

## Aislamiento y caracterización de células “stem” mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular

Viviana Marcela Rodríguez-Pardo<sup>1</sup>, María Fernanda Fuentes-Lacouture<sup>1</sup>,  
Jose Alejandro Aristizabal-Castellanos<sup>1</sup>, Jean Paul Vernot Hernandez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Hematología. Grupo de Inmunobiología y Biología Celular. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. Colombia.

<sup>2</sup>Grupo de Fisiología Celular y Molecular. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. Colombia.

\*vivianar@javeriana.edu.co

Recibido: 13-10-2010; Aceptado: 17-11-2010

### Resumen

La médula ósea (MO) es una fuente importante para el aislamiento de células “stem” mesenquimales (CSM) útiles en terapias de regeneración tisular e inmunomodulación. **Objetivo.** Aislar y caracterizar células “stem” mesenquimales obtenidas de MO según los criterios exigidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular. **Materiales y métodos.** Se recolectaron muestras de MO de donantes voluntarios que asistían al Servicio de Ortopedia del Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá (Colombia). Se evaluaron las características morfológicas por microscopía invertida y se determinó el inmunofenotipo por citometría de flujo. Se establecieron protocolos de inducción adipogénica, osteogénica y condrogénica mediante el uso de medios de cultivo de específicos y se evaluó la diferenciación utilizando tinciones de aceite rojo ‘O’, fosfatasa alcalina y safranina, respectivamente. **Resultados.** Se recolectaron 24 muestras de MO de pacientes sometidos a reemplazo total de cadera (volumen de muestra de MO: 5 - 45 ml). Se aislaron células con morfología fibroblastoide a partir de 21 muestras de MO (eficiencia de aislamiento: 87,5 %). En la determinación inmunofenotípica (CSM de MO) no existe diferencia estadísticamente significativa entre los antígenos hematopoyéticos (CD34 y CD45,  $p>0,05$ ). Entre el antígeno hematopoyético CD45 y los antígenos mesenquimales (CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-I y HLA-DR) existe diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.006$ ). La tinción de aceite rojo ‘O’ reveló la presencia de adipocitos multiloculares, en la inducción osteogénica se observaron centros de mineralización y la condrogénesis fue positiva para la coloración con safranina. **Conclusión.** A partir de MO se aislaron satisfactoriamente y caracterizaron CSM según los criterios internacionales exigidos.

**Palabras clave:** células “stem”, células mesenquimales, citometría de flujo, médula ósea, diferenciación celular

### Abstract

**Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow according to the criteria of the International Society for Cellular Therapy.** Bone marrow (BM) is an important source for isolating mesenchymal stem cells (MSC) useful in immunomodulation and tissue regeneration therapies. **Objective.** To isolate and characterize mesenchymal stem cells obtained from BM meeting the requirements of the International Society for Cellular Therapy. **Materials and methods.** BM samples were collected from volunteer donors attending the Orthopedics Service of the San Ignacio University Hospital (Bogotá, Colombia). Morphological characteristics were evaluated by inverted microscopy and the immunophenotype was determined by flow cytometry. Protocols were developed for adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation using the Oil Red O, alkaline phosphatase and safranin stains, respectively. **Results.** We collected 24 samples of BM from patients with total hip replacement (volume of BM sample: 5-45 ml). Cells with a fibroblastoid morphology were isolated from 21 BM samples (isolation efficiency: 87.5%). No statistical significant differences were found between the hematopoietic antigens (CD34 and CD45,  $p>0.05$ ) in the immunophenotypic evaluation (of MSC from BM); on the contrary,

there were differences ( $p=0.006$ ) between the hematopoietic antigen CD45 and the mesenchymal antigens (CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-I, and HLA-DR). Oil Red O stain revealed the presence of multilocular adipocytes, in the osteogenic induction we observed localized mineralization nodules, and chondrogenesis was positive as revealed by the safranin stain. **Conclusion.** MSC were satisfactorily isolated from BM and characterized according to the international standards.

**Key words:** stem cells, mesenchymal cells, flow cytometry, bone marrow, cell differentiation

## Resumo

**Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais de medula óssea humana de acordo com critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular.** A medula óssea (MO) é uma importante fonte para o isolamento de células-tronco mesenquimais (CTM) úteis na terapia de regeneração dos tecidos e imunomodulação. **Objetivo.** Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais obtidas de MO de acordo com os critérios exigidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. **Materiais e métodos.** Foram coletadas amostras de MO de doadores voluntários que assistiram ao Serviço de Ortopedia do Hospital Universitário de São Ignacio, Bogotá (Colômbia). As características morfológicas foram avaliadas por microscopia invertida, e o imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Foram estabelecidos protocolos de indução adipogênica, osteogênica e condrogênica usando meios de cultura específicos e a diferenciação foi avaliada por meio da coloração com o “Oil Red O”, fosfatase alcalina e safranina, respectivamente. **Resultados.** Foram coletadas 24 amostras de MO em pacientes submetidos à artroplastia total do quadril (volume de amostra de OM: 5 - 45 ml). Foram isoladas células com morfologia fibroblastóide a partir de 21 amostras de MO (eficiência de isolamento: 87,5%). Na determinação imunofenotípica (CTM de MO), não existe diferença estatisticamente significativa entre os antígenos hematopoiéticos (CD34 e CD45,  $p>0,05$ ). Entre o antígeno hematopoiético CD45 e os antígenos mesenquimais (CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-I e HLA-DR), existe diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,006$ ). A coloração com o “Oil Red O” revelou a presença de adipócitos multiloculares, na indução osteogênica observaram-se centros de mineralização e a condrogênese foi positiva para a coloração com safranina. **Conclusão.** A partir de MO foram isoladas satisfatoriamente e caracterizaram CTM segundo os critérios internacionais exigidos.

**Palavras-chave:** células-tronco mesenquimais (CTM), citometria de fluxo, medula óssea, diferenciação celular.

## Introducción

Las células “stem” mesenquimales (CSM) son células adultas multipotentes capaces de autorrenovarse, generar diversas células diferenciadas y sustentar el proceso de la hematopoyesis. Alexander Friedenstein fue el primero en describir las en la médula ósea (MO) adulta y en la actualidad se estima su número en 0.001% (1) ó 1:34000 como lo señala Beyer *et al* (2). Las CSM tienen morfología fibroblastóide, son adherentes “*in vitro*” y tiene la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos (3-5).

La MO es considerada como la fuente principal para el aislamiento de este tipo de células, debido a la posibilidad de aislarla con alta eficiencia y la demostración de su capacidad de diferenciación a diversos tipos celulares mesodérmicos (6). No obstante, la MO como fuente de aislamiento de CSM, presenta dos limitaciones importantes; la toma de la muestra, es un procedimiento invasivo y la disminución de la capacidad de proliferación y diferenciación de las células en donantes mayores. Por esto, se han buscado fuentes alternas para la obtención de CSM como la sangre de cordón umbilical (SCU), el tejido adiposo y la placenta (7).

La SCU se obtiene por un método menos invasivo que la MO, pero el aislamiento de células mesenquimales a partir

de esta fuente es menos eficiente lográndose cultivos exitosos únicamente en el 30% de los aislamientos realizados; además, el volumen de SCU necesario para el aislamiento debe ser mayor a 30ml y el tiempo de procesamiento de la muestra no mayor a 15 horas. Además, en algunos casos, se ha demostrado que las CSM aisladas de SCU no poseen la capacidad de diferenciarse en células de tejido adiposo (4, 7).

El tejido adiposo es otra fuente para la obtención de CSM que se puede obtener por medio de lipoaspirados y en volúmenes mayores con respecto a la MO y la SCU; sin embargo, se ha detectado la expresión del antígeno CD34 en células adherentes de cultivos tempranos derivados de tejido adiposo, lo cual pone de manifiesto un marcador de células hematopoyéticas y/o endoteliales y no de células mesenquimales lo que dificulta su caracterización inmunofenotípica, los estudios funcionales y su utilización en aplicaciones clínicas (8).

Las limitaciones en el uso de la MO como fuente para la obtención de CSM están relacionadas con el procedimiento técnico y selección de donantes (obtención de la muestra y edad del paciente) y no con la calidad y/o caracterización de las células como ocurre en las poblaciones obtenidas de SCU (incapacidad de diferenciación adipogénica) y tejido adiposo (expresión del antígeno

CD34); por estas razones la MO continua siendo el tejido de elección para el aislamiento de CSM.

