

COMPARACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOSO

COMPARISON OF DIFFERENT PROTOCOLS FOR THE CULTIVE OF MESENCHYMAL STEM CELLS OF ADIPOSE ORIGIN

Roberto Estrada¹, Patricia Venegas^{2*}

Recibido: 30-04-07

Aceptado: 18-05-07

RESUMEN

La literatura internacional reporta diferentes protocolos de aislamiento y cultivo para las células madre de origen adiposo (ADSC). Aunque una gran parte de los protocolos de aislamientos son efectivos, se ha podido determinar que en la mayoría de los casos en que se utilizan los protocolos de cultivo planteados se dan crecimientos celulares muy pobres. En esta investigación se montaron las células en botellas de cultivo de 25 cm² en cuatro medios diferentes: Medio Amniomax (GIBCO) (medio 1); Medio Ham's F10 suplementado con 10% SFB, 1% antibiótico y ajustado para tener 2mm de L-Glutamina (medio 2); Medio Ham's F10 suplementado con 10% SFB, 1% de antibióticos y ajustado para alcanzar 4mm de L-Glutamina (medio 3) y Medio Ham's F10 suplementado con 20% de Suero Autólogo (SA), 1% de antibióticos y ajustado para alcanzar 4mm de L-Glutamina (medio 4). Después de realizado este experimento se

logró determinar que con el medio 1 se obtenían crecimientos celulares marcadamente más rápidos que con los otros medios, consiguiéndose niveles confluentes en un lapso de 9 días (aproximadamente 6 millones de ADSC).

PALABRAS CLAVE: células madre mesenquimales, tejido adiposo.

ABSTRACT

International literature reports different protocols for the isolation and cultivate of adipose stem cells (ADSC). Although majority of the isolation protocols are effective, it has been determined that in most of the cases in which these cultivate protocols are used, the cell growth rates are poor. Being the stem cells one promising therapeutic option, the group experimented with different cultivate media to improve the times of cultivate. In this investigation, the cell pellet was planted in a 25 cm² cultivate bottle in four different media: Amniomax

1. Escuela de Veterinaria. Universidad Nacional de Costa Rica. Heredia, Costa Rica.

2. Sección de Citogenética. División de Hematología. Laboratorio Clínico. Hospital Nacional de Niños. CCSS. San José, Costa Rica.

* Correspondencia.

Media (GIBCO) (medium 1); Ham's F10 Media supplemented with 10% SFB, 1% antibiotic and adjusted to 2mm de L-Glutamina (medio 2); Ham's F10 Media supplemented with 10% SFB, 1% antibiotic and adjusted to 4mm de L-Glutamina (medium 3) and Ham's F10 supplemented with 20% of autologous serum (SA), 1% antibiotic and adjusted to 4mm de L-Glutamina (medium 4). This experiment determines that medium 1 stimulates faster growth rates than the others, obtaining confluent levels in 9 days (approximately 6 million ADSC).

KEY WORDS: mesenchymal stem cells, adipose tissue.

INTRODUCCIÓN

Las células madre se caracterizan por su habilidad de renovación y su potencial de diferenciación, y pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: las embrionarias y las adultas. En el caso de las embrionarias se derivan de las células del blastocisto, las cuales tienen el potencial de diferenciarse en todas las líneas celulares, generando así un organismo (totipotenciales). En el caso de las células madres adultas, éstas son poblaciones celulares menores que se encuentran en los órganos de animales adultos y no tienen el potencial de formar un organismo completo, pero se pueden diferenciar en líneas celulares específicas. Las células madre mesenquimales (MSC) pertenecen a este grupo (1).

Las MSC poseen mucho potencial en la aplicación clínica por su capacidad de expansión in vitro e in vivo y de diferenciarse en varias líneas celulares,

incluyendo osteocitos, condrocitos, miocitos, cardiomiocitos, adipocitos, tenocitos, vasos sanguíneos y neuronas (2-10).

La ingeniería tisular ofrece una opción prometedora para la reparación o regeneración de tejidos dañados o enfermos. No obstante, la fuente o el protocolo de extracción y cultivo ideal para obtener este tipo de células no se ha definido aún. Algunas de las propiedades que hacen que las MSC adultas sean bien vistas en la medicina regenerativa son: facilidad de recolección por medio de transplantes autólogos, tasas de proliferación altas en expansiones ex vivo y capacidad de diferenciación multilinear (4).

