoxilina es un compuesto catiónico o básico que tiñe las estructuras ácidas (basófilas, como el núcleo), en tonos azules. La eosina tiñe los componentes básicos (acidófilos, como el citoplasma) de color rosado.

La safranina O es un colorante biológico catiónico (cargado positivamente). Esta característica le permite combinarse con estructuras de cargas negativas. Este proceso permitió la tinción de los glicosaminoglicanos (GAG) los cuales abundan en la matriz extracelular del cartílago articular y proteoglicanos (PGs) de la matriz.

La tinción de Safranina O consiste en teñir la muestra con Fast Green, se lava con ácido acético y posteriormente se incubó el tejido en el colorante safranina O, el cual se une a las cargas negativas. Finalmente se deshidrata el tejido con alcoholes y se aclara con xileno. Una vez montada la muestra con resina, podremos ver en el microscopio la matriz del tejido diferenciado a cartílago teñidas en rojo. Como control positivo se utiliza cartílago humano adulto.

2.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Para la evaluación de la diferenciación a cartílago se utilizó el sistema de evaluación basado en el sistema Bern Score (Grogan et al, 2006)

El sistema de Bern Score es una escala subjetiva que evalúa las características de las células diferenciadas a cartílago teñidas con safranina O y hematoxilina-eosina. Los tres parámetros que analiza son los siguientes:

- Uniformidad e intensidad de la tinción con Safranina O/Fast Green. Observaremos al microscopio si la tinción tiñe todas las estructuras y la intensidad con la que sucede
- Distancia entre células/cantidad de matriz producida. La mayor parte del neocartílago es mucho más celular que el cartílago nativo, por lo que

observaremos la distancia de células presentes, siendo una menor distancia un valor positivo para la diferenciación a cartílago

- Morfología celular, siendo un consenso general que una morfología redondeada es indicativo de fenotipo condrocítico y que la presencia de cuerpos necróticos, pícnicos o fibroblásticos son características negativas en la diferenciación condrogénica.

Cada una de estas tres categorías tiene 4 componentes con un rango de 0 a 3. La puntuación total es de 0 a 9. Una mayor puntuación se correlaciona con mayor grado de diferenciación de las muestras a tejido cartilaginoso.

Se observaron las preparaciones en un microscopio invertido PrimoVert Zeiss. La toma de fotografías se llevó a cabo con una cámara AxioCamERc 5S incorporada al microscopio y se utilizó un software ZEN 2012 SP1 para el procesado de las imágenes.

A. Uniformidad e intensidad* de la tinción con Safranina O/Fast Green	
No tinción	0
Poca tinción y pobre formación de matriz	1
Tinción moderada	2
Tinción con fuerte intensidad	3
B. Distancia entre células/cantidad de matriz producida	
Alta densidad celular sin matriz	0
Alta densidad celular con poca matriz	1
Moderada densidad celular con poca matriz	2
Poca densidad celular con moderada distancia entre células y matriz extendida	3
C. Morfología celular	
Cuerpos celulares Condensados/necróticos/plcnóticos	0
Cuerpos celulares fusiformes/fibrosos	1
Mezcla cuerpos fusiformes/fibrosos con morfología redondeada condrogénica	2
Mayoría redondeada/condrogénica	3

Tabla 2. Sistema de evaluación de diferenciación a cartílago in vitro según el sistema de Bern Score

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa Microsoft Excel versión 2013 para la recogida de datos, el análisis estadístico y la evaluación gráfica.

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

RESULTADOS

El objetivo del trabajo era estudiar el potencial condrogénico in vitro de células mesenquimales para sus posibles aplicaciones en regeneración condral en enfermedades osteoarticulares. No obstante, por la falta de tiempo, esto fue imposible de realizar y se procedió a estudiar muestras ya diferenciadas proporcionadas por el grupo.

1. CULTIVO CELULAR

Como ya he comentado, el objetivo era el estudio del potencial de diferenciación in vitro de las células mesenquimales aisladas de cartílago y de grasa subcutánea. Por lo que en los cultivos, la viabilidad celular fue superior al 95% y la morfología celular, fusiforme y fibroblástica.

2. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS MUESTRAS

Las células mesenquimales derivadas de grasa subcutánea y cartílago teñidas con Safranina y H-E en pases 1 y 3 se observaron con un microscopio invertido con objetivos 4x, 10x y 20x para la observación del área y de la diferenciación a cartílago, respectivamente.