Las CSM, a diferencia de las célula "stem" hematopoyéticas (CSH), no expresan un antígeno único y específico para su identificación, generando controversia en su caracterización; por esta razón, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, *Internacional Society Cellular Therapy*) ha propuesto tres criterios para la caracterización "in vitro" de CSM, estos son: 1) Demostrar el aislamiento de células con morfología fibroblastoide de tipo adherente "in vitro" 2) Determinar la expresión de los antígenos CD105, CD73 y CD90, en ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR e 3) Inducir la diferenciación "in vitro" de las CSM en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos (9-11).

Con la finalidad de realizar estudios funcionales relacionados con terapia celular e inmunomodulación, es necesario contar con poblaciones de CSM caracterizadas correctamente según las recomendaciones sugeridas por ISCT. Mediante la realización de este trabajo se presentan los protocolos de caracterización inmunofenotípica y funcional para CSM aisladas de médula ósea, estandarizados en el laboratorio de hematología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

## Materiales y métodos

### Recolección de muestras y aislamiento de células mononucleares

Las muestras de MO se obtuvieron a partir de pacientes sometidos a reemplazos totales de cadera que cumplían con los siguientes criterios de inclusión: (1) Pacientes entre 18 y 80 años de edad; (2) Ausencia de neoplasias relacionadas con el sistema hematopoyético; (3) Serología negativa para los virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC); (4) Pacientes sin tratamientos relacionados con medicamentos inmunosupresores. Las muestras de MO se recolectaron durante el proceso quirúrgico de reemplazo de cadera realizado por los médicos ortopedistas del Hospital Universitario San Ignacio. Las muestras se transfirieron a un tubo con anticoagulante EDTA ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ) (0,2 ml EDTA por ml de MO. Promega ref 22-36/37/38) y transportadas a temperatura ambiente y en oscuridad al Laboratorio de Hematología de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. La muestra de rimado y/o MO se recolectó (volumen mínimo requerido 5 ml), se maceró y filtró

con una gasa estéril y posteriormente se transfirió a tubos cónicos de 15 ml para centrifugación y obtención del "buffy coat"; luego se realizó la separación de células mononucleares (CMN) por gradiente de densidad con Histopaque®1077 (Histopaque  $d=1,077g/cm^3$ . Sigma-Aldrich) y posteriormente un recuento celular con azul de Tripán 0,5% (Merck) para determinar la viabilidad celular. A partir de las CMN obtenidas se iniciaron los cultivos con  $50 - 100 \times 10^6$  CMN en medio de cultivo IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium with Glutamax-I*, 25 nM HEPES, 3,024 g/L sodium bicarbonate. GIBCO-Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales (*MEM non-essential amino acid solution 100X*. Sigma-Aldrich), 1% (v/v) de piruvato de sodio (GIBCO-Invitrogen). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Luego se procedió a retirar las células no adherentes y luego de 8 días de cultivo se observó la aparición de células adherentes con morfología fibroblastoide. El cultivo primario de células adherentes con morfología fibroblastoide se mantuvo hasta obtener una confluencia del 90%, luego se realizaron pases de las células mediante tripsinización (Incubación de las células durante 5 minutos a 37°C con una solución de Tripsina 0,25% (p/v) y EDTA 1mM. GIBCO-Invitrogen, preparada en PBS 1x).

### Evaluación de las características morfológicas

La morfología de las células obtenidas se evaluó mediante microscopía invertida (OLYMPUS CK2) y el registro fotográfico se llevó a cabo con la cámara digital Sony Cyber-shot DSC-W7.

### Evaluación del inmunofenotipo de células "stem" mesenquimales

Después de obtener confluencia de las células adherentes con morfología fibroblastoide, se determinó la expresión de las proteínas asociadas a CSM. Después del tercer pase de cultivo, las células fibroblastoides fueron tripsinizadas y  $20 \times 10^3$  células fueron incubadas (15 minutos a temperatura ambiente) con los anticuerpos CD13 APC (pharming), CD34 APC (Caltag), CD44 FITC (BD), CD45 PECy5 (Caltag), CD73 PE (BD), CD90 PE (Dako), CD105 FITC (eBioscience), HLA-I FITC (Caltag) y HLA-DR PE (BD). Luego las células fueron lavadas dos veces con PBS 1x (1800 rpm durante 5 minutos) y finalmente resuspendidas en 200 ul de PBS 1x para realizar la lectura del Inmunofenotipo en el citómetro de flujo (FacsCalibur, BD). Mediante el uso del programa de análisis Penta Gate (BD), se realizó una región sobre las células con bajo *side-*

*scatter* (complejidad interna) e intermedio *forward-scatter* (tamaño celular). A partir de ésta región celular seleccionada, se realizaron diferentes histogramas para calcular la intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada uno de los antígenos de interés a través de las herramientas estadísticas ofrecidas por el programa de análisis.

### Diferenciación adipogénica

La diferenciación de las CSM en osteoblastos, adipoblastos y/o condroblastos se realizó de acuerdo a procedimientos descritos (12-14), en el cuarto pase de las células después de la determinación del inmunofenotipo. Como control negativo se utilizaron CSM cultivadas sin suplementos de diferenciación. La adipogénesis se indujo cultivando 20000 células/ml en IMDM suplementado hasta obtener una confluencia del 100 %, después se reemplazó con medio de inducción adipogénica (IMDM, SFB 10 %, dexametasona 1 mM, isobutilmetilxantina 0,5 mM, insulina 10 ug/ml e indometacina 200 mM. Sigma-Aldrich). Después de 3 a 4 días este medio se reemplazó por medio de mantenimiento adipogénico con IMDM, 10% SFB y 10 mg/ml de insulina; a los 3 ó 4 días el medio de mantenimiento se reemplazó por medio de inducción adipogénica hasta completar 3 ciclos de inducción/mantenimiento. Al terminar el tercer ciclo las células se resuspendían durante 7 días en medio de mantenimiento. La diferenciación adipogénica se evaluó después de 4 semanas de cultivo mediante la coloración de las vacuolas lipídicas intracelulares con aceite rojo O. Para esto, las células se fijaron con formalina al 10% por 30 minutos, luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y 2 lavados con agua destilada; por último se adicionó la solución de aceite rojo O al 0,35% y se dejó actuar sobre las células durante 50 minutos, después de esto se retiró el colorante. En el microscopio invertido se observó la presencia de vacuolas lipídicas teñidas de rojo dentro de las células.

### Diferenciación osteogénica

La diferenciación osteogénica se realizó por procedimientos descritos (15, 16) cultivando 20000 células / 1,5 cm<sup>2</sup> en 1 ml de medio IMDM suplementado, hasta obtener una confluencia del 80 %. En este momento, el medio de cultivo suplementado se cambió por medio de cultivo para diferenciación osteogénica (IMDM, 10% de SFB, 100 nM dexametasona, 0,2 mM ascorbato y 10 mM  $\beta$ -glicerolfosfato. Sigma-Aldrich.), luego de transcurridas 3 semanas se realizó la evaluación de la diferenciación me-

dante la determinación de fosfatasa alcalina en las células por medio de un *kit* para la detección de fosfatasa alcalina (Chemicon International). El procedimiento para la tinción de fosfatasa alcalina se inició con la fijación de las células con formalina 10% (Sigma-Aldrich) durante 1 ó 2 minutos, luego se retiró el fijador y las células se lavaron con *buffer* de lavado (PBS 1X y 0,05% Tween-20); después se adicionó 0,5 ml del reactivo de fosfatasa alcalina y las células se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el reactivo de fosfatasa alcalina y las células se observaron en microscopía invertida. Se consideró como positiva la coloración que indicaba una tinción roja en las células.

### Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica se realizó utilizando procedimientos estandarizados (17, 18) cultivando 50.000 células por pozo en medio de diferenciación condrogénica (IMDM + 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1). El medio de cultivo se cambió cada 3-4 días hasta completar 3 semanas. Para comprobar la diferenciación de las CSM en condroblastos se realizó la coloración de Safranina O. Las células se fijaron durante 5 minutos con formalina 10% (Sigma-Aldrich), luego las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se adicionó Safranina O al 0,1% durante 3 minutos; por último, se realizó un lavado con PBS 1X y se observaron las células teñidas de rojo en el microscopio invertido.

