

Células mesenquimales y fibrocitos en sangre periférica. Condiciones de cultivo

Ignacio Gómez-Ochoa^a, P. López-Lahoz^b, E. Cativiela^c, A. Villarroya-Aparicio^d y M. Marín-Redondo^a

^aServicio de Medicina Física y Rehabilitación. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza. España.

^bCentro de Salud Valdefierro. Zaragoza. España.

^cServicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza. España.

^dDepartamento de Fisiatría. Ciencias de la Salud. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

Objetivos: El término *fibroblast-like*, célula madre de sangre periférica, engloba a las unidades formadoras de colonias fibroblásticas, los fibrocitos y las células mesenquimales. El diseño de este trabajo intenta establecer las condiciones de cultivo.

Material y método: En 25 muestras de sangre venosa se aislaron células mononucleares y se sembraron en medio de cultivo McCoy's 5A con suero bovino fetal al 20%. A los 7, 14 y 21 días se evaluó la proliferación, la confluencia y la relación células redondas/células alargadas. El día 21 se valoró la morfología, los marcadores de superficie y la actividad fagocítica.

Resultados: En todos los cultivos se detectó crecimiento celular positivo para la vimentina, CD34 y NBT. La media \pm desviación estándar del $36 \pm 3,71\%$ eran células alargadas (fibrocitos) y sólo en 2 casos se registraron áreas de confluencia.

Conclusiones: Los métodos de cultivo descritos son adecuados para los seudofibroblastos de sangre periférica. La positividad de CD34, prueba NBT y vimentina demuestra que los seudofibroblastos tienen características comunes con la célula madre, los monocitos-macrófagos y los fibroblastos.

Palabras clave: *Fibroblast-like. Mesenchymal stem cell.* Fibrocito. Cultivo.

Mesenchymal cells and fibrocytes in peripheral blood. Culture conditions

Objectives: The fibrocytes, the mesenchymal cells and the colony forming units are included in the concept fibroblast-like, peripheral-blood circulating stem cells.

The aim of this work was to establish the culture conditions.

Material and method: Peripheral blood mononuclear cells were isolated from 25 samples collected from the cephalic vein. These were cultured in McCoy's 5A enriched with 20% of foetal bovine serum. The culture was read at 7, 14 and 21 days, evaluating the proliferation, confluence and the round cell/spindle cell ratio. Moreover the 21st day surface markers and phagocytic activity testing was carried out.

Results: Growth was achieved in all the cases but only in two dishes were confluence areas retrieved. Spindle cells were $36 \pm 3.71\%$ (mean \pm SD). All the cells showed intense signal against vimentin, CD34 marker and the NBT test were positives.

Conclusions: Clear CD34 expression, positivity against a connective tissue marker such as vimentin and positivity in a phagocytic assay like the NBT-test, support that stem cells, monocytes and fibroblasts share common characteristics.

Key words: Fibroblast-like. Mesenchymal stem cell. Fibrocyte. Culture.

Introducción

Las células con morfología fibroblástica derivadas de la sangre periférica tienen la capacidad de autorrenovarse y originar células especializadas, características típicas de las células madre o *stem cell* (SC)¹, y para integrar todas estas variaciones morfológicas se utiliza el término *fibroblast-like*², que engloba a las unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), los fibrocitos y las células mesenquimales (CM). Aún no están bien definidas las diferencias entre estas células, y los intentos de Castro-Malaspina et al^{3,4}, para demostrar fibronectina y colágeno en las CFU-F, o de Bucala et al⁵ y Le Blanc et al⁶, con marcadores de superficie, no lograron dar una respuesta definitiva. Una pieza muy relevante de este puzzle la pusieron Zhao et al⁷ al confirmar la función *stem cell* pluripotente de los monocitos y sus derivados,

Correspondencia: Dr. I. Gómez Ochoa.
Servicio de Medicina Física y Rehabilitación.
Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
Avda. San Juan Bosco, 15. 50009 Zaragoza. España.
Correo electrónico: nachogomezochoa@yahoo.es

Manuscrito recibido el 22-2-2007 y aceptado el 6-6-2007.

los *fibroblast-like*, y demostraron que las células fibroblastoides CD14+, CD34+ y CD45+ pueden ser inducidas a diferenciarse en macrófagos, linfocitos, células epiteliales, neuronas y hepatocitos.