El tejido adiposo se deriva del mesodermo y contiene una población microvascular de células endoteliales, músculo liso y células madre. Estas pueden ser enzimáticamente extraídas del tejido adiposo y separadas de los adipositos por centrifugación y filtración. Una vez realizado este procedimiento una población más homogénea emerge en condiciones de cultivo celular.

Esta población (llamada Células Madre Derivadas de Tejido Adiposo, ADSC por sus siglas en inglés) comparte muchas características de su contraparte en médula ósea, incluyendo su potencial proliferativo y su habilidad de diferenciación multilinear (4, 9, 10, 12), con la ventaja de que se ha determinado que existe una concentración hasta 40 veces más células madre en una muestra de grasa que en una de médula ósea (4, 12).

Hay una gran cantidad de literatura que define protocolos de cultivo para

las ADSC (4, 5, 9, 10, 12). Aún así, en nuestra experiencia los crecimientos celulares son pobres y se requiere de un tiempo muy prolongado para obtener una concentración alta de células in vitro, y en algunos casos las células nunca llegan a crecer.

Siendo las células madre una línea de terapia tan promisorias, nos dimos a la tarea de tratar de mejorar estos tiempos de cultivo, con el fin de que eventualmente un paciente que necesite ser tratado pueda recibir una alta concentración de células madre purificadas lo más rápido posible. Esto es de vital importancia en el tratamiento de lesiones isquémicas, nerviosas y algunas lesiones ortopédicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción del tejido adiposo

El tejido adiposo fue extraído quirúrgicamente de equinos referidos al Hospital de Especies Mayores de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Aproximadamente se extraían de 20 a 30 gramos de grasa de la zona abaxial proximal de la base de la cola y ésta se colocaba en un recipiente con una solución isotónica estéril. Una vez empacada, la grasa se mantenía en frío hasta llegar al laboratorio.

Aislamiento, cultivo y recuperación de las células

La muestra de tejido adiposo con el medio de transporte se manipula dentro de un ambiente controlado en una cámara de flujo laminar. Ahí se extrae la muestra del recipiente y se procede a picarla en pequeños trozos para

facilitar de esta manera el efecto de la colagenasa.

Los trozos obtenidos se lavan extensivamente con PBS; posteriormente, la muestra se procesa a 37 °C por treinta minutos con colagenasa al 0,075%. Al finalizar esto se centrifuga a 1200 x g por 10 minutos, descartando luego el sobrenadante para obtener así el botón celular (10).

El botón celular se resuspende en 10ml de medio de crecimiento (Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con 10% Suero Fetal Bovino (SFB)) para poder filtrarlo y además inactivar la colagenasa residual. Una vez en el medio se procede a pasarlo por un filtro de gasa estéril para remover de esta forma los detritos celulares. Ya filtrado se centrifuga nuevamente para concentrarlo. El botón celular obtenido se conoce como Fracción Estromal Vascular (SVF). Una vez que ésta se obtiene se procede a realizar una incubación de 12 horas, manteniéndose a 37° C/5% CO₂ en el medio de crecimiento (10).

Luego de la incubación se deben realizar lavados extensivos con PBS para remover los eritrocitos residuales no adherentes. La población restante se conoce como Lipoaspirado Procesado (PLA), para distinguirlo del SVF obtenido del tejido adiposo extraído. Las células del PLA se mantienen a 37° C/5% CO₂ en el medio de crecimiento hasta el momento en que haya confluencia de las mismas (10).

Una vez confluentes se procede a tripsinizar las células de la botella de la siguiente manera: se decanta el sobrenadante de la botella y las células

adheridas se lavan con 5ml de PBS 1x. Las células adheridas a la botella se lavan con 5 ml de tripsina, hecho esto se descartan 4ml y se incuban 5 minutos a 37 °C (10).

Las células tripsinizadas se resuspenden en el medio de cultivo descrito anteriormente, para de esta manera inactivar la enzima. Luego de esto se montan en la cámara Neubauer para proceder a contar las MSC y así, lograr la concentración deseada (10, 13).

Identificación de las células aisladas

Morfología de las células en cultivo

Para determinar la morfología y el comportamiento de las células en cultivo se procedió a comparar la morfología de los diferentes cultivos a lo largo de su expansión en la botella de 25 cm² y después de los pasajes. Para observar su morfología y comportamiento se utilizó un microscopio de luz invertido.