### Análisis estadístico

Para el análisis de la expresión de los antígenos analizados mediante citometría de flujo, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para probar la normalidad de los datos de la intensidad media de fluorescencia (IMF). Según esta prueba los antígenos CD105, CD44, CD90 y HLA-I presentan una distribución paramétrica ( $p > 0,05$ ), mientras que los antígenos CD13, CD34, CD45, CD73 y HLA-DR presentan una distribución no paramétrica ( $p < 0,05$ ). Debido a este resultado y al tamaño de la muestra, se decidió utilizar la prueba de Wilcoxon para datos no paramétricos, para comparar la mediana de los IMF entre los marcadores hematopoyéticos y los mesenquimales seleccionados. El análisis se realizó en el software SPSS V. 15.0.

### Consideraciones éticas

El estudio se realizó teniendo en cuenta la normatividad de la resolución 008430 capítulo I artículo 11, expedida por el Ministerio de Salud en 1993, que regula “Los aspectos éticos de la investigación en seres humanos”. Según

esto, la recolección de muestras de médula ósea durante un procedimiento quirúrgico, como el reemplazo de cadera, se considera como “investigación con riesgo mínimo” ya que según el artículo 11 “son estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios”. Todos los pacientes que participaron en el estudio recibieron previamente el formato de consentimiento informado donde aceptaban donar voluntariamente la médula ósea sobrante de la cirugía. Estos consentimientos informados fueron aprobados por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana y del Hospital Universitario San Ignacio.

## Resultados

Se recolectaron 24 muestras de MO de pacientes sometidos a reemplazo total de cadera. Las muestras obtenidas fueron de pacientes con edades comprendidas entre 19 y 79 años, distribuidas en hombres 42% y mujeres 58%. El rango del volumen de muestra de MO recolectado fue de 5 a 45 ml. Las características individuales de cada una de las muestras de médula ósea recolectadas se presentan en la tabla 1. De las 24 muestras de MO procesadas se lograron obtener células con morfología fibroblastoide en 21 muestras; es decir, una eficiencia de aislamiento de 87,5 %. A partir de estas 21 muestras de MO aisladas, 3 se contaminaron con microorganismos, en 6 crecieron

**Tabla 1. Características de muestras de médula ósea recolectadas**

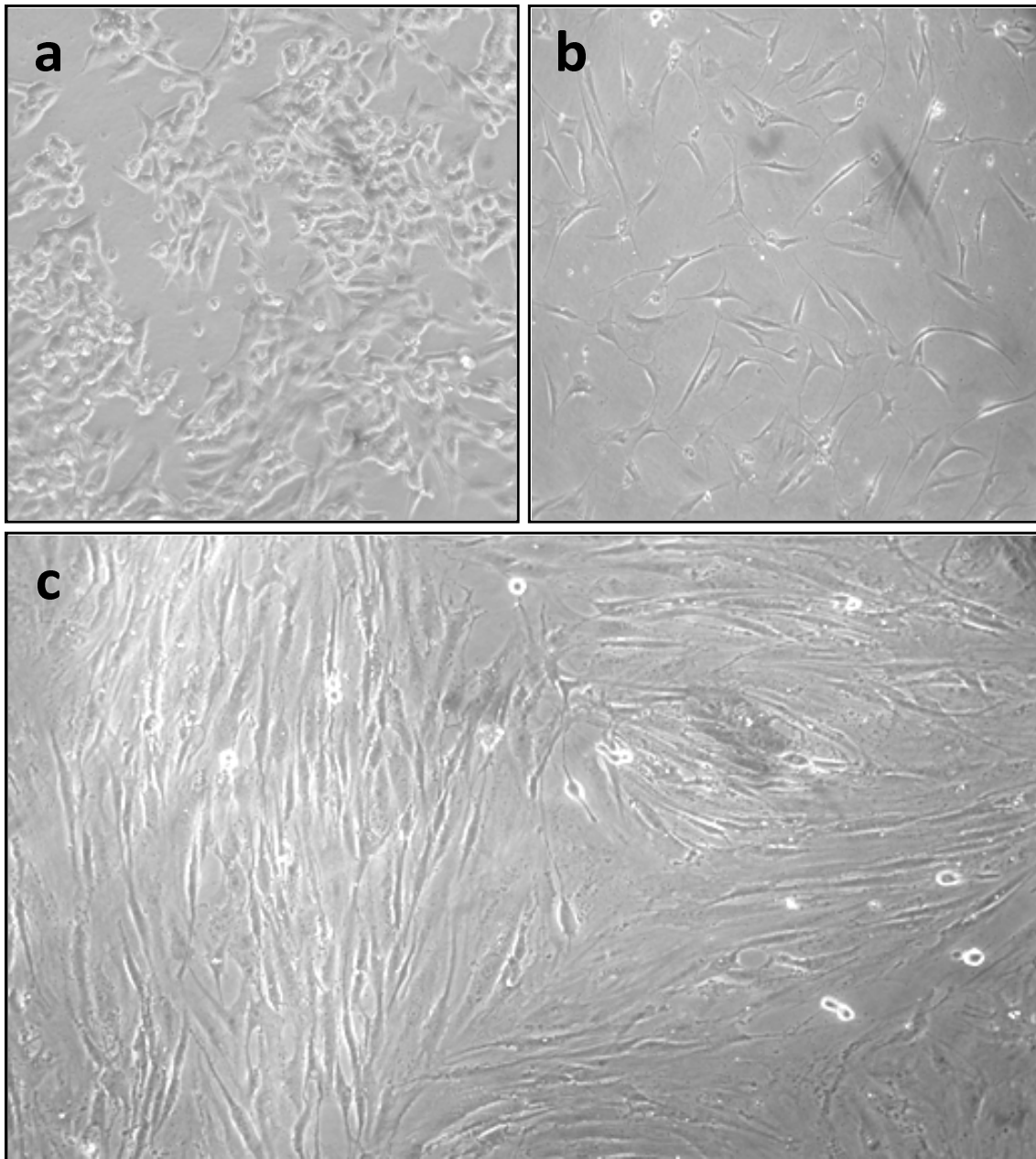
No muestra	Edad	Sexo*	Volumen (ml)	Procedimiento quirúrgico*
M001	43	M	7,5	RTCD
M002	63	F	43	RTCD
M003	50	M	50	RTCI
M004	76	F	10	RTCD
M005	66	F	20	RTCD
M006	53	F	53	RTCD
M007	59	F	10	RTCI
M008	69	F	25	RTCD
M009	54	M	35	RTCI
M010	53	M	35	RTCD
M011	63	M	17	RTCI
M012	53	M	6	RTCI
M013	60	F	16	RTCD
M014	79	M	5	RTCI
M015	56	M	16	RTCD
M016	48	F	6	RTCI
M017	19	F	40	RTCD
M018	72	F	13	RTCD
M019	30	F	18	RTCD
M020	76	F	7	RTCD
M021	51	M	30	RTCD
M022	51	F	5	RTCD
M023	64	M	41	RTCI
M024	54	F	54	RTCD

\* RTCD (reemplazo total de cadera derecha), RTCI (reemplazo total de cadera izquierda)

\* M (masculino), F (femenino)

fibroblastos y 11 se caracterizaron completamente por morfología, citometría de flujo y mediante la inducción y diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica. Las 6 muestras a partir de las cuales crecieron fibroblastos fueron excluidas debido a que en las pruebas de diferenciación multilinaje, no se observó ningún cambio de las células en los medios de inducción; además las características morfológicas mostraban células fibroblas-

toides más pequeñas que las que presentaban los cultivos a partir de los cuales se logró una diferenciación eficiente hacia los tres linajes. (**Figura 1a**). Las células individuales con morfología fibroblastoide (compatibles con CSM) se observaron mediante microscopía invertida (**Figura 1**); estas formaron colonias como UFC-F (Unidades Formadoras de Colonias – Fibroblastoides), entre el primer y tercer pase de cultivo sin medio de diferencia-