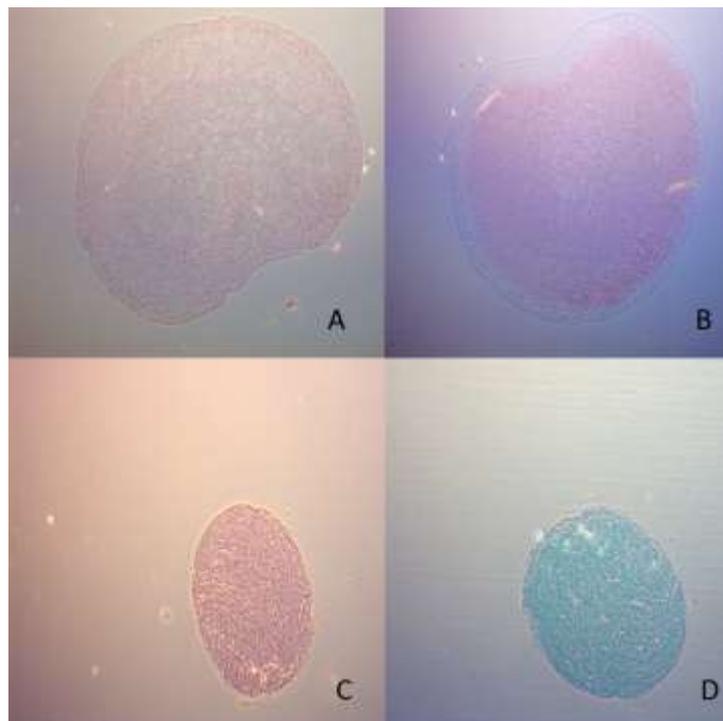


Figura 4. Muestras de tejido de una paciente de 71 años en pase 1 vistas por microscopía de campo claro, usando el objetivo 4x. (A) MSCs derivadas de cartílago teñidas con H-E. (B) MSCs derivadas de cartílago teñidas con Safranina O. (C) MSCs derivadas de grasa subcutánea teñidas con H-E. (D) MSCs derivadas de grasa subcutánea teñidas con Safranina O

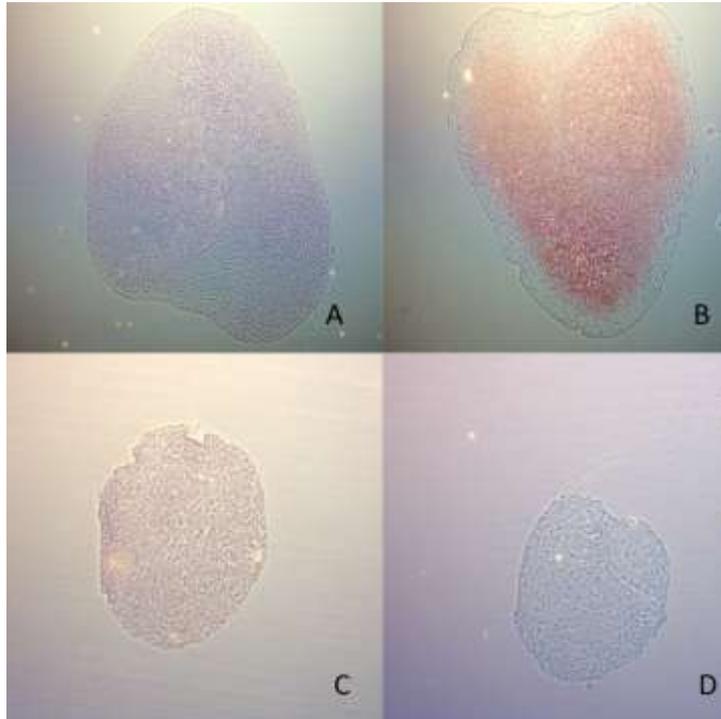


Figura 5. Muestras de tejido de una paciente de 71 años en fase 3 vistas por microscopía de campo claro, usando el objetivo 4x. (A) MSCs derivadas de cartílago teñidas con HE. (B) MSCs derivadas de cartílago teñidas con Safranina. (C) MSCs derivadas de grasa subcutánea teñidas con HE. (D) MSCs derivadas de grasa subcutánea teñidas con safranina

La valoración de diferenciación a cartílago se realizó observando las muestras con una lente x20 y aplicando el sistema de Bern Score (expuesta en el apartado 2.1 *Técnicas histológicas*). El criterio que se utilizó para determinar si la muestra había diferenciado a cartílago fue una puntuación alta en el sistema de Bern Score.

