

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial**



**CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO Y  
DE LA MÉDULA ÓSEA: COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS DE  
AISLAMIENTO Y CULTIVO IN VITRO**

**Trabajo de Investigación**

**Director: José María Martínez-González**

**Orysy Bukovska**

**Madrid, 2012**

## Agradecimientos

Este trabajo de investigación se ha realizado gracias a la participación de diferentes personas e instituciones sin las que habría sido imposible afrontar con éxito su elaboración.

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor, el Dr. José María Martínez-González, director del presente trabajo por haber confiado en mí y por compartir sus conocimientos y experiencia investigadora. También por recalcar la importancia de la identificación del proyecto, por apoyarlo y orientarme.

Al Dr. José Luis López Lacomba por haber facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de este trabajo, por acogerme en el laboratorio y abrirme las puertas hacia un mundo diferente del que meses atrás me veía incapaz de formar parte.

A Ana Civantos Fernández que ha puesto a mi disposición toda su ayuda, conocimientos y apoyo. Le agradezco enormemente las lecturas y comentarios, sus correcciones, consejos y la infinita paciencia que ha tenido conmigo.

Agradecer igualmente al Dr. Enrique Martínez Campos, a Rodrigo Guzmán Martínez y a Juan Alfonso Redondo Martín por estar en los momentos de duda y por hacerme ver con optimismo mis pequeños y grandes tropiezos en los quehaceres del laboratorio.

A mis padres y a mi hermana por contar siempre con su apoyo y por la seguridad de saber que siempre estarán allí.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción y justificación</b>	<b>3</b>
<b>2. Hipótesis de trabajo y objetivos</b>	<b>11</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>12</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>26</b>
<b>5. Discusión</b>	<b>37</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>43</b>

## I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La historia de las células madre comenzó con su primera descripción por Becker en 1963<sup>(1)</sup>. Desde entonces se han ido realizando numerosos estudios que han contribuido a un mayor conocimiento sobre estas células, gracias, sobre todo, a su innegable potencial en la terapia celular y en la medicina regenerativa<sup>(2,3)</sup>.

Las células madre son un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un potencial proliferativo elevado y, además presentan dos características fundamentales: son capaces de autorrenovarse, es decir, de formar células idénticas a la célula de origen, y de diferenciarse en uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo<sup>(1, 2,4-8)</sup>.

Evolutivamente las células madre se pueden clasificar en embrionarias y adultas o postnatales<sup>(4,7-9)</sup>. Las embrionarias derivan de las células del blastocisto y se consideran totipotentes debido a la posibilidad de dar lugar a cualquier célula del organismo<sup>(4, 6, 8)</sup>, mientras que las adultas, originadas del mesodermo fetal, se encuentran en tejidos u órganos específicos y se consideran células multipotentes ya que presentan una capacidad de diferenciación más restringida pudiendo dar lugar a múltiples linajes celulares que constituyen un tejido<sup>(2, 4, 6, 8)</sup>.

A su vez, existen dos tipos bien diferenciados de células madre postnatales o adultas, las hematopoyéticas de las que derivan todas las células sanguíneas y las mesenquimales (MSCs)<sup>(4, 5, 9, 10)</sup>.

Las células hematopoyéticas han sido las más estudiadas (desde los años 50) y en la actualidad se tiene un panorama bastante claro sobre su estructura y biología<sup>(2)</sup>. Por el contrario, la investigación sobre las MSCs comenzó en la década de los 70 y estuvo

enfocada principalmente al conocimiento de su papel en la formación del estroma hematopoyético <sup>(2)</sup>.

La primera mención en la literatura sobre este último tipo celular se atribuye a Friedenstein <sup>(2,11-13)</sup>, quien las aisló de médula ósea adulta de ratones y cobayas <sup>(2, 14)</sup>. En su publicación se refiere a estas células con el nombre de mecanocitos estromales o unidades formadoras de colonias de fibroblastos y afirma que se trata de células que forman parte del estroma medular dando origen al microambiente hematopoyético presentando, además, la capacidad de adherirse al plástico durante su cultivo in vitro <sup>(2)</sup>.

En estudios posteriores, todos ellos llevados a cabo en diferentes modelos de experimentación animal, se demostró la gran capacidad proliferativa y de autorrenovación, así como la multipotencialidad de las MSCs derivadas de la médula ósea (BM-MSCs) <sup>(2)</sup>. En cuanto a esta última propiedad se vio que las BM-MSCs podían derivar a células de tejidos de origen mesodérmico como los osteocitos, condrocitos o adipocitos <sup>(4, 11, 15-21)</sup>.

Desde la década de los 90 hasta la actualidad numerosas publicaciones han demostrado la presencia de las MSCs en la mayoría de los modelos animales y en humanos <sup>(2)</sup> y se han publicado estudios que sugieren la capacidad de las MSCs de ignorar su linaje de origen exhibiendo una mayor plasticidad en su diferenciación final <sup>(4, 6, 7, 19)</sup>. Así, dependiendo del lugar de migración <sup>(9)</sup> se ha descrito la posibilidad de caracterización de las MSCs en células de cualquiera de las tres hojas blastodérmicas como las neuronas, hepatocitos o células epiteliales <sup>(6, 14)</sup>.

Debido a que las MSCs presentan una morfología similar a la de los fibroblastos <sup>(11)</sup> y, además, carecen de marcadores de membrana específicos, la comunidad científica ha decidido que para que una célula mesenquimal sea considerada progenitora debe cumplir tres requisitos bien definidos: la capacidad de autorrenovación, de diferenciación y la existencia/ausencia de un grupo de marcadores de membrana entre los que deben tener marcaje positivo para CD9, CD29, CD44, CD51, CD59, CD90,

CD105, HLA1, D7-FIB y ausencia de CD34, CD133, HLA-DR <sup>(11)</sup>.

En cuanto a las propiedades biológicas de las MSCs que han despertado el interés de diferentes grupos de investigación <sup>(10)</sup> cabe destacar su capacidad de contribuir al mantenimiento <sup>(6, 22)</sup> y a la regeneración de múltiples tejidos <sup>(6, 9, 23)</sup> gracias, no sólo a su capacidad de diferenciación, sino también al tropismo hacia los tejidos afectados y a la función antiinflamatoria <sup>(22, 24)</sup> mediada por el amplio abanico de factores de crecimiento y citoquinas secretadas por las propias células <sup>(14, 22, 24)</sup>.

Entre otros mecanismos de acción descritos para las MSCs destaca su actividad inmunomoduladora <sup>(14, 18, 24)</sup> por medio de la supresión de distintos componentes de la respuesta inmune tanto innata como adquirida <sup>(20)</sup>. Así, las MSCs ejercen su actividad sobre los linfocitos T <sup>(21, 24)</sup> y B, las células dendríticas derivadas de los monocitos <sup>(6, 20, 23)</sup> y las células NK <sup>(17,24)</sup>.

La acción inmunomoduladora involucra mecanismos directos dependientes de contacto célula-célula, e independientes que se basan en la producción de sustancias solubles inmunosupresoras como TGF- $\beta$ , NO, PGE<sub>2</sub> o IL-10 entre otras <sup>(20, 24)</sup>.

Esto hace que las MSCs gocen de ciertos privilegios por parte del sistema inmune, siendo posible su administración repetida o por vía intravenosa sin la necesidad de administración de inmunosupresores en los modelos de experimentación animal <sup>(20, 24)</sup>.

Además, al ejercer una acción antiapoptótica sobre los neutrófilos, las MSCs permiten una más rápida liberación de estos elementos celulares en su forma madura ante una agresión infecciosa del organismo, por tanto podrían jugar un papel importante en la lucha contra las infecciones <sup>(20)</sup>.

Todas estas cualidades de las células madre mesenquimales de la médula ósea han abierto una nueva frontera en el desarrollo de futuros métodos para la ingeniería tisular con el objetivo de generar tejidos nuevos funcionalmente activos a partir de células procedentes de cultivos y de biomateriales que sirven de soporte <sup>(1)</sup>.

Sin embargo la escasa representatividad de las MSCs en la médula ósea (1 de cada 10 a la 5 ó 6 células del estroma de la médula ósea es una célula madre mesenquimal) <sup>(16, 25)</sup>

hace que la disponibilidad de esta población celular continúe siendo un desafío tanto en la experimentación como en su aplicación clínica <sup>(7)</sup>.

Por este motivo, y aunque la médula ósea ha sido el sitio de referencia para el aislamiento de las MSCs <sup>(6, 10,23, 26)</sup>, durante la última década, estudios de diferentes grupos de investigación han identificado otras fuentes de obtención de estas células <sup>(8, 11, 15, 26)</sup> pudiendo ser extraídas de tejidos de origen mesodérmico como el músculo, la pulpa dental o el tejido adiposo; endodérmico como el intestino o ectodérmico como la piel <sup>(4, 6, 23)</sup>.

La primera vez que se describió la existencia de células mesenquimales en el tejido adiposo subcutáneo fue en el año 2001 por Hedrick <sup>(7, 11, 16)</sup> quien las bautizó con el nombre de PLA (Processed Lipoaspirated Cells) <sup>(7, 11)</sup>. Este autor las aisló por digestión enzimática con colagenasa <sup>(7)</sup> de la llamada porción vasculoestromal del tejido graso formada por células endoteliales, músculo liso y células madre <sup>(8)</sup>. En su publicación, Hedrick las definió como un grupo de células homogéneas de aspecto fibroblástico, con capacidad de adhesión a los plásticos, de autorrenovación y de diferenciación a osteocitos, condrocitos y adipocitos durante su cultivo in vitro <sup>(8, 11)</sup>. Además, en el mismo estudio, al analizarse el fenotipo celular, se ha observado que éste es muy similar al descrito para las MSCs progenitoras de la médula ósea <sup>(1, 11)</sup>. En 2004 se estableció su marcaje positivo para CD29, CD44, CD90 Y CD105 y negativo para CD34, CD45 y CD133 <sup>(11)</sup> y se las bautizó con el nombre de ASCs (Adipose Stem Cells) <sup>(7, 11)</sup>.