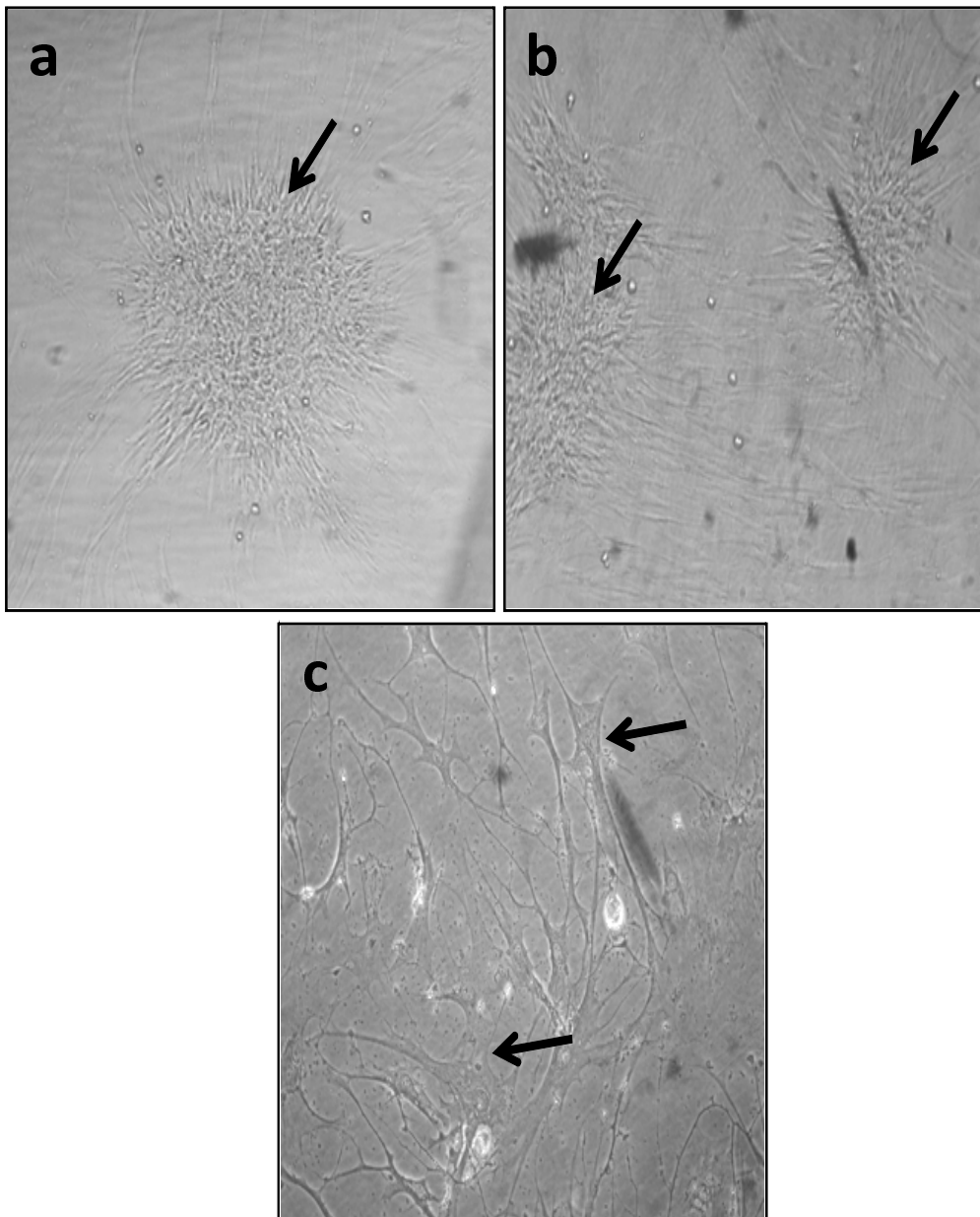


**Figura 1. Células “stem” mesenquimales en cultivo.** a) Cultivo primario de fibroblastos aislados de médula ósea. Objetivo 20x. 2do pase. b) Cultivo primario de CSM de la médula 001 (M001) con 30% de confluencia. Objetivo de 20x. 3er pase. c) CSM de M001 con 90% de confluencia en objetivo de 40X. 3er pase

ción. En la figura 2c se presentan CSM después del 5to pase de cultivo con características morfológicas compatibles con senescencia.

Para la determinación de la expresión de antígenos hematopoyéticos (CD34 y CD45) y antígenos relacionados (no específicos) con células mesenquimales (CD13,

CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-I y HLA-DR) se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada proteína en las células en el tercer pase de cultivo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los antígenos hematopoyéticos ( $p > 0,05$ ) con IMF menores a 5.0. La comparación del antígeno CD45 con los antígenos mesenquimales mostró diferen-



**Figura 2.** Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides (UFC-F).

a y b) Se observan UFC-F de la médula 005 en segundo pase de cultivo. Las células se disponen en colonias aisladas que posteriormente se unifican formando una monocapa. c) Médula 008 después del 5to pase. Se observan células de mayor tamaño con granulaciones, vacuolas y un mayor número de prolongaciones citoplasmáticas

cias estadísticamente significativas ( $p=0,006$ ). En la figura 3 se presentan las medianas de las IMF para cada uno de los antígenos evaluados (gráfica de cajas y bigotes a partir del análisis en el software SPSS V. 15.0). El antígeno CD90 presentó la mayor IMF y por el contrario, los antígenos CD34 y CD45 presentaron un valor casi nulo.

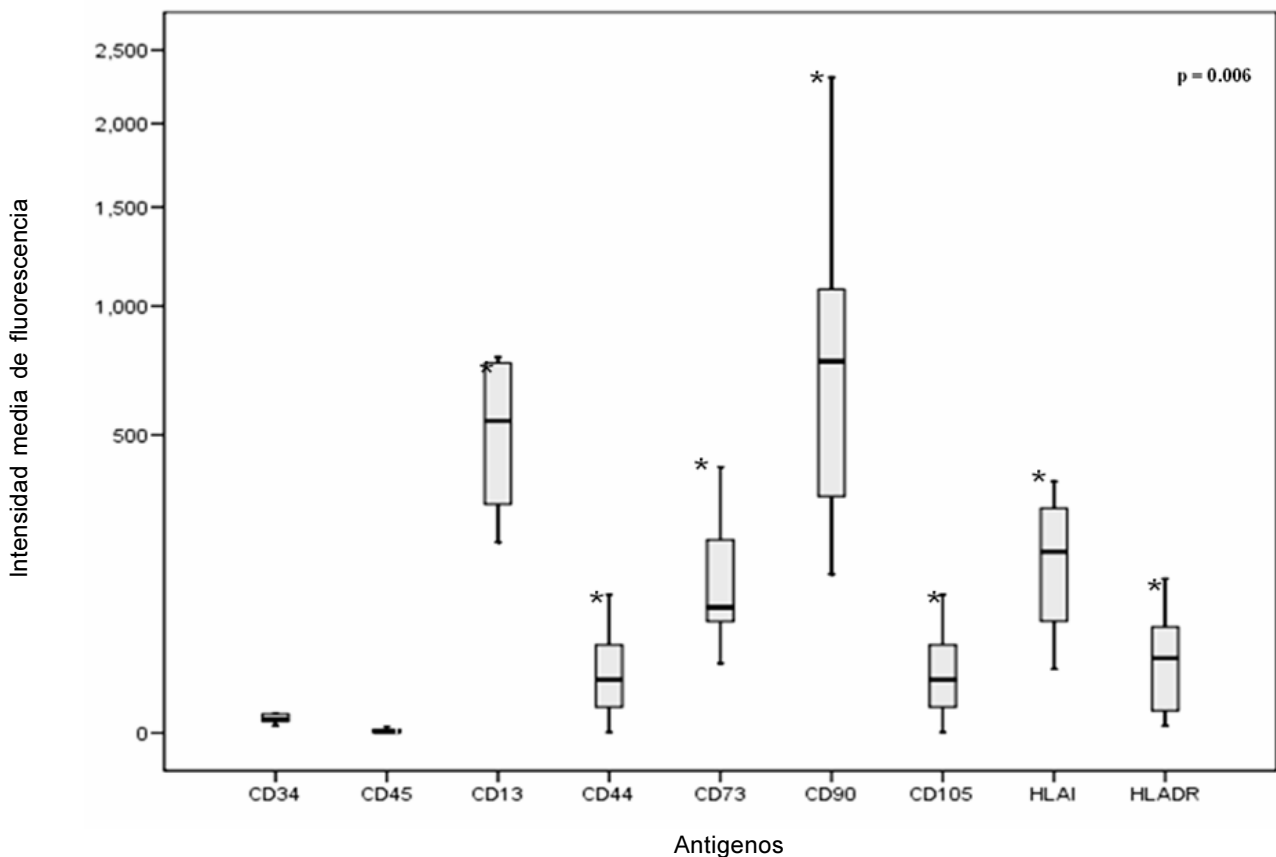
Según la IMF el resultado de la expresión de los antígenos mediante citometría de flujo fue CD13+, CD34-, CD44+, CD45-, CD73+, CD90+, CD105+/-, HLA-I+ y HLA-DR+/-.