Las muestras de grasa subcutánea presentaron una pobre tinción a la safranina, alta densidad celular, células fibroblastoides y baja cantidad de matriz. La media de las puntuaciones fue de 4 en ambos pases, presentando así una diferenciación negativa a cartílago. Las muestras de cartílago presentaron una gran intensidad a la tinción con Safranina O, baja densidad celular, células de morfología redondeada y presentaban gran cantidad de matriz intercelular. Las medias de la puntuación fueron de 7 y 8 en primer y tercer pase respectivamente, presentando una diferenciación a cartílago positiva. (Tablas 3 y 4)

	Clasificación Safranina	Clasificación de la distancia	Clasificación de la morfología	Clasificación total	Diferenciación a cartílago
<u>PASE 1</u>					
Paciente 1	0	1	1	2	Negativa
Paciente 2	1	2	1	4	Negativa
Paciente 3	0	3	2	5	Negativa
Paciente 4	1	2	1	4	Negativa
<u>PASE 3</u>					
Paciente 1	1	3	3	7	Positiva
Paciente 2	0	3	1	4	Negativa
Paciente 3	1	2	2	5	Negativa
Paciente 4	0	1	1	2	Negativa

Tabla 3. Puntuación en el sistema de evaluación Bern Score de las MSCs derivadas de tejido graso subcutáneo

	Clasificación Safranina	Clasificación de la distancia	Clasificación de la morfología	Clasificación total	Diferenciación a cartílago
<u>PASE 1</u>					
Paciente 1	3	2	3	8	Positiva
Paciente 2	3	3	3	9	Positiva
Paciente 3	3	2	2	7	Positiva
Paciente 4	3	2	2	7	Positiva
<u>PASE 3</u>					
Paciente 1	3	3	3	9	Positiva
Paciente 2	3	3	3	9	Positiva
Paciente 3	1	2	3	6	Positiva
Paciente 4	3	3	3	9	Positiva

Tabla 3. Puntuación en el sistema de evaluación Bern Score de las MSCs derivadas de tejido cartilaginoso.

Analizando la media del área y diámetro de las muestras, podemos observar que en el pase 1, el área del tejido cartilaginoso es aproximadamente 6 veces mayor que la del tejido graso subcutáneo y en el pase 3 esta misma diferencia fue 4 veces mayor.

Los resultados del diámetro muestran que el tejido cartilaginoso es 2 veces mayor en el pase 1 y 2,5 veces mayor en el pase 3 (Tablas 7 y 8)

	Pase 1	Pase 3
Grasa subcutánea	0,40mm ² ±0,02	0,50mm ² ±0,2
Cartílago	2,55mm ² ±0,5	2,18mm ² ±0,5

Tabla 7. Valoración histológica de la diferenciación in vitro a cartílago del pase 1. Los valores muestran la media ± desviación estándar del área de los cuatro pacientes

	Pase 1	Pase 3
Grasa subcutánea	0,68mm ±0,02	0,80±0,18
Cartílago	1,77mm±0,19	1,64±0,27

Tabla 8. Valoración histológica de la diferenciación in vitro a cartílago del pase 3. Los valores muestran la media ± desviación estándar del área de los cuatro pacientes

Se analizaron los valores de las medias de las áreas en tejido subcutáneo y cartílago en pase 1 y pase 3.

En la comparación de la muestra de tejido subcutáneo se observó que las áreas de los pacientes 1, 3 y 4 presentaban un aumento en el tercer pase, en cambio la muestra del paciente 2 era ligeramente mayor en pase 1. La mayor diferencia se da en el paciente 1, en el que el pase 3 fue 4,5 veces mayor que el primer pase. (Figura 6, A)

En la comparación de la muestra de tejido cartilaginoso se observó un mayor crecimiento del primer pase con respecto al pase tercero en todos los pacientes excepto en el paciente 4, que fue mayor el crecimiento en pase 3. (Figura 6, B).