Esta parte es fundamental, ya que se reporta en diferente literatura científica que las ASDC presentan una morfología tipo fibroblasto y que esta morfología se mantiene constante a lo largo de varias semanas de cultivo y pasajes (1, 4, 9, 10). Se reporta que el cultivo de ASDC normalmente es muy homogéneo y presenta baja concentraciones de otros tipos de células (10).

Tinciones histopatológicas

Se tripsinizaron las células de la botella de cultivo y luego fueron montadas en PBS; una vez en suspensión se centrifugaron y se prepararon de manera que se formara una monocapa.

En algunos casos también se realizó citología por medio de frotis simples.

Luego de ser montadas y fijadas se procedió a correr un panel de tinciones. La H/E y el Giemsa son tinciones básicas que se realizaron con el fin de determinar sus características morfológicas. En el caso de la tinción de PAS, ésta se realizó porque van a teñirse como positivos (color magenta) a ella carbohidratos y complejos carbohidrato-proteína que se encuentran normalmente en estructuras como glicosaminoglicanos, mucoproteínas, matriz de cartílago y otros. Luego, se procedió a realizar la tinción metacromática y el azul alsaciano, los cuales tiñen mucopolisacáridos y en el caso de la metacromática, específicamente a mucopolisacáridos ácidos. Son positivas a estas tinciones histoquímicas secreciones celulares como matriz cartilaginosa u ósea, tejido conjuntivo y mucina (14).

Citometría de flujo

Con el fin de caracterizar inmunofenotípicamente las células aisladas por medio de una citometría de flujo, se procedió a enviar una muestra de células al Laboratorio de Investigación del Hospital de Niños, para que fuera analizada por la Dra. Berta Valverde. La caracterización de las células se hace mediante técnica de doble y triple marcaje de inmunofluorescencia directa, empleando AcMo combinados con fluoresceína, ficoeritrina, PerCP y APC. El análisis se efectuó en un Citómetro de Flujo (FACScalibur, Becton Dickinson, San José, C.A.), mediante los programas CELLquest y PAINT-A-

GATE (Becton Dickinson, San José, C.A.), explorándose al menos 10.000 células por antígeno (Porras, 2006).

El panel de AcMo incluye los siguientes anticuerpos monoclonales al diagnóstico: CD13, CD44, CD34, y CD45; siendo los dos primeros marcadores reportados como positivos para las ADSC, según la literatura científica, y los últimos dos se utilizaron como un control negativo, ya que son específicos de células hematológicas (1, 4, 9).

Implantación en ratones

En otro intento por identificar las células se procedió a inyectar ADSC subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, con el fin de determinar si se producía algún tipo de reacción. Esto debido a que Rubio *et al* reportan que cuando las ADSC se utilizan con pocos pasajes no existe ningún tipo de rechazo o reacción adversa en el animal.

En este experimento se inyectaron 250.000 ADSC con cuatro pasajes subcutáneamente en ratones inmunosupresos con corticosteroides. Después, se esperó un tiempo prudencial (22 días aproximadamente) para determinar si se presentaba algún problema.

Comparación de los tiempos de cultivo

En pro de mejorar los tiempos de expansión obtenidos en experimentos previos, se procedió a comparar los crecimientos en distintos medios. Se montaron las células del PLA en diferentes medios de cultivo para

determinar de esta manera cual medio favorecía más el crecimiento y la expansión celular.

En este experimento se montaron las células en botellas de 25 cm², en cuatro medios diferentes: Medio Amniomax (GIBCO) (medio 1); Medio Ham's F10 suplementado con 10% SFB, 1% antibiótico y ajustado para tener 2mm de L-Glutamina (medio 2); Medio Ham's F10 suplementado con 10% SFB, 1% de antibióticos y ajustado para alcanzar 4mm de L-Glutamina (medio 3) (1, 6, 10) y Medio Ham's F10 suplementado con 20% de Suero Autólogo (SA), 1% de antibióticos, y ajustado para alcanzar 4mm de L-Glutamina (medio 4) (5).

RESULTADOS

Identificación de las células aisladas

Morfología de las células en cultivo

Una vez en cultivo se presentaron como una población homogénea de células elongadas, filiformes, granulares y con digitaciones (tipo fibroblasto). Estas mantuvieron su morfología por periodos de cultivo relativamente prolongados (1 mes).