Esta definición de las células mesenquimales obtenidas del tejido adiposo es muy similar a la propuesta para las extraídas de la médula ósea <sup>(1, 11)</sup>. Además, en estudios posteriores al de Hedrick se ha corroborado que este tipo celular presenta unas propiedades regenerativas, inmunomoduladoras y antiinflamatorias similares a las células estromales de la médula ósea, por eso el tejido adiposo se considera cada vez más como una fuente alternativa de células estromales multipotentes frente a la médula ósea u otros tejidos <sup>(7, 11, 27)</sup>.

De hecho el tejido adiposo confiere numerosas ventajas frente a la extracción de las células multipotentes de la médula ósea, ya que supone unos procedimientos de

extracción, por medio de la liposucción o de biopsia tisular, menos invasivos que se pueden llevar a cabo bajo anestesia local y resultan en la obtención de una mayor cantidad de tejido estromal <sup>(1, 7, 11, 16, 22, 27-29)</sup>.

Sin embargo las ASCs también presentan ciertas limitaciones. En este sentido cabe destacar su restringida capacidad de crecimiento, es decir, no son células inmortales <sup>(1, 7)</sup> por lo que su capacidad de cultivo estará restringida al igual que en las MSCs obtenidas de la médula ósea <sup>(1)</sup>. Por otro lado es bien conocida la variación de la actividad metabólica del tejido adiposo y en su capacidad de proliferación y de diferenciación dependiendo de su localización así como de la edad y el sexo del paciente o del animal de experimentación <sup>(1)</sup>.

A pesar de esto, en la mayoría de los estudios no se incide sobremanera en estas limitaciones, aun así se deben tener en cuenta a la hora del diseño experimental o su posible aplicación clínica <sup>(1)</sup>.

Durante las dos últimas décadas las MSCs se han convertido en el centro de numerosas investigaciones con el fin de establecer su utilidad en la ingeniería tisular y de definir las posibles aplicaciones terapéuticas de las mismas <sup>(30)</sup> tanto en un sinfín de enfermedades sistémica <sup>(6, 11, 17, 24, 34)</sup> como locales <sup>(4, 35)</sup>.

La aplicación de las MSCs en Odontología se debe a una cada vez más creciente necesidad de tratamientos más efectivos que disminuyan la morbilidad del paciente y mejoren el resultado y el pronóstico final del caso <sup>(4)</sup>.

En este sentido cabe destacar defectos tisulares muy grandes que el cuerpo no puede reparar por sí mismo <sup>(4)</sup> debido a la más o menos marcada inmunosupresión que pueda presentar el paciente a causa de la radioterapia, infecciones o toma prolongada de fármacos que afectan al metabolismo óseo <sup>(31, 32)</sup>. Aunque los injertos constituyen un tratamiento estándar bastante aceptable en estas situaciones, la morbilidad de la zona donante y la limitada cantidad de tejido que se puede obtener constituyen una importante desventaja de los mismos <sup>(4, 33)</sup>, lo que nos lleva en busca de modalidades



terapéuticas novedosas que se ajusten a los requerimientos del paciente y del profesional <sup>(4)</sup>.

Igualmente se está estudiando el papel de las MSCs en periodoncia para la regeneración de defectos que deja a su paso la enfermedad periodontal <sup>(4, 9)</sup>, en implantología por la capacidad de las MSCs de mejorar la cicatrización y la osteointegración en situaciones de una pobre cantidad y calidad ósea, y en las alteraciones de la ATM de etiología traumática o degenerativa por la posibilidad de evitar complicaciones como rechazo inmunológico del cóndilo, morbilidad de la zona donante o aflojamientos de las prótesis condilares metálicas <sup>(4)</sup>.

A pesar de las posibles aplicaciones de la terapia celular con MSCs <sup>(10)</sup> dos problemas fundamentales limitan su utilización de una manera más normalizada <sup>(16)</sup>. En primer lugar hay que tener en cuenta que dichas células madre se encuentran en bajo número en los tejidos adultos y, para la mayoría de las aplicaciones, sería necesario realizar una gran expansión *in vitro* <sup>(16)</sup>. En segundo lugar, una vez extraídas de su entorno natural, estas células muestran una gran tendencia a diferenciarse perdiendo, total o parcialmente, su multipotencialidad <sup>(16)</sup>.

Por tanto, la muestra primaria de células no debe ser muy escasa, con el objeto de minimizar el tiempo de expansión *in vitro* y evitar mantenimientos prolongado de las MSCs en los cultivos <sup>(9, 14, 16)</sup> aprovechando al máximo su capacidad de diferenciación a otras estirpes celulares <sup>(9)</sup> y minimizando el riesgo de transformaciones espontáneas malignas <sup>(9, 14, 16, 36)</sup>.

A priori el tejido adiposo parece ser una fuente más práctica de células mesenquimales para la medicina regenerativa, por su rapidez de obtención, mayor pureza y cantidad de células obtenidas en esa muestra primaria <sup>(11)</sup>. Sin embargo todavía no se ha investigado lo suficiente sobre su potencial de proliferación, la capacidad osteogénica <sup>(12)</sup> o el tiempo máximo de cultivo antes de entrar en fase de senescencia, sobre todo en comparación con las MSCs procedentes de la médula ósea <sup>(29)</sup>.

Como todos los avances en el campo de la ciencia básica, para llegar a ser realidad clínica es necesario que las MSCs se prueben bajo las condiciones experimentales que

impone la vía de los ensayos clínicos <sup>(11)</sup>.

Con este fin se han empleado numerosos modelos de experimentación animal <sup>(6, 15, 25)</sup> como ratas, ratones o cerdos y se han diseñado metodologías para la extracción, purificación y manipulación ex vivo de las MSCs de distinto origen <sup>(16)</sup>.

Los resultados de numerosos estudios sugieren la posibilidad de presencia de variaciones ente las especies tanto en lo referente a los procedimientos de extracción y aislamiento de las MSCs en el laboratorio como al comportamiento biológico de las células de distinto origen <sup>(37)</sup>. Así, sería relativamente sencillo de obtener MSCs de la médula ósea humana para su posterior cultivo, sin embargo, este mismo procedimiento puede entrañar una gran dificultad técnica en el caso de los roedores <sup>(38)</sup>. Esto podría limitar la realización de muchos experimentos que se pretenden llevar a cabo en esta especie animal <sup>(12, 38)</sup>.

Debido a que la adecuada selección de la población celular que se pretende estudiar puede suponer un paso crucial en los resultados que se obtienen en los experimentos con las MSCs in vivo, este punto sería uno de los más importantes a la hora de diseñar un estudio con las MSCs <sup>(12)</sup>.

Otro aspecto, no menos importante, que se debe tener en cuenta cuando se trata de las MSCs, independientemente de su origen, es el establecimiento de unos protocolos de aislamiento y expansión rigurosos para asegurar la bioseguridad de los ensayos <sup>(16)</sup>.

Cuando se marcan unas pautas claras en este sentido, es posible obtener cientos de millones de células a partir de un solo donante <sup>(1, 15)</sup>. Además disponemos de la opción de crioconservarlas durante largos períodos de tiempo en nitrógeno líquido manteniendo su vitalidad así como las propiedades biológicas <sup>(11)</sup>.

La literatura internacional reporta diferentes protocolos para el aislamiento y cultivo de las células mesenquimales tanto de la médula ósea como de origen adiposo. Aunque una gran parte de estos protocolos son efectivos, se ha podido determinar que en la mayoría de los casos en que son puestos en práctica, se dan crecimientos celulares muy pobres <sup>(8)</sup>. De esto se puede deducir que hasta el momento no existen

métodos, fuentes ni protocolos estandarizados para el aislamiento y cultivo de las células mesenquimales <sup>(8, 25)</sup>.

En el presente estudio se ha diseñado un modelo de experimentación con células mesenquimales *in vitro* con la finalidad de proponer unos protocolos homogeneizados de extracción, aislamiento y cultivo de las MSCs de origen adiposo y de la médula ósea.

Consideramos este estudio como un paso previo que ayude en la familiarización y adiestramiento del operador con los procedimientos de laboratorio de extracción, aislamiento y cultivo de las MSCs, y permita la obtención de resultados que sirvan de base sólida en la toma de decisiones a la hora de elegir la fuente de obtención de MSCs en un estudio posterior en el que se pretenderá probar el potencial terapéutico y preventivo de las MSCs sobre los defectos óseos inducidos en un modelo de experimentación animal por medio de la administración de altas dosis de bisfosfonatos intravenosos.

## II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Consideramos que la adecuada elección de una fuente de obtención de las MSCs podría optimizar la cantidad de células mesenquimales que somos capaces de conseguir por medio del posterior cultivo de las mismas.

La hipótesis de nuestro estudio se basa en que a partir de los protocolos diseñados para la extracción, aislamiento y cultivo de las MSCs de origen adiposo y de la médula ósea vamos a obtener resultados concluyentes que nos permitirán tomar decisiones a la hora de elegir la fuente de obtención de las MSCs para un estudio posterior.

El **objetivo principal** del estudio es proponer un protocolo de aislamiento, expansión y cultivo in vitro de las MSCs de origen adiposo y de la médula ósea poniendo de manifiesto las principales diferencias entre ambas fuentes de obtención de células, así como las posibles ventajas del uso de unas sobre otras derivadas de las discrepancias que se pudieran observar.

Los **objetivos específicos** son:

1. Comparar el tiempo de extracción y de aislamiento de las células del tejido adiposo y de la médula ósea.
2. Determinar el rendimiento del tejido extraído (número de células/gramo de tejido).
3. Determinar la viabilidad celular.
4. Comparar las tasas de proliferación celular de las MSCs de la médula ósea y del tejido adiposo en dos medios de cultivo diferentes.
5. Determinar y comparar el número de pasajes necesarios para que las células presenten signos de senescencia.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. Tipo de estudio y diseño general

Se trata de un estudio descriptivo, longitudinal de 2 meses de duración en el que se ha evaluado el comportamiento *in vitro* de las células mesenquimales obtenidas de la médula ósea y del tejido adiposo de un modelo de experimentación animal, conejos de género cuniculus, especie neozelandesa.