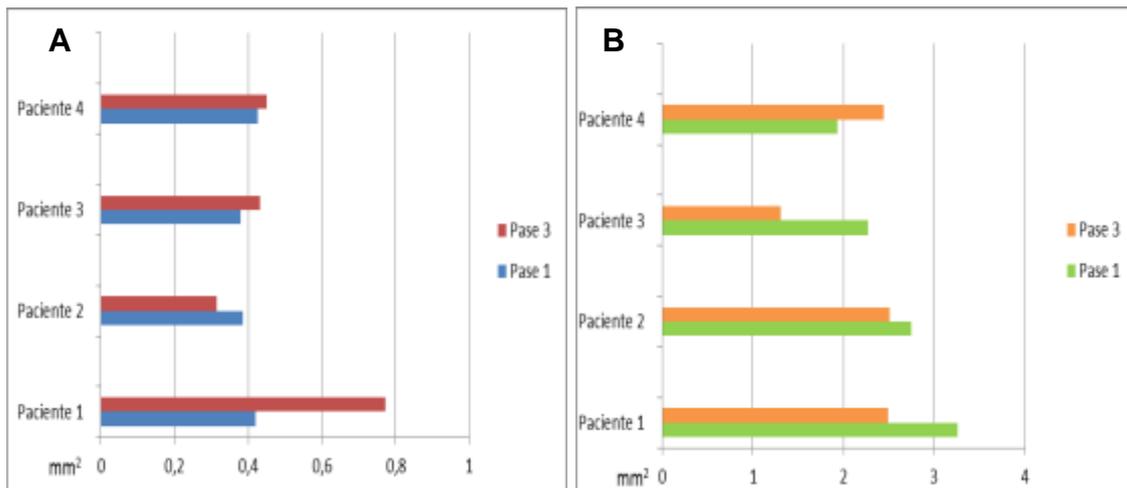


Figura 6. Comparación de las áreas de: (A) tejido subcutáneo en fase 1 y fase 3 y (B) tejido cartilaginoso en fase 1 y fase 3

Cuando se analizan los tejidos en relación a los pases, en las muestras tanto del pase 1 (Figura 7, A) como del pase 3 (Figura 7, B) se observa que todas las áreas de tejido cartilaginoso son mayores que las de tejido subcutáneo.

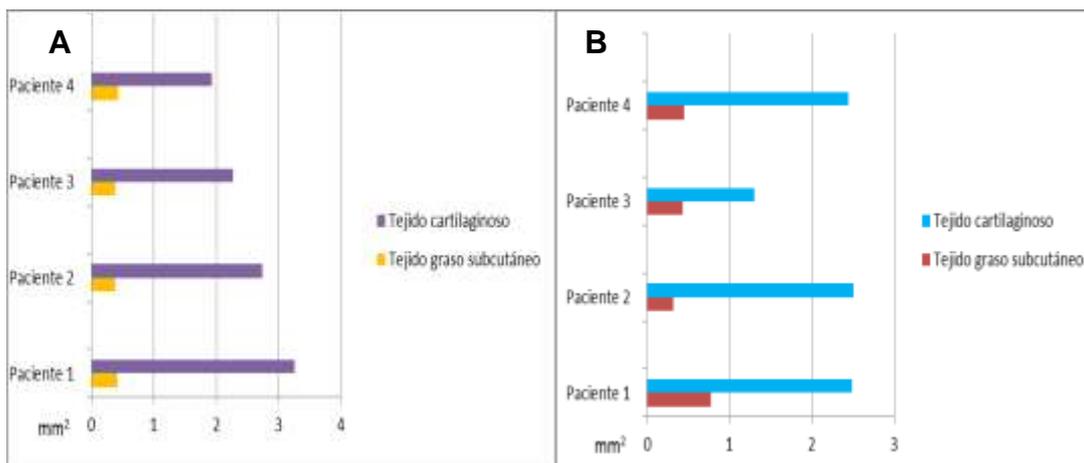


Figura 7. Comparación de las áreas de: (A) tejido cartilaginoso y subcutáneo en fase 1 y (B) tejido cartilaginoso y subcutáneo en fase 3

Por último, se realizó una comparación de la media de los diámetros en ambos pases. Los resultados muestran que el diámetro de la muestra derivado de tejido cartilaginoso es en todos los casos mayor que el diámetro de la muestra obtenida a partir de tejido graso subcutáneo, independientemente de los pases. (Figura 8, A y B)