Tinciones histopatológicas

Al realizar las tinciones de H/E y Giemsa se pudo determinar que se trataban de células de gran tamaño, granulares, núcleos grandes y nucleolos prominentes; estos hallazgos son comunes en células primitivas. Al realizar histoquímica con las tinciones de PAS, Azul Alsaciano y Azul de Toluidina las células fueron teñidas

positivamente. Esta histoquímica efectuada tiñe los mucopolisacáridos que normalmente se encuentran en tejidos de origen mesenquimal.

Citometría de Flujo

Luego de realizar un panel de AcMo con CD34, CD13, CD44 y CD45, se obtuvieron los siguientes resultados: células autofluorescentes (probablemente debido a que los anticuerpos monoclonales son anti-humano y no anticaballo), viables, altamente granulares y de gran tamaño.

Formación de teratomas en ratones

Al implantar subcutáneamente las células en los ratones inmunosupresos no se presentó formación de ningún tipo de masa tumoral, ni ningún tipo de proceso inflamatorio o alteración al tejido.

Comparación de los tiempos de cultivo

Los primeros días del cultivo las células presentaban una morfología redondeada. Ya para el día 2 se empezó a observar cómo algunas de estas células presentaban digitaciones y se elongaban. Por otra parte, las células empezaron a formar colonias que iban creciendo con el paso de los días.

A los 5 días de cultivo el medio 2 presentó un 5% de confluencia, mientras que el medio 3 mostraba un 10% de confluencia. En el caso del medio 1, éste presentó un 40% de confluencia. Paralelo a esto, en el medio 4 las células aisladas murieron.

A los 7 días de cultivo las células en el medio 1 ya presentaban un 65% de confluencia, mientras que en los medios 2 y 3, en cuanto al crecimiento celular, se pudo observar un aumento muy leve de la población celular. A la vez, este día se procedió a realizar el primer pasaje de las células en el medio 1.

Al día 9 de cultivo las células del medio 1 mostraron un 95% de confluencia y se procedió a tripsinizar, con el fin de realizarles estudios histoquímicos e inmunofenotípicos. Un tercio de estas células se montaron de nuevo en 2 subcultivos con el medio 1, alcanzándose el 100% de confluencia en 2 días.

Para este momento los medios 2 y 3 presentaban muchas células desprendidas y el crecimiento se había estabilizado en aproximadamente un 20% de confluencia. En estos casos no se realizó ningún pasaje, porque nunca se logró obtener una concentración de células respetable.

DISCUSIÓN

Las células madres mesenquimales han recibido gran interés por su capacidad de auto-replicación y multipotencialidad para su uso clínico (15). Friedenstein *et al* demostraron que las MSCs crecían como focos de células, con morfología semejante a fibroblastos denominados: unidades de fibroblastos formadoras de colonias. Con base en dicha característica y a su particularidad de adherirse a frascos de cultivos plásticos es que en este experimento se estudiaron diferentes medios de cultivo. Por lo tanto, se procedió a determinar cual medio de cultivo sería el más eficiente para lograr la proliferación

celular en el menor tiempo posible, en pro de ser utilizado potencialmente como regeneradores tisulares.

Se ha podido determinar que los protocolos de aislamiento de células madre mesenquimales de tejido adiposo son altamente específicos, ya que presentan una baja contaminación con otras líneas celulares (9). Es por esto que inclusive Boquest *et al* citan que uno de los métodos de validación final para determinar el éxito del aislamiento de este tipo de células es el crecimiento de células tipo fibroblasto (fibroblastic-like morphology) en el cultivo, después de aplicado el protocolo de aislamiento. Además, según Fortier & Smith, para determinar que se está en presencia de una célula madre mesenquimal el panel de anticuerpos monoclonales mínimo que se debe correr tiene que ser positivo a CD44 y negativo a CD34 y CD45 (17). Al aplicar el protocolo de aislamiento al tejido adiposo humano se obtuvieron células con la misma morfología y características de cultivo que las aisladas de grasa equina. Al realizar estudios inmunofenotípicos se logró determinar que estas células eran negativas a CD45 y CD34 y positivas a CD13 y CD44 (material no publicado). Una vez aisladas estas células e identificadas por sus diferentes características, se procedió a realizar una comparación de los diferentes medios de cultivo, con el fin de determinar cuál daba el mejor rendimiento en cuanto a crecimiento celular se refiere.