En la figura 4 se observa la expresión de cada uno de los antígenos representados en los histogramas de color gris. El control de isotipo para los fluorocromos PE, PECy5, APC y FITC se observan sin color.

Más del 96.9% de las células analizadas expresaron los antígenos CD13, CD44, CD73, CD90 y HLA-I, mientras que los antígenos CD105 y HLA-DR se expresaron en el 68.9% y 65% de las células, respectivamente. Este resulta-

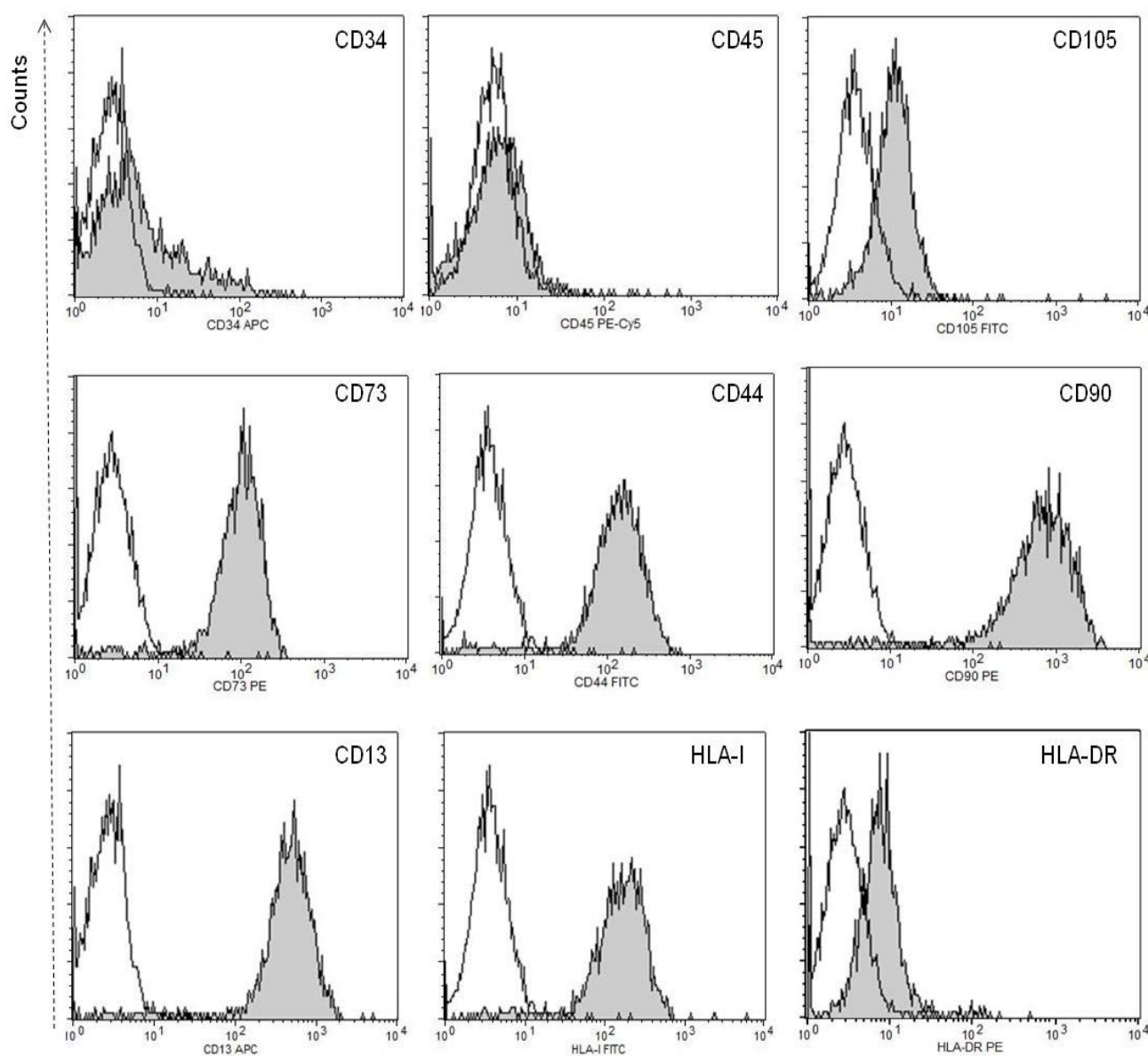
do, junto con la IMF, coincide con las características del inmunofenotipo establecido por la ISCT para CSM.

La caracterización biológica de las CSM en células de linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico se comprobó mediante las coloraciones de aceite rojo O, fosfatasa alcalina y Safranina O, respectivamente. La figura 5 muestra CSM diferenciadas en adipoblastos. Las vacuolas lipídicas de las células que aparecieron a partir del tercer día, después del inicio de la diferenciación adipogénica, se encuentran teñidas de color rojo lo que indica que la coloración de aceite rojo O fue positiva. La morfología de las células diferenciadas es compatible con adipocitos multiloculares. Las CSM diferenciadas en células de linaje osteogénico se observan en la figura 6. Las células pierden su morfología inicial y adoptan una característica "estrellada" propia de osteoblastos. Las células positivas para fosfatasa alcalina se encuentran teñidas de color rojo;



**Figura 3.** Mediana de las intensidades medias de fluorescencia para cada uno de los antígenos evaluados mediante citometría de flujo. (\* $p<0,05$  en comparación con IMF de CD45)