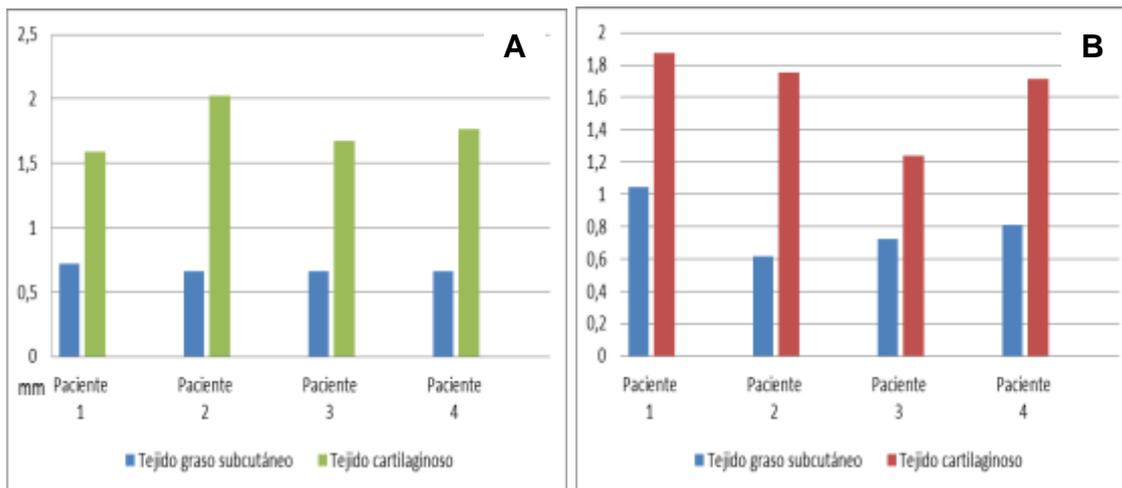


Figura 8. Comparación de los diámetros en (A) tejido subcutáneo y cartilaginoso en fase 1 y (B) tejido subcutáneo y cartilaginoso en fase 3.

En la comparación de los diámetros según los tejidos se puede observar que sigue una distribución similar a la que seguían las áreas. En el tejido graso subcutáneo, el paciente 2 muestra un diámetro ligeramente inferior en el pase 3, al contrario que el resto de pacientes (Figura 9, A). En cambio, en el tejido cartilaginoso el paciente 1 es el que muestra un leve mayor diámetro en el tercer pase, mientras que los otros tres pacientes el mayor diámetro se da en el pase 1. (Figura 9, B)

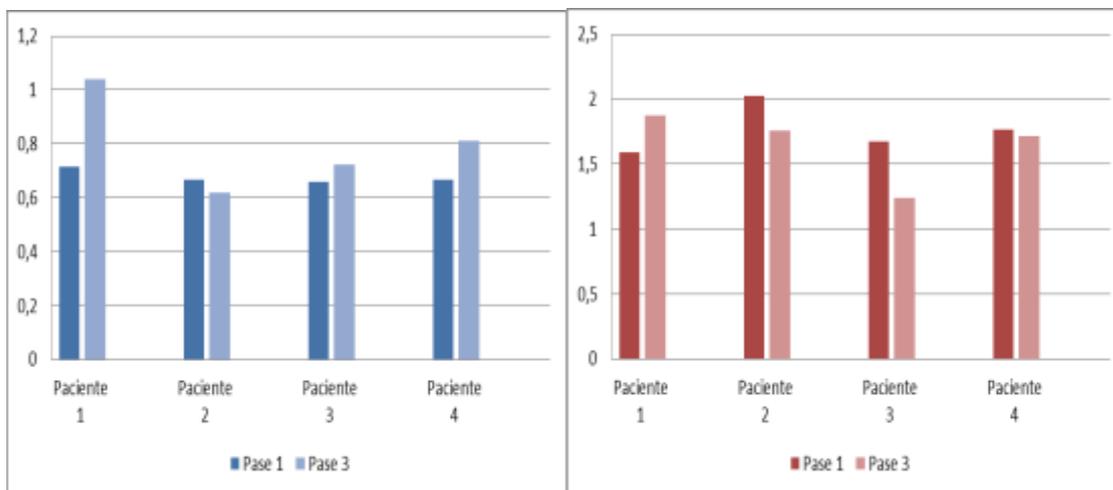


Figura 9. Comparación de las diámetros en (A) tejido subcutáneo en fase 1 y fase 3 y (B) tejido cartilaginoso en fase 1 y fase 3

DISCUSIÓN

El escaso número de MSCs que se encuentran en la médula ósea hizo necesario que se comenzasen a investigar otras fuentes de obtención distinta, entre las que se encontraba el cartílago y la grasa subcutánea. Es necesario determinar si las MSCs derivadas de estos tejidos tienen el potencial de diferenciación para regeneración condral.