#### 2. Definición operacional de las variables.

Las variables de este estudio son:

1. Tiempo de extracción y aislamiento
2. Rendimiento del tejido extraído (número de células/gramo de tejido).
3. Viabilidad celular
4. Tasa de proliferación celular en dos medios diferentes.
5. Número de pasajes necesarios para producirse rarefacción celular

Estas variables se han clasificado en **cuantitativas**:

##### 1. Continuas:

- Tiempo de extracción y aislamiento
- Viabilidad celular
- Tasa de proliferación celular

## **2. Discretas:**

- Rendimiento del tejido extraído (Nº células/gramo de tejido extraído)
- Número de pasajes hasta producirse rarefacción celular

En función de su influencia en el estudio, clasificamos las variables en:

*1. Variables independientes:* las muestras de células mesenquimales extraídas del tejido adiposo y de la médula ósea.

*2. Variables dependientes:*

1. Tiempo de extracción y aislamiento
2. Rendimiento del tejido extraído (nº células/gramo de tejido extraído)
3. Viabilidad celular
4. Tasa de proliferación celular en dos medios de cultivo diferentes
5. Número de pasajes hasta producirse rarefacción celular

## **3. Desarrollo del proyecto**

Para llevar a cabo el estudio pedimos la autorización del Comité de Experimentación Animal (CEA) de la Universidad Complutense de Madrid. Los animales fueron tratados siguiendo las normas de la Directiva Europea 86/609 y el Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos B.O.E de 18 de marzo de 1988.

Contamos con el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid para la estancia de los animales de experimentación y su sacrificio para la posterior obtención de las muestras.

Los animales se mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada con ciclos alternos de 12 horas de luz-oscuridad y se les proporcionó comida y agua *ad libitum* durante todo el período de observación. Se excluyeron aquellos animales con signos de infección o de angustia.

El sacrificio se realizó por medio de una inyección de Tiopental Sódico (Doletal®) 4 ml por vía intravenosa a través de la vena marginal de la oreja.



Figura 1. Sacrificio.

Tras el sacrificio se procedió a la obtención de las muestras de tejido de la médula ósea y del tejido adiposo por el mismo investigador.

### **Protocolo de extracción de las MSCs de la médula ósea (BM-MSCs)**

Por medio de una simple incisión longitudinal a lo largo del muslo, se separó todo el tejido blando que rodea el fémur para retirarlo por medio de la rotura de las dos articulaciones que lo unen al cuerpo del conejo.

Tras la limpieza y el lavado del fémur se realizaron dos cortes transversales a nivel de las metáfisis del hueso. Se preparó una aguja, una jeringa (BD Plastipak®) de 5 ml y 2 falcóns (Deltalab®) con medio alfa-MEM (*Minimum Essential Medium alpha*) (Invitrogen®) o DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) (Invitrogen®) suplementados con FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Alonza®) y con penicilina/estreptomicina (Alonza®) más fungizona (Sigma®). Se llenó la jeringa con el medio de uno de los falcóns y se hizo pasar a través de la cavidad medular del fémur depositándose su contenido en el otro falcón con medio que se cerró y que ya contenía las células de dicha cavidad.

En el Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid se llevó a cabo el procesamiento de las muestras para el aislamiento, el cultivo y el análisis del comportamiento biológico de las MSCs, así como congelación de las células cultivadas.

Por tanto, una vez en el laboratorio, pesamos con la balanza calibrada (Precisa® 40 SM-200A) el falcón con la muestra de tejido obtenido de la médula ósea y restamos el peso inicial del falcón con el medio sin la muestra, para, obtener así el peso de ésta última.

En la campana de flujo laminar homogeneizamos el contenido de la muestra. Se realizó un lavado con la jeringa que permitía la eliminación de componentes tisulares más grandes, y a continuación usamos agujas de 0,9x25mm y 0,8x40mm para llevar a cabo una disgregación más fina. Tras la disgregación se realizó la centrifugación de las muestras a 1000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante para obtener el botón celular.



El botón celular se resuspendió en un nuevo falcón con medio de cultivo y se pasó a flasks (Sarstedt®) de 175 cm<sup>2</sup>, con medio MEM o DMEM completos más fungizona hasta llegar a los 50ml. Los flasks se llevaron a la incubadora para el cultivo de las células a 37° y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

A las 24 horas se eliminaron las células no adheridas con lavados con PBS y se realizó un cambio de medio para que las adheridas continuasen creciendo hasta llegar a un 90% de confluencia. A partir de este punto se realizó la tripsinización de las células (0,05% de tripsina-0,01% de EDTA) (Alonza®) para su posterior congelación.

### **Protocolo de extracción de las MSCs del tejido adiposo (ASCs)**

Las muestras de tejido adiposo fueron extraídas de la región inguinal practicando una biopsia subcutánea y se colocaron en falcóns con medio MEM ó DMEM manteniéndose en frío hasta llegar al laboratorio.

En el laboratorio pesamos la muestra de tejido obtenido y una vez en la campana de flujo laminar, se introdujo el tejido en una placa de Perti con 10 ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para picarla con unas tijeras estériles en pequeños trozos de 2 mm y facilitar, de esta manera, el efecto de la colagenasa I (Sigma®).



Figura 2. Muestra de tejido adiposo.

Preparamos 50ml de solución de colagenasa al 0,075% en PBS. Teniendo en cuenta

que por cada miligramo de tejido extraído necesitamos un mililitro de solución de colagenasa tipo I (1 mg/1ml), hicimos el cálculo de los mililitros finales de colagenasa que requerimos en función del peso total de nuestra muestra de tejido.

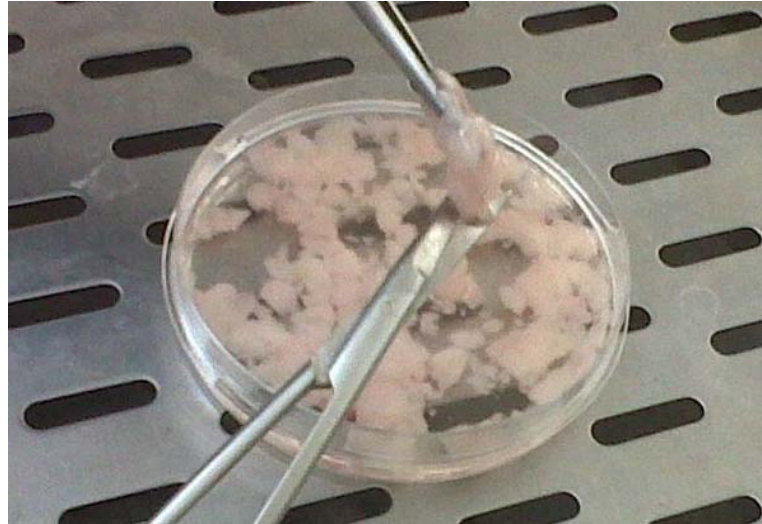


Figura 3. Cortes en trozos de 2 mm de la muestra de tejido adiposo.

Así, los trozos obtenidos se pasaron de la placa de Petri a un falcón y se les añadió los mililitros correspondientes de colagenasa tipo I. Todo esto se procesó a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 60 minutos.

Transcurrido este tiempo se llevó a cabo la centrifugación de la muestra en el falcón a 1000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante para obtener el botón celular.

El botón celular se resuspendió en un falcón con medio de cultivo correspondiente MEM o DMEM para, a continuación, añadirlo a un flask de 175 cm<sup>2</sup> que se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Después de la incubación se realizaron lavados extensivos con PBS para eliminar las células residuales no adherentes. Las células adheridas se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en el medio de crecimiento hasta el momento en que se observó una confluencia de las mismas de un 90%.

De esta forma obtuvimos dos líneas celulares de MSCs, las procedentes de la médula ósea y las del tejido adiposo. A su vez, cada una de estas líneas se cultivó en dos

medios de cultivo diferentes, el MEM o el DMEM.

	MSCs Tejido adiposo	MSCs Médula ósea
DMEM	MSCs TA DMEM	MSCs MO DMEM
MEM	MSCs TA MEM	MSCs MO MEM

Tabla 1. Distribución de los grupos celulares de las MSCs según el origen y el medio de cultivo

Tras los procedimientos de extracción de las MSCs de los dos sitios se intenta homogeneizar el resto de los pasos de pasajes celular, congelación y descongelación de las células.

### Realización de pases de células mesenquimales

1. Preparación del medio de cultivo. El medio usado para el cultivo celular es el MEM o el DMEM. En un falcón a 45 ml de medio añadimos 5 ml (10%) de suero fetal bovino (FBS) (Alonza®), 500 microlitros (1%) de una combinación de antibiótico-antifúngico: penicilina (100 U/mL)/Esteptomicina (100 microgramos/mL)/Fungizona (200 microlitros).
2. Filtración del medio de cultivo completado en el paso anterior con un filtro de 0,22 $\mu$  y una jeringa estéril depositando el contenido en un falcón nuevo.
3. Se retira de la estufa o incubadora de CO<sub>2</sub> las células contenidas en un flask. La

función de la estufa es mantener la temperatura de 37°C en una atmósfera con presión controlada de CO<sub>2</sub> de 5% y adicionalmente de humedad elevada.

4. En la cámara de flujo laminar retiramos el medio de cultivo de las células sacadas de la estufa y las lavamos dos veces con 5 ml PBS.

5. Disgregación de las células. Se realiza con 500 microlitros de tripsina por 25 cm<sup>2</sup> del flask y se deja 10 minutos en la incubadora de CO<sub>2</sub>.

6. En un nuevo falcón se añaden 10 ml de medio completado y 5 ml en el flask de 25 cm<sup>2</sup>.

7. Se retiran las células de la estufa y se agita el flask para conseguir la separación de las células de la superficie de plástico.

8. Disgregación de las células con una pipeta tipo Pasteur dentro del flask durante 2 minutos para terminar de separarlas entre sí. Se reúnen todas las células en la pipeta y se resuspenden en 10 ml de medio del último falcón.

9. Recuento celular en la cámara de Neubauer. Se añaden 10 microlitros de células con el medio en cada uno de los espejos de la cámara y se cuentan las células al microscopio óptico.

10. Realización de cálculos para determinar los mililitros de células con medio que hay que añadir al flask para obtener un determinado número de células cuando se vaya a realizar el siguiente pase (dentro de 3-4 días).