Analizando los diferentes medios de cultivos se observó que existía una diferencia significativa en cuanto al crecimiento celular cuando se comparaba el medio 1 con el resto de

los medios. Aun así, en los medios 2 y 3 hubo crecimiento de células tipo fibroblasto, pero con una tasa de crecimiento muy baja.

Es probable que la diferencia en el crecimiento celular entre los medios utilizados sea la alta concentración de suero fetal bovino que presenta el Amniomax. Esto coincide con lo reportado por Boquest *et al*, donde para aumentar la eficiencia del crecimiento celular se utilizan concentraciones de hasta 50% de suero fetal. Los otros medios de cultivo utilizados en estos experimentos, evidentemente, no reunieron los requerimientos nutricionales necesarios para lograr el crecimiento de dichas células.

La utilización del Amniomax como una vía para mejorar la tasa de crecimiento celular nos da una opción viable para poder obtener altas concentraciones de ADSC en un periodo muy corto. Esto es de vital importancia, ya que si en un mediano plazo se utilizaran estas células con fines terapéuticos se le podrían reimplantar al paciente poco tiempo después de tomada la muestra de tejido adiposo.

Aunque los resultados son prometedores, es de vital importancia continuar con investigaciones que determinen la estabilidad genética de las células y la capacidad de diferenciarse en distintas líneas celulares después de estar expuestos a ese medio de cultivo.

Las ADSC han probado tener un enorme potencial clínico para la regeneración de tendones, ligamentos, cartilago, hueso, músculo y meniscos, así como problemas isquémicos y autoinmunes. Otros estudios han determinado su potencial de diferenciación en

cardiomocitos, músculo esquelético, tejido adiposo, células endoteliales y precursores nerviosos (1, 4-6, 9, 10, 12). Lo anterior hace que esta línea de terapia tenga una gran cantidad de aplicaciones clínicas en el tratamiento de muchas patologías comunes en la práctica médica cotidiana. Por tanto, es el deseo de los autores que los conocimientos adquiridos con este trabajo sean la base para que se realicen posteriores investigaciones en esta área, enriqueciendo así la profesión y dándole al médico costarricense la opción de implementar esta línea de terapia de manera que pueda solucionar problemas clínicos de una forma más eficiente.

REFERENCIAS

1. Rubio D, García J, Martín M, De la Fuente R, *et al.* Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res* 2005; 65: 8.
2. Abousleiman R, Mc Fetridge P, Vassiliou S. Mechanically stimulated mesenchymal stem cells from tendon-like tissue. [En línea]. En: Biomaterials for Tissue Engineering II, AICHE Annual Meeting, San Francisco, CA, USA. 2006.
3. Dahlgren LA. Review of treatment options for equine tendon and ligament injuries: what's new and how do they work?. [En línea]. En: 51st Annual Convention American Association Equine Practitioners. Seattle, Washington, USA. Dic 3-7 2005.
4. Strem B, Hicok K, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber R, *et al.* Multipotential Differentiation of Adipose Tissue - Derived Stem. *Keio J Med* 2005; 54: 132-141.
5. Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt, Jan E. In Vitro Expansion of Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability. *Stem Cells* 2005; 23: 1357-1366.
6. Ji Gang E, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, *et al.* Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood. *Stem Cells* 2004; 22: 617-624.
7. Gimble JM, F Guilak. Adipose derived stem cells: isolation, characterization and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5: 362-369.
8. Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 1033.
9. Zuk P, Zhu M, Ashjian P, *et al* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13: 4279.
10. Zuk P, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell W, Katz A, *et al.* Multilineage cell from human adipose tissue implications for cell - based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7: 211-227.
11. Young R, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of Mesenchymal Stem Cells in a Collagen Matrix for Achilles Tendon. *Repair J Ortho Res* 1998; (16): 406.
12. Boquest A, Shahdadfar A, Brinchmann J, Collas P. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. *Methods in Molecular Biology* 2006; 325: 35-46.
13. Herrero L, Hun L. Procedimientos en virología médica. 2 ed. Publicaciones Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 2002.
14. Banks W. Histología Veterinaria Aplicada. Editorial El Manual Moderno. D.F., México. 1986.
15. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-74.
16. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, kulagina NN. Fibroblast precursor in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4:267-274.
17. Fortier L, Smith RK. Evidence of stem cells in cartilage regeneration. En: 53th Annual Convention American Association Equine Practitioners. Orlando, Florida, USA. 2007.