En este estudio hemos analizado el potencial de diferenciación condrogénica in vitro de células mesenquimales de diferentes tejidos, valorando los cortes teñidos con Safranina O y hematoxilina-eosina mediante el sistema Bern Score y midiendo el crecimiento del área en orden de intentar identificar si diferencian positivamente a la línea condroide. Con este propósito en mente hemos analizado muestras obtenidas de 4 pacientes.

Los resultados de nuestro estudio muestran una mayor diferenciación a cartílago de las MSCs derivadas de cartílago frente a las MSCs obtenidas de tejido subcutáneo de las que únicamente diferenciaron positivamente sólo el paciente 1 en pase 3. A partir de estos resultados podemos concluir que la muestra derivada de cartílago presenta una diferenciación superior que la derivada de tejido subcutáneo.

En nuestro estudio, las muestras derivadas de tejido subcutáneo de los pacientes 3 y 4 en el pase 3 presentaron un leve crecimiento con respecto al pase 1, aunque las diferencias fueron mínimas. En cambio, en la muestra del paciente 2 sucedió al contrario, pero igualmente las diferencias siguen siendo mínimas, por lo que no son suficientemente significativas para ser consideradas como crecimiento superior. En el pase 3 del paciente 1, el área obtenida fue 4,5 veces mayor que el primer pase, esto podría ser debido a la variabilidad interpaciente o algún error de manipulación en el cultivo de la micromasa. En relación al crecimiento de las muestras derivadas de tejido cartilaginoso en ambos pases, vemos que hubo un mayor crecimiento en el primer pase. Esto es debido a que después de cada tripsinización, las células van perdiendo progresivamente la capacidad de diferenciarse, y por tanto, disminuir su crecimiento.

Respecto al área de las muestras con respecto al tejido de origen, al comparar las muestras derivadas de grasa subcutánea con las derivadas de tejido cartilaginoso en pases 1 y 3, las MSCs derivadas de cartílago presentaron un área mayor en ambos pases. Este hecho se relaciona con que las muestras derivadas de tejido cartilaginoso diferenciaron mejor a cartílago. Los resultados del diámetro confirman las medidas de las áreas, sin embargo, los cortes no tienen una forma regular, por lo que al calcular el diámetro pudo haber variaciones.

Por lo tanto, las muestras diferenciadas a partir de cartílago poseen una puntuación más alta que las de grasa subcutánea, que se corresponde con una mayor área en las de cartílago. De esta manera, podemos concluir que cuanto mayor es el área de las muestras, mayor puntuación y mejor diferenciación se obtiene.

Cabe resaltar que los resultados obtenidos en este estudio, al ser una muestra muy pequeña, no son extrapolables a la población general, por lo que sería conveniente repetirlos con una muestra más amplia. Sin embargo, estos resultados son alentadores, ya que se han observado una buena diferenciación condrogénica en las

MSCs derivadas de cartílago, a pesar de ser pacientes de edad avanzada, por lo que abre la puerta a posibles tratamientos clínicos con células autólogas.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado el potencial de diferenciación a cartílago de las MSCs procedentes de distintos tejidos.

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

- La diferenciación a cartílago es mayor en las muestras derivadas de tejido cartilaginoso que en las derivadas de grasa subcutánea.
- Las muestras derivadas de cartílago presentaron un área mayor con respecto a las derivadas de grasa subcutánea en ambos pases. En el pase 1 el crecimiento fue 6 veces mayor, y en el pase 3 fue 4 veces mayor.
- Los resultados obtenidos del diámetro confirman las medidas de las áreas, a pesar de que los cortes no tienen una forma regular.
- Hay una correlación positiva entre el área de las muestras, la puntuación en el sistema de evaluación Bern Score y la diferenciación a cartílago.
- La muestra es demasiado pequeña como para que los resultados sean extrapolables en la población, por lo que serían necesarios estudios posteriores con muestras más amplias.