11. Adición del volumen de células necesario en el flask en el que previamente depositamos 5 ml de medio y lo dejamos en la estufa hasta el siguiente pase que se realiza cada 3 ó 4 días.



Figura 4. Cultivo celular en la estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Congelación de células**

1. Contar en la cámara de Neubauer las células totales que se han obtenido en un falcón.
2. Hacer un pase celular y contar las células restantes. Sabiendo el número de células que hay por mililitro y el volumen de las células con el medio que ha quedado se puede obtener el número total de células.
3. Pesar las células con el medio y después el falcón con la tapa y restar. Poner un falcón control que pese igual en la centrifugadora.
4. Centrifugación de las células a 1500 rpm durante 5 minutos para obtener un pellet.
5. Quitar el medio y resuspender las células en criotubos (Sarstedt®) de 1 ml, con un

90% de medio completo (5600  $\mu$ l) y 10% de dimetil sulfoxido, DMSO (Panreac®) (400  $\mu$ l), de tal forma que por cada mililitro haya un millón de células.

6. Los criotubos se colocan a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante una semana y después en nitrógeno líquido (Air Liquid®) a  $-178^{\circ}\text{C}$ .



Figura 5. Congelación de células.

### **Descongelación de células**

1. Retirar el vial de 1 ml con un millón de células de la cámara de nitrógeno líquido y descongelarlo aplicando agua caliente o colocándolo en una cámara a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.

2. En un flask de  $175\text{ cm}^2$  se añaden 50 ml de medio MEM o DMEM completo y a continuación las células y se coloca el flask en la estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  para su cultivo durante 3-4 días.

### **Ensayo de viabilidad celular de Alamar Blue®**

Se trata de un ensayo que permite determinar la viabilidad y proliferación celular por medio de la detección y medición de la fluorescencia o absorbancia.

El resazurín es el principio activo del reactivo de Alamar Blue®. Entre sus características destaca su color azul, la capacidad de atravesar las membranas

plasmáticas celulares, la ausencia de citotoxicidad y de fluorescencia. Al penetrar en el interior de las células, se reduce a resorufín, un compuesto de color rojo y altamente fluorescente. Esta reacción de óxido-reducción sólo tiene lugar en las células viables.

El pico de excitación es de 570nm (540-570nm) y el de emisión de 585 nm (580-610 nm). Para medir la absorbancia se debe emplear a 570-600 nm. En este estudio vamos a determinar la señal de fluorescencia que es más sensible y es mejor como método de detección siendo capaz de detectar hasta 50 células en un pocillo.

Para llevar a cabo el ensayo se sembró en la campana de flujo laminar una placa de 48 pocillos (Corning Costar®) con distintas densidades celulares, dejando igualmente pocillos controles con medio de cultivo sin células. La distribución de la placa se muestra en la tabla 2.

	Medio	Medio + 5000 céls/cm <sup>2</sup>	Medio + 10000 céls/cm <sup>2</sup>	Medio + 5000 céls/cm <sup>2</sup> + BMP2	Medio + 10000 céls/cm <sup>2</sup> + BMP2	Ácido acético + Medio	Ácido acético + Medio + 5000 céls/cm <sup>2</sup>	
DMEM								
DMEM								
DMEM								
MEM								
MEM								
MEM								

Tabla 2. Siembra de la placa de 48 pocillos

Las densidades celulares elegida para el estudio han sido de 5000 y 10000 células por 1 cm<sup>2</sup> de superficie de cada pocillo. Se realizó el cálculo de los microlitros de células con

medio que había que añadir y suplementar con medio MEM o DMEM hasta llegar a 400  $\mu$ l del volumen final (VF) por pocillo.

La placa se incubó durante 4 días a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

A los 4 días se ha ido añadiendo en la campana de flujo laminar y en un ambiente de oscuridad una décima parte del volumen final, es decir, 40  $\mu$ l del reactivo de Alamar Blue® (Invitrogen®) a cada pocillo de la placa de 48 que se incubó durante una hora y treinta minutos en la estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación se realizó la lectura de la placa (en el lector de placas FL600, BioTeck) a 530 y a 590nm y la determinación de la viabilidad y proliferación celular por medio del trazado de la curva de intensidad de emisión de fluorescencia de tal forma que a mayor intensidad de emisión mayor es la actividad metabólica total de las células sembradas.

### **Tinciones: Hematoxilina/Eosina, Actina y Hoechst**

**1. Hematoxilina/Eosina (H/E).** Tras el lavado de la placa de 48 pocillos con 400  $\mu$ l de PBS se añadió formaldehído a 3,7% en PBS durante 20 minutos para fijar las células. La secuencia de pasos que se ha seguido:

1. Lavado con etanol absoluto 200 $\mu$ l durante un minuto, dos veces.
2. Etanol al 96% durante un minuto, dos veces.
3. Etanol al 80% durante un minuto, dos veces.
4. Etanol al 70% durante un minuto, dos veces.
5. Agua destilada durante 5 minutos.
6. Hematoxilina (Sigma®) durante 10 minutos.
7. Agua destilada durante 5 minutos.
8. Eosina (Sigma®) 1 minuto y 30 segundos.
9. Etanol al 96% durante 5 minutos



10. Etanol absoluto durante 5 minutos.
11. Observación de las células al microscopio óptico de luz invertida (Leika®).

**2. Tinción de actina.** Permite la visualización de la estructura de F-actina del citoesqueleto celular gracias a su tinción con un derivado fluorescente de faloidina.

El protocolo para la tinción comenzó con el lavado de la placa de 48 pocillos con 400µl PBS y la fijación de las células con formaldehído al 3,7% en PBS igual que para la realización de la tinción de H/E. Los pasos que se han seguido son:

1. Tritón X-100 (Merck®) al 0,1% 200µl durante 10 minutos
2. Lavado con 400µl de PBS.
3. Aplicación de 200µl de un preparado de *Red Texas Phalloidin* (Invitrogen®) diluido en PBS durante 20 minutos. El preparado consta de 180 µl de PBS y 5 µl de actina por cada pocillo y debe mantenerse en oscuridad hasta su aplicación.
4. Lavados sucesivos con 400 µl de PBS.
5. Observación de las células al microscopio de fluorescencia.

**3. Tinción Hoechst.** Permite la visualización de los núcleos celulares. El reactivo de Hoechst es un colorante fluorescente de ADN, que consiste en dos bisbenzimidias muy relacionadas, Hoechst 33258 y Hoechst 33342.

Para la tinción llevamos a cabo el lavado de los pocillos de la placa de 48 con 400µl de PBS y añadimos formaldehído al 3,7% en PBS para fijar las células. Los pasos que se han seguido son:

1. Tritón X-100 al 0,1% 200µl durante 10 minutos

2. Lavado con 400µl de PBS.
3. Aplicación de 200 µl de solución de reactivo de Hoechst (solución comercial 20 Mm) (Sigma®) en PBS durante 20 minutos.
4. Lavados sucesivos con 400 µl de PBS.
5. Observación de las células al microscopio de fluorescencia.

## IV. RESULTADOS

Los resultados del presente estudio se han agrupado en función de los objetivos que nos hemos marcado.

### 1. Tiempos de extracción y aislamiento

La determinación del *tiempo de extracción* se realizó cronometrando el tiempo desde que se llevó a cabo el sacrificio del animal hasta que se obtuvo la muestra de tejido graso o de médula ósea.

Los tiempos de extracción de las muestras de tejido adiposo y de la médula ósea se muestran en la tabla 3. Se ha podido comprobar que la extracción de las muestras de tejido adiposo supuso un menor consumo de tiempo.

	Tejido adiposo	Médula ósea
DMEM	2 min 32 seg	6 min 31 seg
MEM	2 min 12 seg	6 min 10 seg

Tabla 3. Tiempo de extracción de las muestras.

Para calcular el *tiempo de aislamiento* de las MSCs se cronometró toda la fase de procesado de las muestras, desde el comienzo de la manipulación de las mismas en la campana de flujo laminar hasta que los flask con las células de distinto origen se llevaron a la estufa para su cultivo durante 24 horas. No se tuvo en cuenta este primer tiempo de cultivo de 24 horas puesto que fue el mismo para los dos tipos celulares.

Los tiempos requeridos aparecen en la tabla 4, obteniéndose diferencias considerables entre las dos fuentes de obtención de las células, siendo mayor el tiempo requerido para el procesamiento de las muestras de tejido adiposo.

	Tejido adiposo	Médula ósea
DMEM	79 min 00 seg	25 min 16 seg
MEM	82 min 03 seg	26 min 56 seg

Tabla 4. Tiempos de aislamiento de las MSCs.

## 2. Rendimiento del tejido extraído

Para determinar el rendimiento del tejido extraído se pesaron los falcóns con 20 ml del medio de cultivo MEM o DMEM donde se iban a conservar las muestras de la médula y del tejido adiposo hasta su llegada al laboratorio. El peso de los falcóns con el medio fue de 33,97 g.

Tras la operación y una vez en el laboratorio se pesó cada falcón que ya contenía la muestra correspondiente y se restaron los 33,97 g del falcón con medio de cultivo.

Después del proceso de aislamiento de células y dos cambios de medio de cultivo, se realizó el recuento de las células aisladas en la cámara de Neubauer obteniéndose el rendimiento dividiendo el número de células entre los gramos de tejido extraído.

Las tablas 5, 6 y 7 muestran el peso registrado de las muestras, el número de células obtenido a partir de cada una de ellas y el rendimiento final, respectivamente. Se han observado diferencias en el rendimiento entre las dos fuentes de obtención de células mesenquimales, siendo éste mayor en las procedentes de la médula ósea.

	Tejido adiposo	Médula ósea
DMEM	16,14 g	5,09 g
MEM	15,32 g	4,24 g

Tabla 5. Peso de las muestras extraídas.

	Tejido adiposo	Médula ósea
DMEM	$1,5 \times 10^6$ céls	$1,5 \times 10^6$ céls
MEM	$2 \times 10^6$ céls	$10^6$ céls

Tabla 6. Recuento celular.