La potencialidad del uso clínico de las CM/fibrocitos, procedentes de médula ósea, adquiere cada vez más importancia al comprobarse su utilidad terapéutica en la reparación del cartílago⁸ y el hueso⁹.

El diseño de este trabajo intenta establecer las condiciones de cultivo de las CM/fibrocitos procedentes de sangre periférica, evaluando la identificación de los tipos celulares y los parámetros más adecuados para su cuantificación; es el primer paso para detectar en el futuro las variaciones de los patrones de crecimiento en cultivo relacionados con la enfermedad reumática inflamatoria.

Material y método

Se obtuvo muestras de sangre venosa de 25 donantes sanos de entre 24 y 61 años, en tubos estériles con heparina libre de conservantes. Las células mononucleares (CMN) se aislaron después de extraerlas por centrifugación a 400 g durante 30 min en gradiente de densidad 1.077. Las CMN se lavaron tres veces en medio de cultivo McCoy's 5A y se cuantificaron en un contador Coulter Counter®. El cultivo se hizo con una modificación de las técnicas descritas por Gordon et al¹⁰ y Kaneko et al¹¹. Sobre placas de Petri de 35 mm de diámetro se sembraron 10⁶ CMN en 3 ml de medio de cultivo McCoy's 5A suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina) y suero bovino fetal descomplementado al 20%. Se cultivaron a 37 °C, presión de CO₂ al 5% y humedad a saturación. Semanalmente se retiraba la mitad del medio de cultivo y se lo sustituía por medio fresco.

A los 7, 14 y 21 días de la siembra se evaluaron los cultivos en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 25. El día 21 se retiraban los portas de cristal para valorar la morfología (tinción de May-Grünwald-Giemsa), los marcadores de superficie (CD34 y vimentina) y la actividad fagocítica (prueba de NBT) (figs. 1 y 2). El estudio inmunocitoquímico se realizó con la técnica de la fosfatasa-antifosfatasa alcalina conjugada con streptavidina (BioGenex HK330-59K; BioGenex, San Ramón, California, Estados Unidos), y se usó como anti-CD34 un anticuerpo primario de rata (PeliCluster CD34/CLB; The Sauquin, Países Bajos), y para la expresión de la vimentina, antivimentina de ratón (BioGenex, San Ramón, California, Estados Unidos). Para la prueba NBT se siguió la técnica de Park et al¹², que incuban las células con una solución de nitroazul de tetrazolio, lo que permite visualizar el formazán (NBT reducido) en el citoplasma de las células con capacidad de bacteriolisis.

La cuantificación se basó en tres parámetros: proliferación, confluencia y relación células redondas/células alargadas. La proliferación definía el número de células en

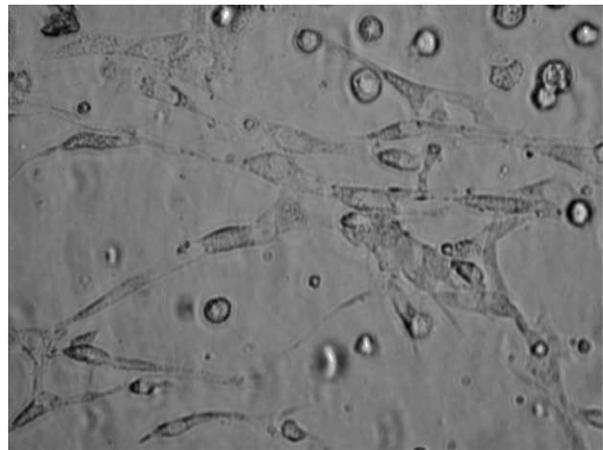


Figura 1. Células mesenquimales.