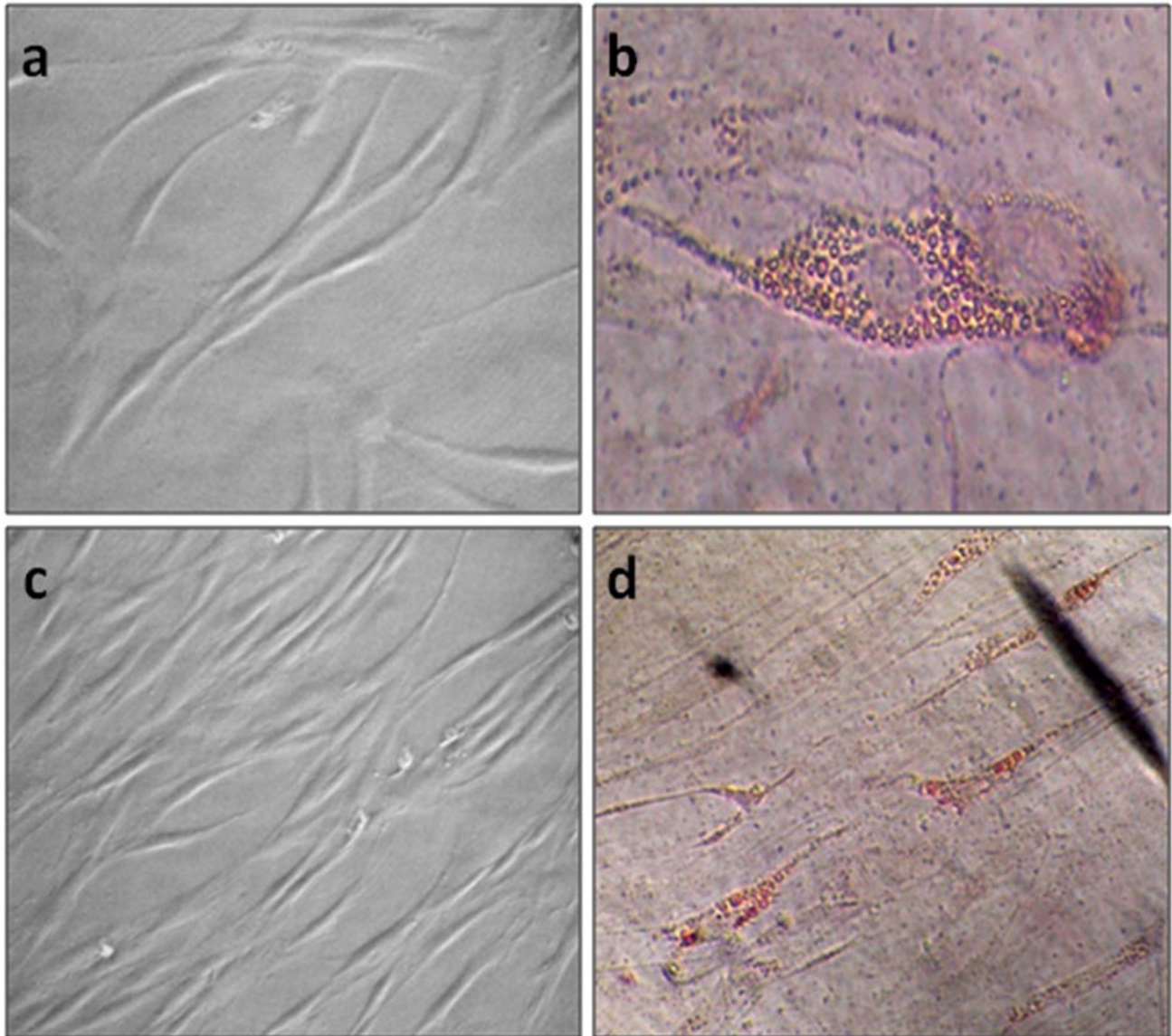




**Figura 4.** Inmunofenotipo mediante citometría de flujo de células “stem” mesenquimales de la médula ósea 008 obtenidas en tercer pase de cultivo (histograma sin color: control de isotipo)

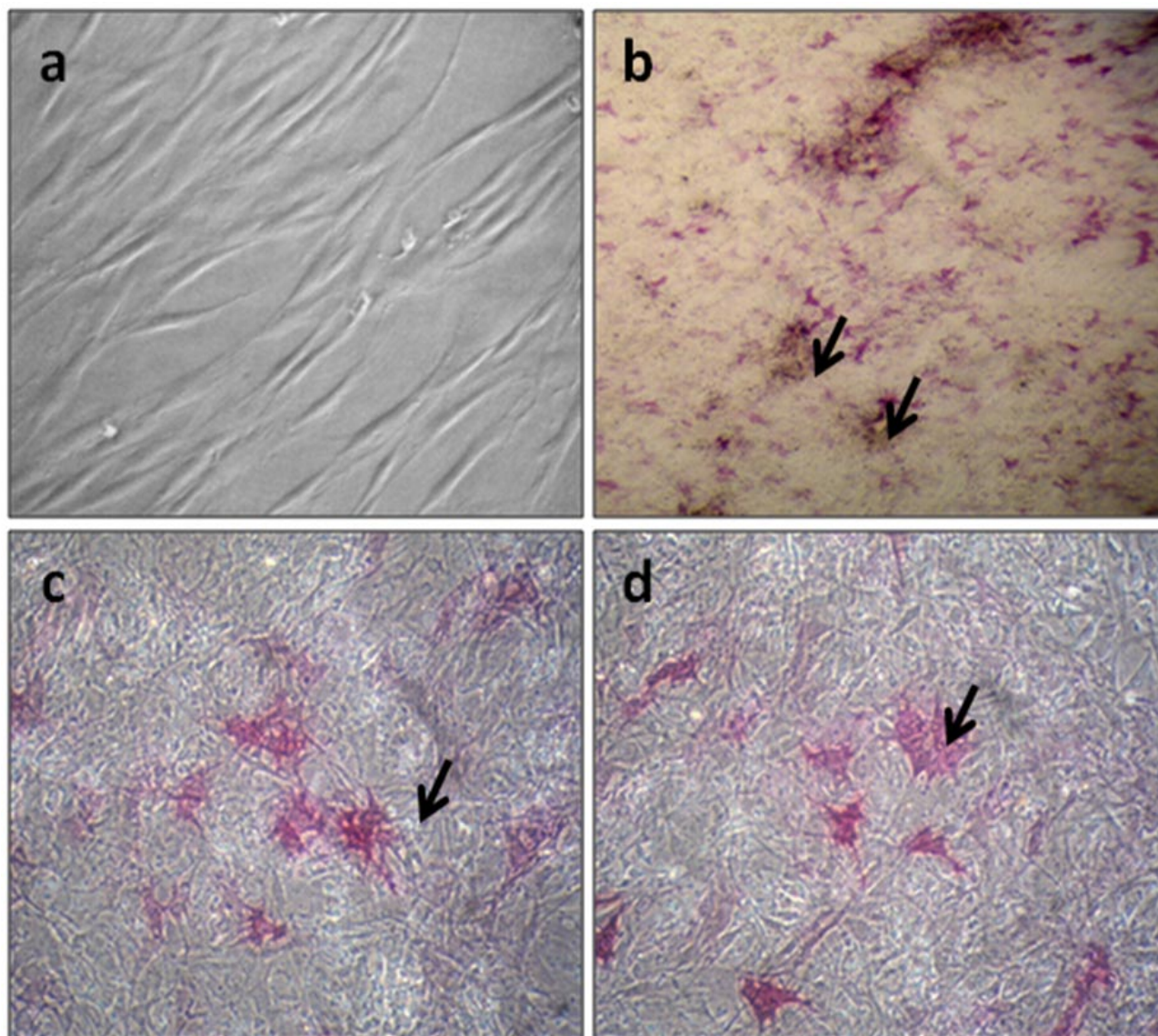
esto demuestra la presencia de la enzima en las células diferenciadas. En algunos cultivos se observó la presencia de nódulos mineralizados a partir de la segunda semana de diferenciación osteogénica (**Figura 6b**). La diferenciación de las CSM a células de linaje condrogénico en cultivo de monocapa se demostró mediante coloración con safranina O. Las células se tiñeron de color rojo indicando la producción de ma-

triz extracelular (**Figura 7**). Además, los cambios morfológicos de las CSM se evidenciaron a partir de la primera semana en medio de diferenciación condrogénica, observándose células completamente redondas y de menor tamaño. El control negativo de las coloraciones de aceite rojo O, fosfatasa alcalina y safranina O se realizó con CSM no diferenciadas (cultivadas en IMDM + SFB 10 %).