	Tejido adiposo	Médula ósea
DMEM	$1,5 \times 10^6 / 16,14$	$1,5 \times 10^6 / 5,09$
MEM	$2 \times 10^6 / 15,32$	$10^6 / 4,24$

Tabla 7. Rendimiento.

### 3. Evaluación de la morfología y de viabilidad celular.

Con la realización de diferentes tinciones celulares pudimos evaluar la morfología de las MSCs. En las figuras 6, 7, 8, 9 y 10 se muestran las tinciones de H/E de actina y de Hoetchs.

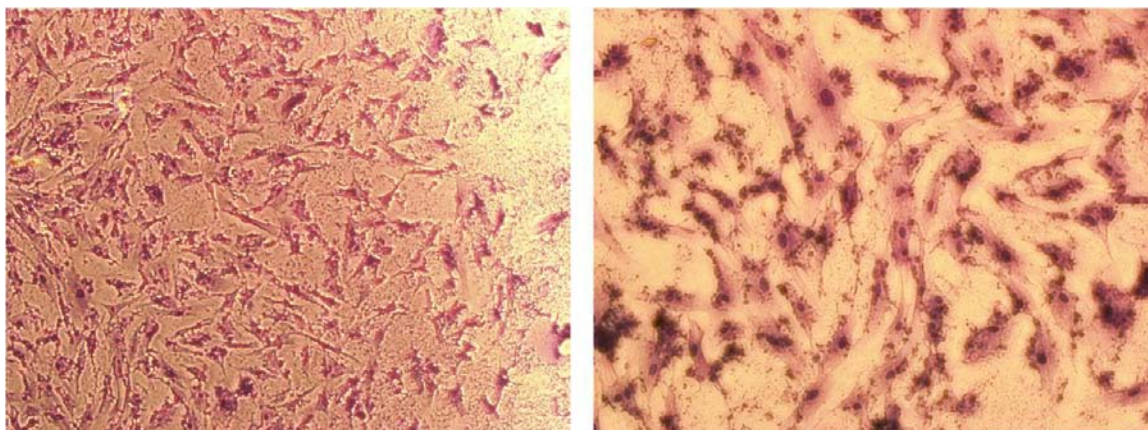


Figura 6. Tinción H/E. Densidad celular  $5000 \text{ céls/cm}^2$  (10X y 20X). Con estas tinciones pudimos observar células de gran tamaño, granulares, de núcleos grandes y nucléolos prominentes.

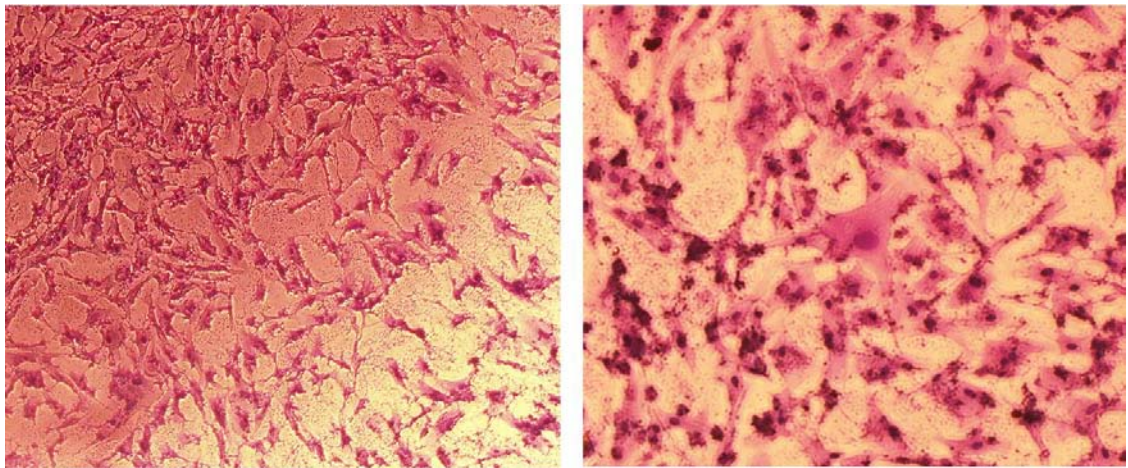


Figura 7. Tinción H/E. Densidad celular 10000 céls/cm<sup>2</sup> (10X y 20X).

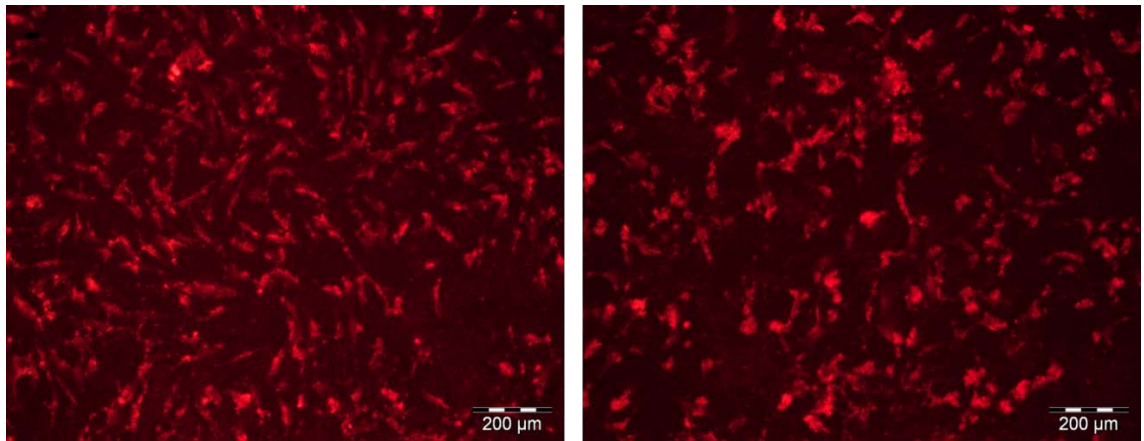


Figura 8. Tinción de actina. Coloración roja del citoesqueleto celular.

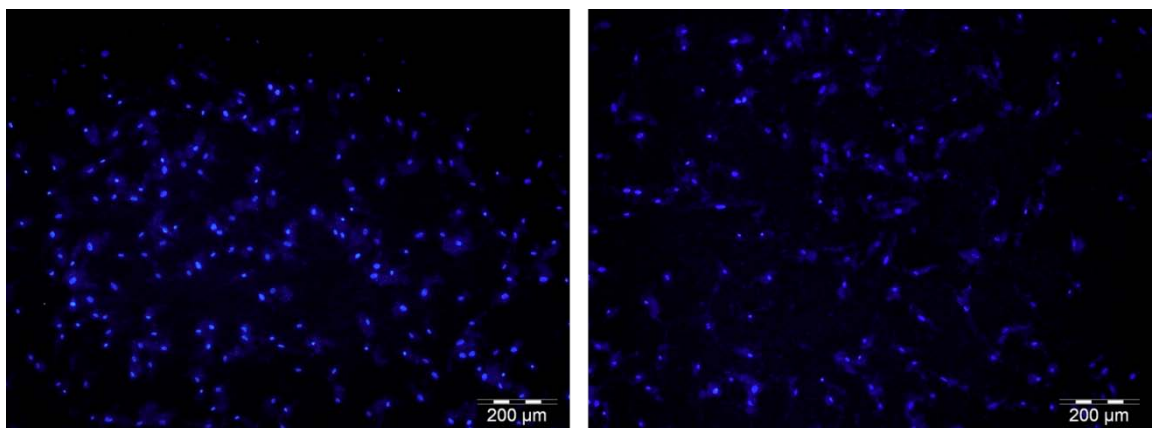


Figura 9. Tinción Hoechst. Coloración azul de los núcleos celulares.

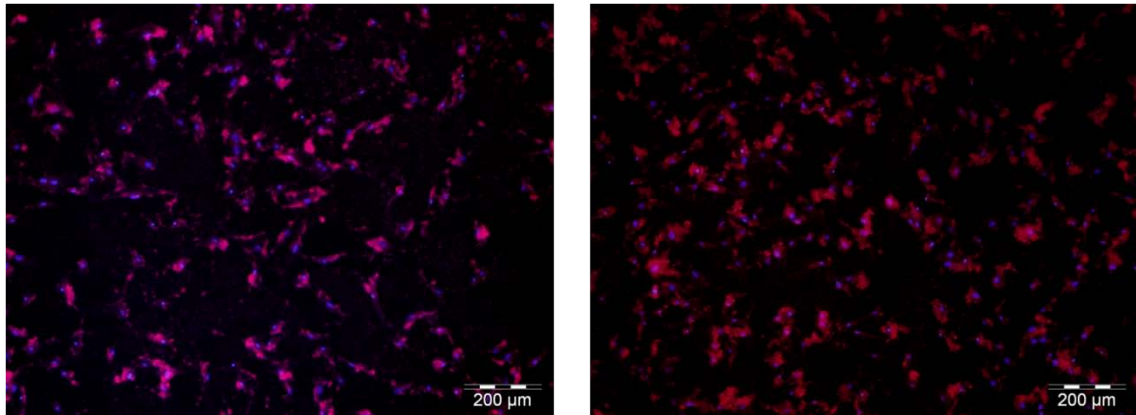


Figura 10. Superposición de las tinciones de actina y Hoechst. Se pueden observar las células con el citoesqueleto de color rojo y el núcleo azul en su interior.

Los resultados del ensayo de Alamar Blue® muestran emisión de fluorescencia de los pocillos sembrados con células al compararlos con los controles que contenían medio de cultivo exclusivamente. Sólo se determinó la viabilidad de las células mesenquimales del tejido adiposo, debido a que la densidad de las células de la médula ósea era muy baja y no permitía la siembra del número deseado de las mismas.