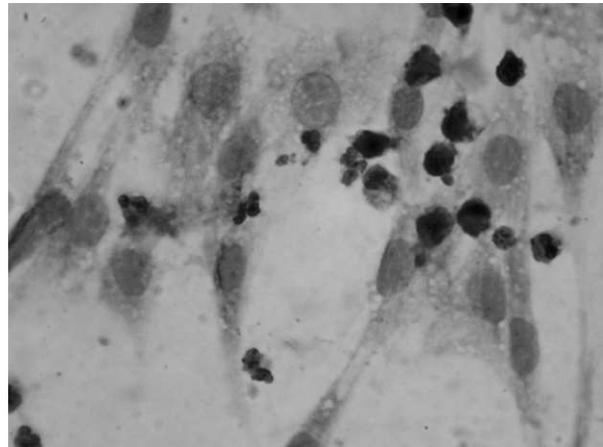


Figura 2. Área de confluencia a los 21 días (tinción con May-Grünwald-Giemsa).

la placa en cada una de las lecturas y se valoró en una escala de 0 a 3 en la que el nivel 1 representaba la presencia de algunas células que no permitían considerar la ausencia de crecimiento, y el nivel 2 indicaba un crecimiento muy importante, pero que no llenaba toda la placa y que por lo tanto excluía el nivel 3. La confluencia implica la adherencia de células alargadas entre sí, que pueden llegar a formar auténticas redes celulares que cubren la placa. Se valoró con la misma escala que la utilizada para la proliferación. Las células redondas y las células alargadas representan dos tipos morfológicos fácilmente identificables en el cultivo, que comprenden todos los elementos proliferantes, aunque muy probablemente cada uno de ellos represente un sistema celular muy heterogéneo con distinta identidad y significación funcional. Para cuantificar estos dos tipos celulares se los consideró como partes de una población del 100% y se asignó a cada uno de ellos un porcentaje.

Resultados

– Proliferación: en todas las muestras sembradas se detectó crecimiento en las lecturas de los días 7, 14 y 21 con unos valores medios de 1,6, 1,6 y 1,4, respectivamente. El análisis de estos datos muestra que no hay diferencias significativas de crecimiento entre los tres intervalos de cultivo, ni entre las distintas muestras (p de crecimiento = 0,55).

– Confluencia: sólo en 2 casos se registraron áreas de confluencia entre las células alargadas.

– Relación células alargadas/células redondas: la separación de tipos celulares entre células redondas y células alargadas permaneció constante a lo largo de todo el cultivo. Las células alargadas representaron el 31, el 35 y el 26% del total del crecimiento los días 7, 14 y 21, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre las tres fases (p de células redondas = 0,31).

– Inmunocitoquímica: vimentina y CD34. Todas las células del cultivo, células redondas y células alargadas, expresaban una intensa positividad para la vimentina. El CD34 fue positivo en el 53% de las células alargadas.

– Prueba de NBT: se detectaron gránulos de formazán (células NBT positivas) en el 80% de las células redondas y en el 35% de las células alargadas.

Discusión

Aún no podemos decir con seguridad si las células fibroblastoides (*fibroblast-like*) que pueden obtenerse por cultivo líquido de sangre periférica son las mismas células que los fibrocitos o las células mesenquimales circulantes porque los marcadores de superficie, y concretamente el CD34 –indicador del carácter de *stem cell* hematopoyético–, se expresan en los fibrocitos 5 y en las células descritas por Zhao et al⁷ y es negativo en las células mesenquimales⁶. Nuestros resultados evidencian una clara expresión CD34+ en los *fibroblast-like* que, sumada a la positividad a la vimentina (marcador de tejido conectivo) y al NBT-test (indicador de actividad fagocítica), señala una célula con características comunes a la *stem cell*, los monocitos-macrófagos y los fibroblastos. Seguramente la falta de uniformidad en la expresión de los marcadores de superficie, recogida en la literatura científica, está relacionada con la variabilidad de las condiciones del cultivo, que incluyen el número de células sembradas, el medio de cultivo, la concentración del suero bovino fetal, los períodos de cultivo, los factores estimulantes de la diferenciación y los métodos de detección de marcadores de superficie (inmunocitoquímica o citometría de flujo)¹³.