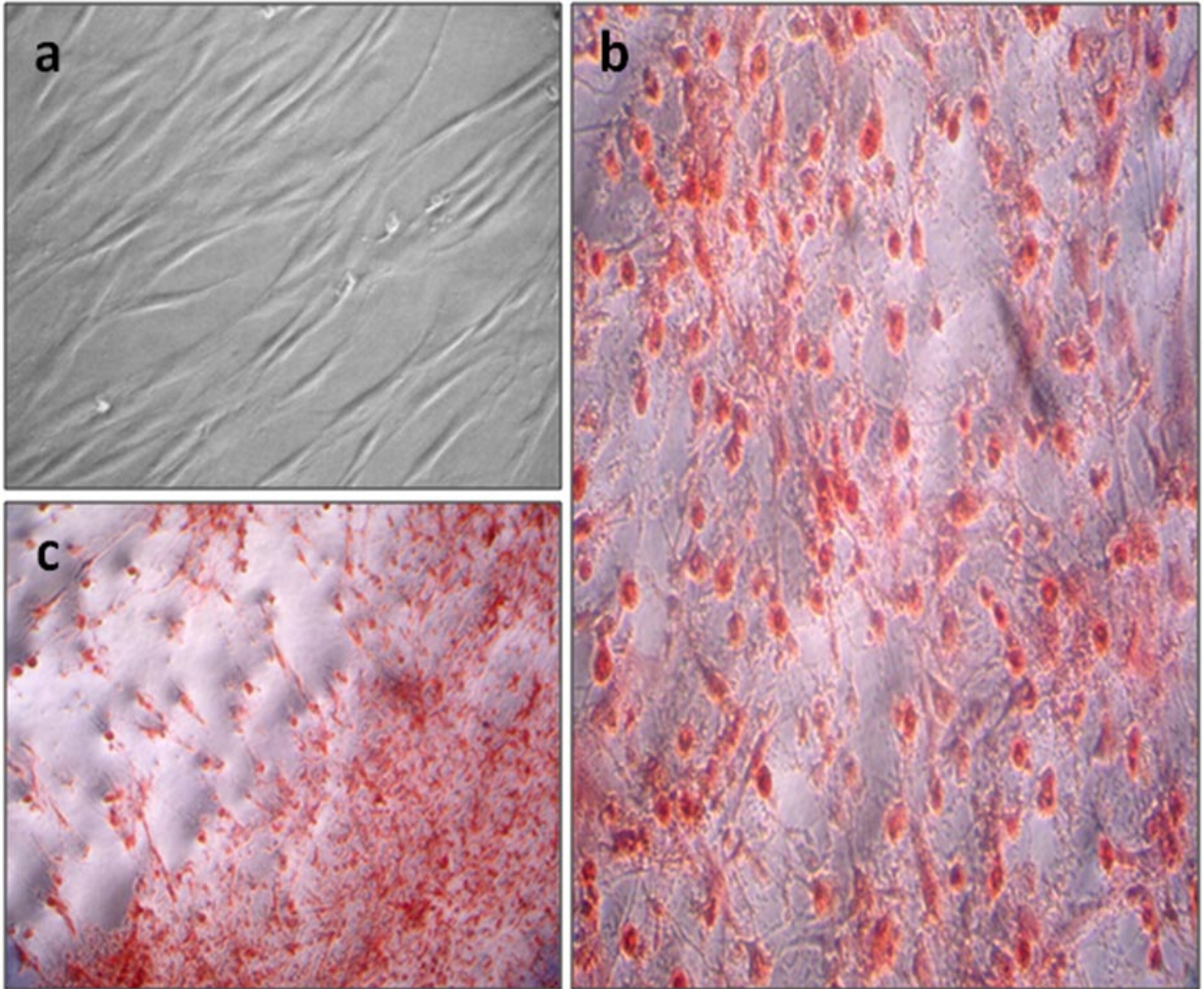


**Figura 5.** Coloración de aceite rojo O positiva para CSM diferenciadas a adipoblastos. **a y c)** células "stem" mesenquimales sin diferenciar (20x –10x), **b)** Adipoblasto con coloración de aceite rojo O positiva (se observan las vacuolas lipídicas (20x), **d)** Adipoblastos diferenciados a partir de CSM con coloración de aceite rojo O positiva (5x).





**Figura 6.** Coloración de fosfatasa alcalina positiva para CSM diferenciadas a osteoblastos. **a)** Células “stem” mesenquimales sin diferenciar (10x), **b)** Nódulos mineralizados en células diferenciadas a linaje osteogénico (5x), **c y d)** Osteoblastos diferenciados a partir de CSM que presentan coloración positiva para fosfatasa alcalina (5x). *Arriba izquierda: Control negativo para coloración de fosfatasa alcalina*



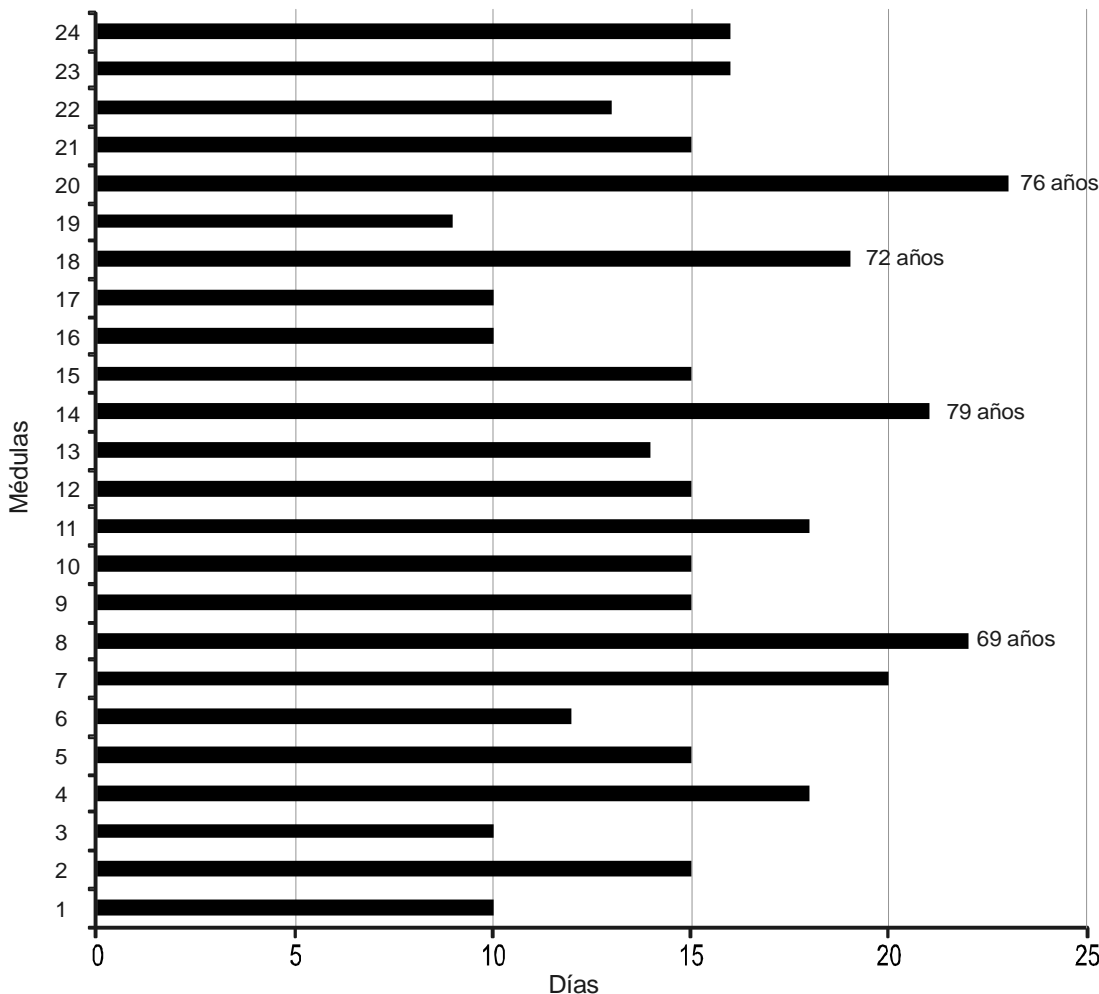
**Figura 7.** Coloración de Safranina O positiva para CSM diferenciadas a condroblastos. **a)** Células "stem" mesenquimales sin diferenciarse, **b y c)** Se observan células no fibroblastoides positivas para la tinción de safranina sugerida por ISCT.

## Discusión

Las CSM han sido objeto de estudio desde la década de los años 70's cuando Friednestein *et al* las aislaron por primera vez. En la actualidad, esta población celular tiene importantes aplicaciones en regeneración tisular, pero para esto es necesario su expansión y caracterización biológica *in vitro*. En este estudio se demostró que las muestras de MO procedentes de pacientes sanos con edades comprendidas entre 19 y 79 años contienen células adherentes con morfología fibroblastoide y que pueden ser expandidas en cultivo para cumplir los tres criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (9). No se logró establecer un tiempo común para el crecimiento y la expansión de los cultivos celulares, ya que cada cultivo mostró una cinética de crecimiento diferente lo que demuestra que especialmente la edad del

donante pueden influir en el crecimiento celular. Observamos que el tiempo necesario para obtener CSM en primer pase era mayor a partir de las muestras recolectadas de pacientes de avanzada edad; por ejemplo, la médula No 20 fue obtenida de un donante de 76 años y fue necesario más de 20 días de cultivo para obtener las CSM en primer pase (**Figura 8**).

Un factor importante en el cultivo de CSM a partir de MO es el crecimiento simultáneo de fibroblastos del tejido conectivo. Existen algunas diferencias morfológicas entre las CSM y los fibroblastos pero estas poblaciones celulares también pueden ser fácilmente confundidas, inclusive sus inmunofenotipos son muy similares. Ishii M *et al* determinaron la expresión de 26 antígenos en CSM de MO y fibroblastos, encontrando una expresión diferencial solamente en el antígeno CD49b (integrina  $\alpha 2$ )



**Figura 8.** Tiempo de obtención de CSM en primer pase. La edad del donante de médula ósea influye en la cinética de obtención del cultivo primario de CSM.



y HLA-DR (19). Esto demuestra que la caracterización de las CSM tiene que incluir, además de la evaluación morfológica y del inmunofenotipo, pruebas biológicas como las de diferenciación celular *in vitro*. En este estudio el 25% de las muestras de MO recolectadas presentaron contaminación con fibroblastos (Figura 1a), razón por la cual se descartaron. Es probable que el fracaso de ensayos clínicos con células “stem” mesenquimales tenga su origen en una caracterización biológica incompleta de las células, permitiendo el uso equivocado de fibroblastos y no de precursores mesenquimales.