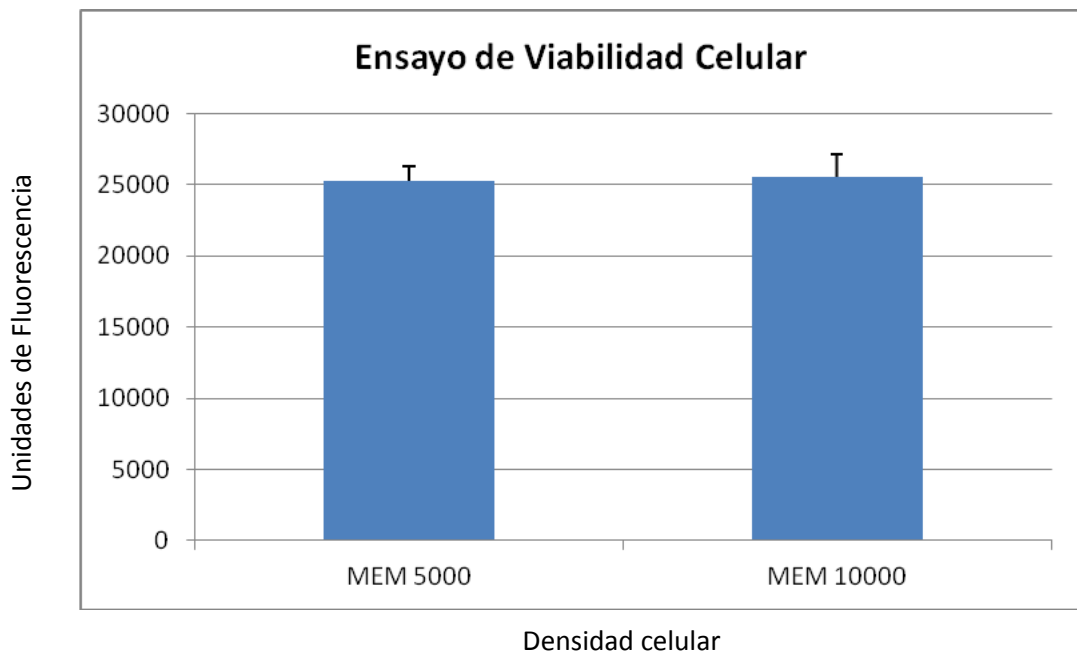


Figura 11. Ensayo de viabilidad celular tras cuatro días de incubación a dos densidades diferentes, 5000 y 10000 céls/cm<sup>2</sup> de las ASCs.

Al cuarto día de cultivo se observó que tanto los pocillos sembrados a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup> como los sembrados a 10000 células/cm<sup>2</sup> emitían fluorescencia siendo mínima la diferencia entre las dos densidades (Figura 11).

4. **Comparar las tasas de proliferación celular en MEM y DMEM.** Se llevó a cabo evaluando el recuento celular a lo largo de los pases tanto en las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo como en las de la médula ósea.

No se han encontrado diferencias importantes en lo referente al potencial de proliferación celular dependientes del medio de cultivo al evaluar el recuento celular a lo largo de los pasajes dentro de la misma población de células. Sin embargo sí hubo diferencias en el ritmo de proliferación entre las BM-MSCs y las ASCs, siendo éste mayor para las últimas.

Nº céls/ml MEM	Nº céls/ml DMEM	Densidad	Flask	Observaciones
500 000 céls/ml MEM	500 000 céls/ml DMEM	500000 céls/ml en 75 cm <sup>2</sup>	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> uno con MEM y el otro con DMEM	Descongelación de células y realización del 1º pase
113 000 céls/ml MEM	88 000 céls/ml DMEM	5000 céls/cm <sup>2</sup>	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> con MEM y DMEM	Pase 2º en los dos flasks
179 000 céls/ml MEM	257 000 céls/ml DMEM	3 500 céls/cm <sup>2</sup>	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> con MEM y DMEM	Pase 3º en los dos flasks
95 000 céls/ml MEM	67 000 céls/ml DMEM	4 500 céls/cm <sup>2</sup>	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> con MEM y DMEM	Pase 4º en los dos flasks
72 000 céls/ml MEM	95 000 céls/ml DMEM	5000 céls/cm <sup>2</sup>	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> con MEM y DMEM	Pase 5º en los dos flasks
68 000 céls/ml MEM	75 000 céls/ml DMEM	1000 céls/cm <sup>2</sup>	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> con MEM y DMEM	Pase 6º en los dos flasks
15 000 céls/ml MEM	30 000 céls/ml DMEM	3000 céls/cm <sup>2</sup>	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> con MEM y DMEM	Pase 7º en los dos flasks

Tabla 8. Recuentos celulares de las ASCs. Se puede observar cómo el ritmo de crecimiento no se ha visto afectado por el medio de cultivo.



Nº céls/ml MEM	Nº céls/ml DMEM	Densidad	Flask	Observaciones
500 000 céls/ml MEM	500 000 céls/ml DMEM	500000 céls/ml en 75 cm <sup>2</sup>	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> con MEM y DMEM	Descongelación de células y realización del 1º pase
-----	-----	-----	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> con MEM y DMEM	Cambio de medio MEM y DMEM
-----	-----	-----	1 flask de 75 cm <sup>2</sup> con DMEM	Cambio de medio DMEM Contaminación de céls en MEM
500 000 céls/ml MEM	8000 céls/ml DMEM	3000 céls/cm <sup>2</sup> DMEM 500000 céls/ml MEM en 75 cm <sup>2</sup>	2 flask de 75 cm <sup>2</sup> con MEM y DMEM	Pase 2º céls DMEM Descongelación céls MEM

Tabla 9. Recuentos celulares de las BM-MSCs. Debido al bajo ritmo de crecimiento, sólo se han podido llevar a cabo dos pasajes celulares con un recuento de 8000 céls/cm<sup>2</sup>.

- Determinar y comparar el número de pasajes necesarios para que las células presenten signos de senescencia** como cambios morfológicos, presencia de células adheridas pero con signos de lisis celular y aumento de relación núcleo/citoplasma así como disminución del ritmo de crecimiento celular.

La valoración del ritmo de crecimiento celular se llevó a cabo determinando el número de células el día de la realización de cada pase y valorando la evolución de ese número de células a lo largo del tiempo.

Para la determinación de la morfología de las células mesenquimales en cultivos se utilizó el microscopio de luz invertida (Leika®). Se han tenido en cuenta las posibles diferencias morfológicas de las células de distinto origen y también de las células de igual procedencia a lo largo de los

sucesivos pasajes.

Una vez en cultivo ambas poblaciones celulares se presentaron como una población homogénea de células elongadas, filiformes, granulares y con digitaciones (tipo fibroblasto). Éstas mantuvieron su morfología por periodos de cultivo relativamente prolongados (1 mes) en el caso de las MSCs de origen adiposo mientras que en el caso de las procedentes de la médula ósea el intervalo de tiempo ha sido de 15 días.

El número de pasajes necesarios para observar un notable descenso del ritmo de crecimiento celular así como morfología celular anómala y aumento de la relación núcleo/citoplasma ha sido de siete en el caso de las MSCs procedentes del tejido adiposo.

Por el contrario las MSCs de origen medular no han superado los dos primeros pases presentando una morfología atípica a lo largo de los tres cambios de medio sucesivos que se les ha ido realizando. Además en sus cultivos se podía observar una mayor cantidad de células desprendidas y el crecimiento se había estabilizado en aproximadamente un 20% de confluencia. Las figuras 11, 12, 13 y 14 muestran la evolución morfológica de las células mesenquimales a lo largo de los pasajes.

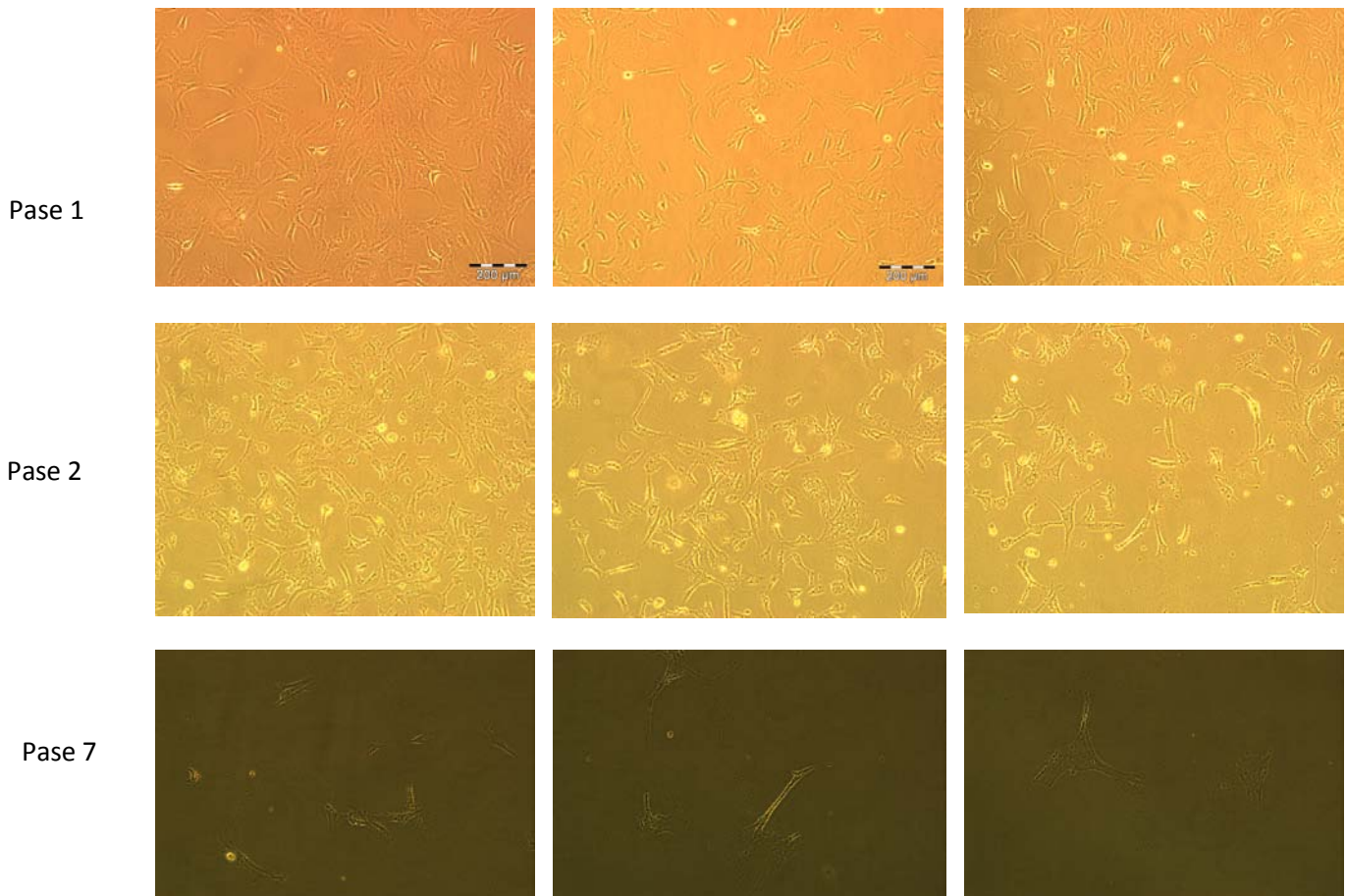


Figura 11. Evolución morfológica de las MSCs de tejido adiposo (ASCs) en medio MEM. Se puede apreciar el descenso del número de células en el pasaje nº7, así como una morfología celular atípica.