BIBLIOGRAFÍA

- **Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, Rivera F, Minguell JJ, Conget PA.** Dynamic of distribution of human bone marrow–derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation* 2004; 78: 503–8.
- **Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., & Lotz, M.** Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 2004; 50(5), 1522-1532.
- **Ambrosio, C., Zomer, H., Vidane, A., & Gonçalves, N.** Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells And Cloning: Advances And Applications*, 2015; 125.
- **Barba, M., Cicione, C., Bernardini, C., Michetti, F., & Lattanzi, W.** Adipose-Derived Mesenchymal Cells for Bone Regeneration: State of the Art. *Biomed Research International*, 2013, 1-11.
- **Bianco P, Robey PG, Simmons PJ.** Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell stem cell*. 2008; 2(4):313-319.
- **Bergman R, Gazit D, Kahn A, Gruber H, McDougall S, Hahn T.** Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1996; 11(5), 568-577.
- **Buckwalter J, Mankin H.** Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*. 1998; 47:487-504.
- **Can, A, Turk J.** A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Hematol*, 2008; 25, 57-59.
- **Diekman B, Rowland C, Lennon D, Caplan A, Guilak F.** Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix. *Tissue Engineering Part A*, 2009; 16(2), 523-533.
- **Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Staper Cortenbach I, Marini F, Krause D et al.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8:315-317
- **Flores-Figueroa E, Montesinos J, Mayani, H.** Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de investigación clínica*, 2006;58(5), 498-511
- **Friedenstein J, Deriglasova F, Kulagina N, Panasuk F, Rudakowa S, Lueria E.** Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974; 2:83 -92.
- **Grogan S, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons J, O’Driscoll S. et al.** Visual Histological Grading System for the Evaluation of in Vitro –Generated Neocartilage. *Tissue Engineering*, 2006; 12(8), 2141-2149
- **Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W.** A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth. *Bone marrow delivers software not hardware. Circ Res* 2004; 94: 573–4
- **Herzog E, Chai L, Krause D.** Plasticity of marrow–derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483–93.
- **Horwitz E.** Transplantability and therapeutic effects of bone marrow–derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5: 309–1
- **Hua P, Liu J, Tao J, Yang R.** Application and Progress of Combined Mesenchymal Stem Cell Transplantation in the Treatment of Ischemic Cardiomyopathy. *BioMed Research International*, 2015, 568502.

- **Hwang S, Varghese S, and Elisseeff, J.** Derivation of chondrogenically-committed cells from human embryonic cells for cartilage tissue regeneration. *PLoS One* 3, e2498, 2008.
- **Javanzon E, Beggs K, Flake A.** Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004; 32: 414–25.
- **Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koc ON.** Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T–cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 597–604.
- **Marquez-Curtis L, Janowska-Wieczorek A, McGann L, Elliott J.** Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015; 71(2):181-197.
- **Martínez-Lorenzo MJ, Royo-Cañas M, Alegre-Aguarón E, Desportes P, Castiella T, García-Alvarez F, Larrad L.** Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. *J Orthop Res*. 2009 Nov; 27(11):1499-507.
- **Owen M, Friedenstein AJ.** Stromal stem cells: marrow–derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium* 1988; 136: 42–60
- **Pak J, Lee, J, Kartolo W, Lee, S.** Cartilage Regeneration in Human with Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Current Status in Clinical Implications. *Biomed Research International*, 2016, 1-12.
- **Pardo, V** Células madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas Scientiarum*, 2005; 10(1), 5-14.
- **Piersman A, Ploemacher R, Brockbank K.** Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *Br J Haematol* 1983; 54: 285–90.
- **Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal A, Douglas R, Mosca J, Marshak D.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284(5411), 143-147.
- **Quinn T, Hunziker E, Hauselmann H.** Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13, 672.
- **Ramos Ibeas, P.** Effect of origin and culture conditions on the heterogeneity of pluripotent cell populations. *UCM*; 2015.
- **Romero J, Guerrero D, Pardo, V.** Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. 2007; *Nova*, 5(8)
- **Sekiya I, Larson B, Smith J, Pochampally R, Cui J, Prockop D.** Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 2002; 20: 530–41
- **Serrato Ochoa D, Aguilera Méndez A, Nieto Aguilar R,** Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa. *Investigación y Ciencia* 2015;2361-69
- **Somoza R, Welter J, Correa D, Caplan A.** Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 Dec; 20(6):596-608.
- **Tuan R, Boland G, Tuli R.** Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy*, 2003; 5(1), 32-45.
- **Yang H, La W, Bhang S, Kim H, Im G, Lee H, et al.** Hyaline cartilage regeneration by combined therapy of microfracture and long-term bone morphogenetic protein-2 delivery. *Tissue Eng Part A* 17, 1809, 2011