Sobre la capacidad de mantenimiento de CSM, en nuestro estudio pudimos observar que el número de pases realizados a los cultivos celulares es proporcional a cambios morfológicos asociados con senescencia, como presencia de vacuolas y granulaciones en el citoplasma de las células. Notamos que a partir del quinto pase, las células podían perder su morfología fibroblastoide y se convertían en células de mayor tamaño y con más vacuolas, granulaciones y prolongaciones (Figura 2c) Por esta razón es aconsejable seguir el protocolo de Encabo A. *et al* quienes mostraron que los pases de células realizados a baja densidad conservan su tamaño prolongando su mantenimiento en cultivo (20).

La inmunofenotipificación de las CSM en nuestro estudio cumplió con el criterio establecido por la ISCT. A diferencia de otros estudios, los antígenos CD105 y HLA-DR presentaron un índice medio de fluorescencia variable (Figuras 3 y 4). La expresión de CD105 puede aumentar o disminuir de acuerdo a los niveles de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) presentes en el medio; es posible que la actividad autocrina de las CSM haya influido en la variabilidad de la expresión de dicho antígeno ya que las CSM pueden producir esta citoquina en cultivo (20). De manera similar, la expresión de HLA-DR pudo variar ya que las CSM se cultivaron en medio con SFB el cual puede tener niveles indeterminados de INF- $\gamma$  (Interferón-gama) el cual puede influir en la expresión de HLA-DR (9).

En los ensayos de diferenciación celular, confirmamos la diferenciación de CSM en adipoblastos (Figura 5). Los estudios de aplicación clínica de estas células podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades como la lipostrofia generalizada o síndrome de Berardinelli-Seip. Confirmamos la importancia de la insulina como un inductor convencional de la adipogénesis. Esta activa al receptor IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor-1*) el cual inicia la diferenciación adipogénica de las CSM; por esto la importancia de los ciclos de inducción y mantenimiento;

el primero inicia la diferenciación, mientras que el segundo promueve el desarrollo del fenotipo de los adipocitos (12-14).

En la diferenciación osteogénica de las CSM obtenidas a partir de MO fue evidente un cambio de morfología a partir de la primera semana de inducción (Figura 6). En la segunda semana de cultivo se hizo evidente la presencia de nódulos mineralizados poniendo de manifiesto la presencia de fosfatasa alcalina la cual fue confirmada mediante la coloración de la enzima (Figura 6b).

El cultivo de diferenciación condrogénica se realizó en monocapa contrario a la mayoría de los estudios. Sin embargo al igual que Encabo *et al* (20), pudimos demostrar la diferenciación de CSM a linaje condrogénico (Figura 8). El cultivo se realizó a una alta densidad (50000 células/cm<sup>2</sup>), imitando las condiciones necesarias para la diferenciación condrogénica en cultivos de micromasa. El cambio de morfología a células pequeñas y redondas indicó la diferenciación de las CSM a condroblastos; la coloración con safranina O revalida este hecho.

Aunque las tinciones utilizadas en nuestro estudio son consideradas por la ISCT como pruebas “gold estándar” para validar la diferenciación *in vitro* de CSM, existen otros posibles marcadores que se pueden utilizar para corroborar la diferenciación de las CSM en los tres linajes mencionados. Por ejemplo, para la diferenciación adipogénica se puede evaluar la expresión de los genes de lipoproteinlipasa, PPAR- $\gamma$ 2 y adiponectina los cuales se encuentran presentes en células adiposas. La diferenciación osteogénica es posible evaluarla mediante la detección de osteonectina, osteopontina y sialoproteína ósea. Los antígenos específicos para células condrogénicas como CD49c, CD49e, CD49f y CD151 pueden ser evaluados mediante citometría de flujo, según Grogan *et al* (21) su expresión indica alta capacidad condrogénica *in vitro*.

En conclusión, en este estudio demostramos que es viable obtener, expandir y diferenciar CSM a partir de MO humana cumpliendo con los tres criterios establecidos por la ISCT para las CSM. Además, se estandarizaron las condiciones de cultivo y los procesos de diferenciación de las CSM a células de linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico haciendo que ésta sea una herramienta fundamental para la caracterización completa de las CSM y su posterior uso en estudios del “nicho” medular, de los mecanismos de diferenciación y/o regulación celular y en terapias de reparación tisular a largo plazo.

## Agradecimientos

Agradecemos a los pacientes por la donación voluntaria de médula ósea. Especial gratitud a los médicos ortopedistas del Hospital Universitario San Ignacio: Dr. Efraín Leal y Dr. Rafael Pérez por su constante colaboración en la recolección de las muestras de médula ósea durante los procedimientos quirúrgicos y a todo el personal del departamento de Ortopedia del Hospital Universitario San Ignacio por su cooperación en este proyecto.

## Financiación

Este trabajo fue realizado con apoyo financiero de Colciencias a través del proyecto *Efecto en la expresión de moléculas de adhesión y señalización en células "stem" hematopoyéticas moduladas por el co-cultivo con células "stem" mesenquimales*, aprobado en la Convocatoria Nacional Orientada a la Solución de Problemas Prioritarios de Salud en Colombia (RC- 401-2006).

## Conflicto de intereses

Esta investigación es de carácter exclusivamente académico, por lo tanto, no presenta conflicto de intereses con la empresa pública o con la empresa privada.

## Referencias

1. Nardi NB, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: Isolation *in vitro* expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2006; **174**: 249–82.
2. Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation *in vitro* expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2006; **174**: 249-282.
3. Summer R, Fine A. Mesenchymal progenitor cell research. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008; **5**: 707–10.
4. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004; **20**: 625–34.
5. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie J. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Reviews*. 2006; **20**: 161–71.
6. Da silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; **26**: 2287–99.
7. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006; **24**: 1294–301.
8. Mitchell JB, MacIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. The immunophenotype of human adipose derived cells: Temporal changes in stromal- and stem cell- associated markers. *Stem Cells*. 2006; **24**: 376–85.
9. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EMM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; **8**: 315-317.
10. Brinckmann JE. Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. *Journal of Neuroscience*. 2008; **265**: 127–30.
11. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Current Opinion in Hematology*. 2006; **13**:419–25.
12. Viveros Cortés, Laviada Molina H, Bastarrachea Sosa R. Influencia endocrina y paracrina sobre la adipogénesis. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2002; **10**:151–64.
13. Rosen ED. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2005; **73**:31–4.
14. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism*. 2006; **4**: 263–73.
15. Phillips JE, Gersbach CA, Wojtowicz, AM, García AJ. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by runx2/cbfa1 serine phosphorylation. *Journal of Cell Science*. 2006; **119**: 581–91.
16. Xiao G, Cui Y, Ducy P, Karsenty G, Franceschi RT. Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3t3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Molecular Endocrinology*. 1997; **11**: 1103–13.

17. Han F, Gilbert JR, Harrison G, Adams C, Freeman T, Tao Z, Zaka R, Liang H, Williams C, Tuan RS, Norton PA, Hickok NJ. Transforming growth factor-beta1 regulates fibronectin isoform expression and splicing factor SRP40 expression during chondrogenic maturation. *Experimental Cell Research*. 2007; **313**: 1518–32.
18. Chen WH, Lai MT, Wu AT, Wu CC, Gelovani JG, Lin CT, Hung SC, Chiu WT, Deng WP. In vitro stage-specific chondrogenesis of mesenchymal stem cells committed to chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2009, **60**: 450-459
19. Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y, Kawaguchi H, Sugiyama M, Kamata N, Iwata T, Matsubara T, Nakamura K, Kurihara H, Tsuji K, Kato Y. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, **332**: 297-303
20. Encabo A, Mirabet V, Sepúlveda P, Carbonell F, Miñana M. Optimización de las condiciones de cultivo de las células mesenquimales de médula ósea humana para su uso en traumatología. *Patología del aparato locomotor*. 2005; **3**:132–43.
21. Grogan S, Barbero A, Díaz-Romero J, Cleton-Jansen A, Soeder S et al. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. *Arthritis & Rheumatism*. 2007; **56**:586–95.