Figura 12. Evolución morfológica de las MSCs de médula ósea (BM-MSCs) en medio MEM. Desde la descongelación las células, éstas han presentado un ritmo de crecimiento muy bajo y una morfología distinta a la descrita para este tipo celular así como en comparación con las ASCs del presente estudio.

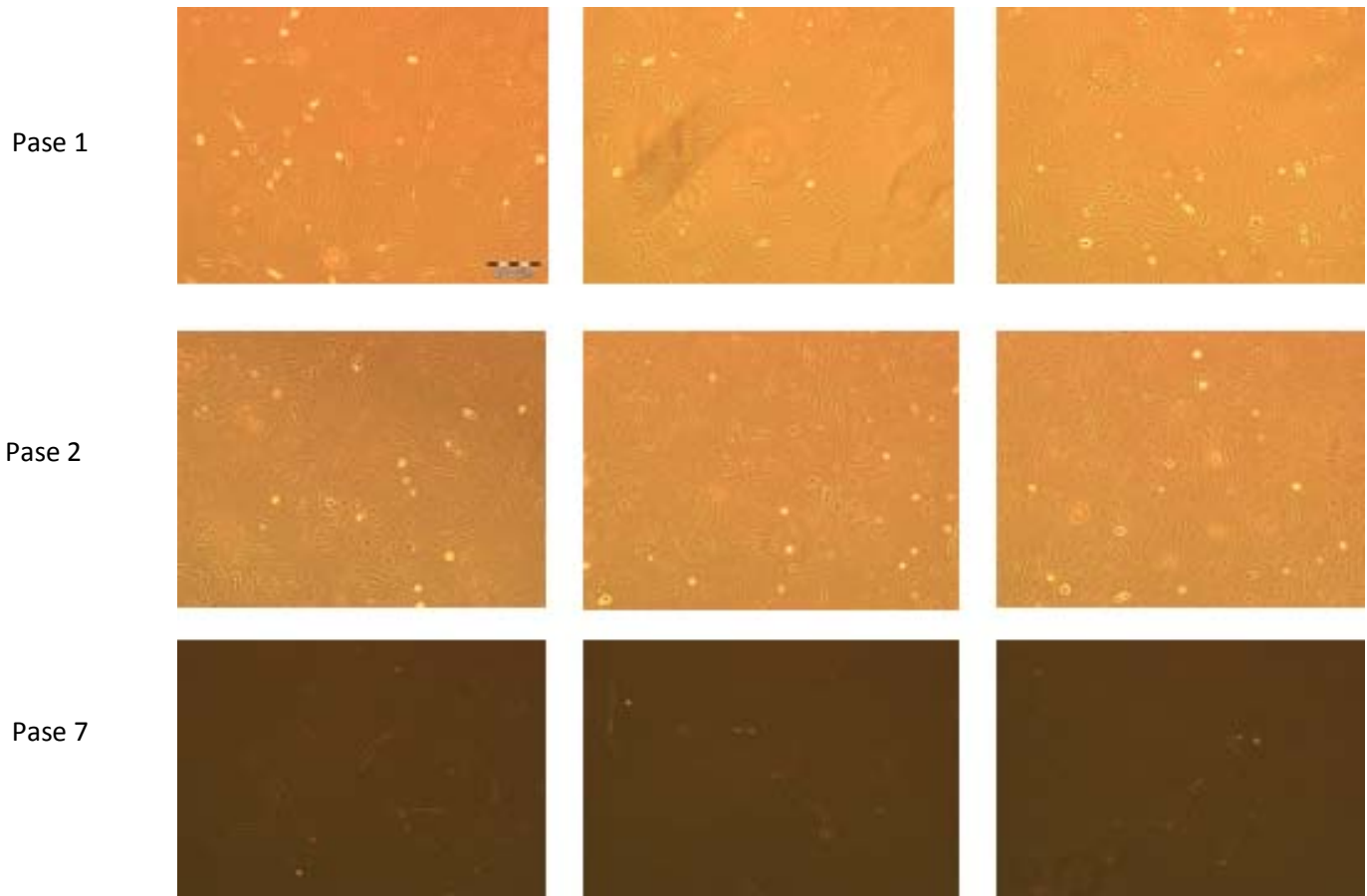


Figura 13. Evolución morfológica de las MSCs de tejido adiposo (ASCs) en medio DMEM.

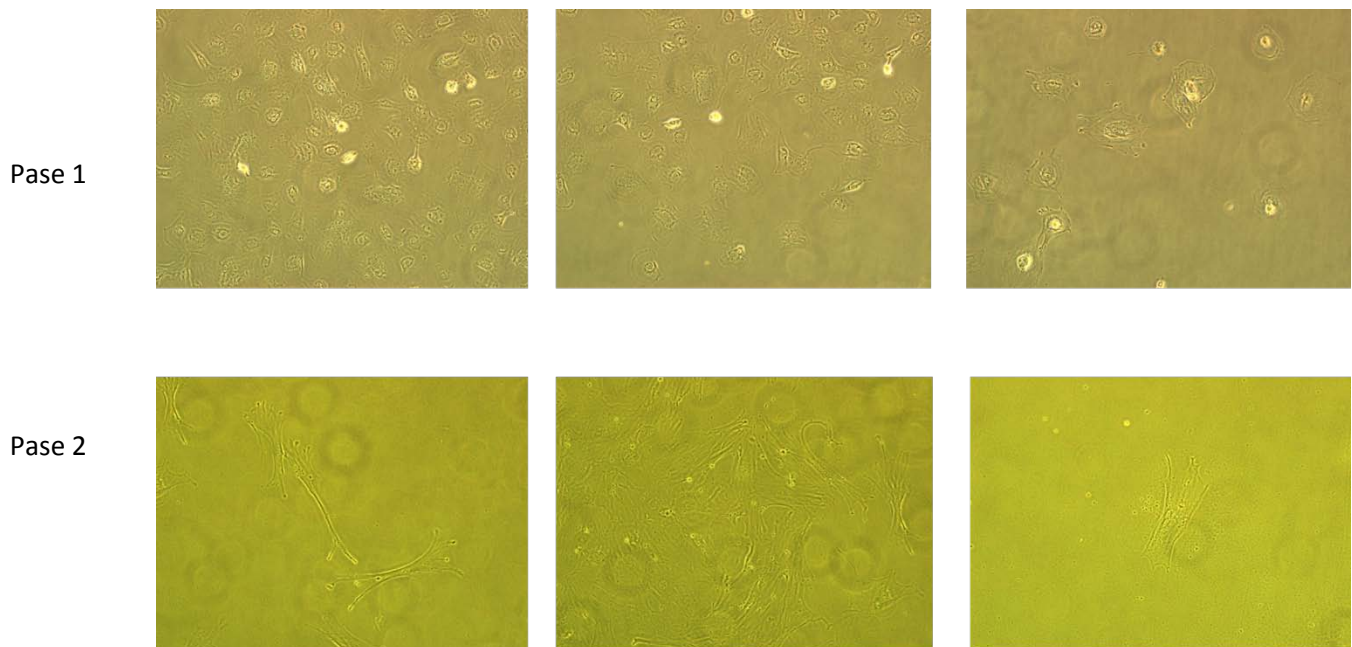


Figura 14. Evolución morfológica de las MSCs de médula ósea (BM-MSCs) en medio DMEM.

Por tanto al comparar el número de pases necesarios para observar signos de senescencia en las dos poblaciones celulares se han obtenido diferencias importantes. Los resultados del número de pasajes se resumen en la tabla 8.

	Tejido adiposo	Médula ósea
DMEM	7 pases	2 pases
MEM	7 pases	1 pases

Tabla 8. Número de pases hasta observarse signos de senescencia celular.

## V. DISCUSIÓN

En este estudio se ha intentado dar un enfoque comparativo a los protocolos de obtención así como a la respuesta biológica de las células mesenquimales de la médula ósea y del tejido adiposo.

Numerosas publicaciones <sup>(1, 7, 10, 25)</sup> recalcan la *facilidad de obtención* de las células mesenquimales del tejido adiposo afirmando que el procedimiento para aislar dichas células es relativamente simple, rápido y seguro y, que va seguido de una expansión in vitro de un gran número de células cuando se compara con las MSCs de origen medular <sup>(25, 28)</sup>.

Según los resultados de nuestro estudio los procedimientos de extracción de las muestras de tejido adiposo han supuesto una menor dificultad técnica al realizarse con una simple biopsia subcutánea. Esto se puede reflejar en un menor consumo de tiempo para la obtención de las muestras de tejido graso.

Sin embargo en lo referente a los procedimientos de purificación y aislamiento de las MSCs se han registrado unos tiempos inferiores para las células de origen medular. Esto es debido, sobre todo, a la necesidad de incubación de las muestras de tejido adiposo durante una hora con colagenasa, paso que no se requiere para el aislamiento de las BM-MSCs.

La digestión enzimática del tejido adiposo con colagenasa representa un paso crítico en el aislamiento de esta población celular. Hay que tener muy en cuenta el tiempo de digestión y la actividad enzimática ya que pueden repercutir significativamente sobre el rendimiento celular, la viabilidad, el fenotipo, y la potencial diferenciación <sup>(39)</sup>. En este estudio hemos homogeneizado tanto los tiempos de incubación con colagenasa como el preparado de la enzima que ha sido el mismo para todas las muestras de tejido adiposo, para evitar las posibles variaciones debidas a estos factores.