La cuantificación de las células cultivadas está condicionada por su adherencia al plástico característica, y el despegamiento con tripsina produce distorsiones en la identificación de marcadores; también es un hecho rele-

vante el número de células obtenido, habitualmente pequeño, que suele ser insuficiente para su valoración en los citómetros de flujo. El método de recuento semicuantitativo que utilizamos permite una valoración suficiente de los grados de proliferación para comparar resultados y es fácilmente reproducible; sin embargo, la búsqueda de procedimientos que permitan individualizar a las células adherentes es un objetivo prioritario de la metodología.

La implicación de los *fibroblast-like* en la enfermedad reumatológica es muy significativa por su origen mesenquimal, y ya se han descrito los efectos de fármacos antiinflamatorios como el diclofenaco sódico y los glucocorticoides, o anestésicos locales como la mepivacaína, en la proliferación de los *fibroblast-like* en cultivo en medio líquido¹⁴. También se han registrado alteraciones del patrón de crecimiento (observaciones no publicadas) y la disminución de la actividad condrogénica y osteogénica de las CM en la osteoartritis avanzada¹⁵. El descubrimiento en los últimos años del carácter pluripotente de estas células (células mesenquimales/fibrocitos) y su capacidad de diferenciación de tejidos, como hueso, músculo, cartílago y grasa, las introdujo de lleno en el uso clínico y en la medicina regenerativa. El cultivo en medio líquido de los *fibroblast-like*, a partir de células de sangre periférica, y su expansión con factores de crecimiento abren nuevas posibilidades diagnósticas y terapéuticas.

Bibliografía

- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100:157-68.
- Puck TT, Cieciura SJ, Fisher HW. Clonal growth in vitro of human cells with fibroblastic morphology; comparison of growth and genetic characteristics of single epithelioid and fibroblast-like cells from a variety of human organs. *J Exp Med*. 1957;106:145-58.
- Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (cfu-f) and their progeny. *Blood*. 1980;56:289-301.
- Castro-Malaspina H, Gay RE, Jhanwar SC, Hamilton JA, Chiarieri DR, Meyers PA, et al. Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (cfu-f) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 1982;59:1046-54.
- Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994;1:71-81.
- Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 2003;57:11-20.
- Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:2426-31.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;212-34.
- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001;344:385-6.
- Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Greaves MF. Characterisation of stroma-dependent blast colony-forming cells in human marrow. *J Cell Physiol*. 1987;130:150-6.

11. Kaneko S, Motomura S, Ibayashi H. Differentiation of human bone marrow-derived fibroblastoid colony forming cells (cfu-f) and their roles in haemopoiesis in vitro. *Br J Haematol.* 1982;51:217-25.
12. Park BH, Fikrig SM, Smithwick EM. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic acid. *Lancet.* 1968;2:532-4.
13. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:568-84.
14. Yoldi N. Fibroblast-like cells (f-cfu) from peripheral blood: an in vitro assay to check the influence of several drugs over the culture. *Faculty of Medicine. Zaragoza.* 1990:184.
15. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:704-13.

FE DE ERRORES

En el "In memoriam" publicado en *REUMATOL CLIN.* 2007;3(4):I, se ha detectado una omisión. El firmante de este texto es el Dr. Josep Blanch (Presidente de la Sociedad Española de Reumatología).