Otro aspecto a considerar durante el proceso de digestión enzimática de las MSCs de origen adiposo es el aumento del riesgo de contaminación. El desafío consiste en aislar el máximo número posible de células progenitoras sin dañarlas en el proceso <sup>(39)</sup>. Durante la realización del presente estudio se ha observado ausencia de contaminación de las células mesenquimales de origen adiposo y se han registrado altas tasas de proliferación celular lo que sugiere que el protocolo de extracción y aislamiento de dicha población celular es adecuado.

En el caso de las MSCs de origen medular, aunque los tiempos de aislamiento fueron inferiores y los procedimientos menos laboriosos, sí hubo contaminación de dos de los viales congelados, cuyo origen podría estar o bien en el proceso de extracción de las muestras en el animalario o en alguno de los pasos intermedios de aislamiento celular. Sin embargo sería necesario ampliar el número de muestras tanto de tejido adiposo como de la médula ósea para verificar esta mayor susceptibilidad a la contaminación.

En lo que referente al *rendimiento del tejido extraído* y, como aparece reflejado en diferentes publicaciones, es fácil obtener una gran cantidad de MSCs de origen adiposo como una población de partida para su uso posterior <sup>(1, 7, 25, 28)</sup>, de tal forma que algunos autores <sup>(11)</sup> estiman que el rendimiento del tejido graso es unas 10-100 veces superior al de la médula ósea.

Según los resultados de nuestro estudio y, a pesar de que las muestras iniciales obtenidas del tejido adiposo fueron mayores en comparación con las de la médula ósea, el número de células por gramo de tejido extraído ha sido mayor para esta última. Sin embargo, en cultivos posteriores al aislamiento celular, se ha registrado un importante descenso del número de células adheridas procedentes de la médula ósea en comparación con las de origen adiposo. Esto podría deberse a una menor pureza de las MSCs medulares debido a la presencia de células hematopoyéticas que se hayan incluido en el recuento inicial, pero posteriormente al carecer de la capacidad de adhesión se hayan ido desechando a lo largo de los pasajes o cambios de medio realizados tras el aislamiento.

El ensayo de Alamar Blue® se ha utilizado ampliamente en la valoración de la *viabilidad*

de diferentes líneas celulares ya que la adición de este colorante no altera la capacidad de proliferación de los cultivos <sup>(43)</sup>. En este estudio se ha determinado la viabilidad celular tanto de forma cualitativa por medio de las tinciones de actina y Hoechst como de forma cuantitativa determinado la intensidad de fluorescencia emitida por las células en el ensayo de Alamar Blue®. De acuerdo con otros autores <sup>(43)</sup>, hemos observado que las células mesenquimales cultivadas preservaron su actividad metabólica a los cuatro días de cultivo.

La obtención de las MSCs de distinto origen como la médula ósea, el tejido adiposo, sinovial, el periostio o el músculo pone de manifiesto que el *potencial proliferativo* de las MSCs derivadas de tejidos sólidos es mucho mayor que en el caso de las procedentes de médula ósea <sup>(11, 12, 29)</sup>. Esta observación se pone de manifiesto en numerosos estudios que, al comparar la capacidad de proliferación de las MSCs de la médula ósea y del tejido adiposo, llegan a la conclusión de que las células mesenquimales procedentes de la primera presentan un significativamente menor potencial de proliferación <sup>(12, 29, 39)</sup> y le otorgan una clara ventaja en este sentido a las MSCs de tejido graso ya sea por las propiedades intrínsecas de estas células o como resultado de la mayor densidad de las mismas dentro de la población inicial<sup>(39)</sup>.

Además las MSCs medulares rara vez se adhieren y proliferan bien en condiciones estudiadas lo que puede explicarse por el bajo número de MSCs presentes en la médula ósea (1 de cada 10<sup>6</sup> células medulares nucleadas) y el gran número de células hematopoyéticas<sup>(25,29)</sup>.

En nuestro estudio, no se ha podido realizar la siembra de las BM-MSCs debido a la escasa cantidad de las mismas observada en los cultivos, lo que, en este caso, le otorga un mayor potencial de proliferación a las ASCs.

Aunque existe un consenso sobre el medio ideal para el cultivo de las MSCs, fundamentalmente el DMEM o el MEM, y así lo reflejan diferentes estudios en los que se usa indistintamente uno u otro <sup>(14, 40)</sup>. Hemos querido comprobar la adecuación de un medio sobre el otro tanto en las células mesenquimales de origen medular como en las de tejido adiposo, ya que la elección del medio de cultivo tiene un impacto importante en el crecimiento y la diferenciación celular <sup>(40)</sup>.



Igualmente en la literatura se considera la adición al medio de cultivo de suero fetal bovino (FBS) a distintas concentraciones que oscilan entre un 10-20%. Como las concentraciones séricas pueden afectar de forma directa a la proliferación celular <sup>(40)</sup> en este estudio los suplementos para ambos medios (MEM y DMEM) han sido los mismos contando con la presencia de un 10% de FBS.

Así los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias en lo que se refiere al potencial de proliferación de las células mesenquimales en un medio u otro, sin embargo por razones económicas nos decantamos por el DMEM.

Por otro lado las MSCs no son células inmortales <sup>(1)</sup> y el interés de determinar la presencia de *signos de senescencia celular* reside en que éstos preceden a la transformación maligna en la mayoría de los cultivos <sup>(11, 14, 42)</sup>.

Los signos de senescencia incluyen tanto los aspectos morfológicos de las MSCs como alteraciones en el ritmo de crecimiento celular <sup>(8)</sup>.

En la literatura científica se reporta que las MSCs presentan una morfología tipo fibroblasto y que esta morfología se mantiene constante a lo largo de varias semanas de cultivo y pasajes <sup>(8)</sup>. En algunas publicaciones se indican como intervalos habituales de expansión las primeras 8-10 semanas, y en las condiciones de cultivo habitual (fase presenescente) <sup>(16)</sup>. Durante este tiempo las células obtenidas son indistinguibles, en todos los parámetros estudiados, de las células de partida obtenidas de la muestra inicial <sup>(16)</sup>.

Sin embargo, en el estudio de Estrada et al <sup>(11)</sup> las MSCs adiposas, una vez en cultivos, se presentaron como una población homogénea de células elongadas, fusiformes, granulares y con digitaciones manteniendo su morfología por periodos de tiempo inferiores, de aproximadamente un mes.

Esto coincide con los resultados de nuestro estudio, las MSCs de origen adiposo se cultivaron durante 7 pases (un mes) sin presentar signos de senescencia y después se mantuvieron durante una semana más (2 pasajes) para ver una mayor evolución.

En el caso de las MSCs de origen medular sólo se llevaron a cabo 2 pasajes y tres cambios de medio debido al escaso crecimiento celular y a la contaminación.

Aproximadamente a los 15 días de seguimiento los signos de senescencia se hicieron evidentes. Estas alteraciones morfológicas más tempranas que en el caso de las MSCs de origen adiposo se podría achacar a una pobre densidad celular que, según algunos estudios <sup>(14)</sup> favorece la aparición de morfologías celulares atípicas.

Otro aspecto a considerar como signo de senescencia es el descenso del ritmo de crecimiento celular <sup>(14)</sup>. Las MSCs son células adherentes que se caracterizan por inhibición del crecimiento en la confluencia. La secuencia de pasajes puede afectar la calidad de las MSCs. De hecho, después 3 semanas de cultivo el ritmo de crecimiento se desacelera <sup>(14)</sup>.

En nuestro estudio se ha observado un claro descenso de crecimiento de las MSCs de origen adiposo en el pase nº7. En el caso de las MSCs procedentes de la médula ósea el ritmo de crecimiento ha sido lento desde el primer pasaje, motivo por el que no se ha llevado a cabo un mayor número de ellos.

## VI. CONCLUSIONES

1. Los tiempos de extracción han sido menores para las muestras de tejido adiposo, sin embargo el proceso aislamiento de las ASCs supuso demoras considerablemente mayores en comparación con BM-MSCs.
2. Se ha registrado un mayor rendimiento tisular para las muestras de médula ósea, sin embargo los pobres crecimientos celulares llevados a cabo posteriormente sugieren una menor pureza celular inicial.
3. Los ensayos y tinciones llevadas a cabo con el fin de determinar la viabilidad celular muestran células metabólicamente activas y con una morfología característica propia de las MSCs.
4. Las tasas de proliferación sólo se han podido determinar en las ASCs y no se ha visto diferencias en la proliferación celular dependiente del medio de cultivo MEM o DMEM.
5. Se ha observado un mayor número de pasajes necesarios para apreciar signos de senescencia en las células mesenquimales de tejido adiposo.
6. Podemos considerar que el protocolo propuesto de extracción, aislamiento y cultivo ha sido efectivo para las células mesenquimales de origen adiposo, no así para las procedentes de la médula ósea.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomater* 2006;27:6052-63
2. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Invest Clin* 2006;58(5):498-511
3. De Haro J, Zurita M, Vaquero J. Estudio gammagráfico de la distribución de células del estroma de la médula ósea tras su administración intravenosa o intralesional en un modelo experimental de paraplejía traumática. *Mapfre Medicina* 2007;18(2):91-7
4. Maria OM, Khosravi R, Mezey E, Tran SD. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Dis* 2007;13:11-6.
5. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Bergera F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004;295:395-406
6. Lodi D, Lannitti T, Palmieri B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res* 2011, 30:9 <http://www.jeccr.com/content/30/1/9>
7. Witkowska-Zimny M, Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett* 2011;16:236-57
8. Estrada R, Venegas P. Comparación de diferentes protocolos para el cultivo de células madre mesenquimales de origen adiposo. *Rev Costarric Cienc Med* 2007;(1 y 2):21-8
9. Oswal S, Ravindra S, Sanivarapu S. Stem cells in periodontics: A futuristic reality. *J Stomat Occ Med* 2011;4:95-104
10. Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011;4(20) <http://www.fibrogenesis.com/content/4/1/20>
11. García Olmo D, García Arranz M. Células progenitoras multipotentes obtenidas del tejido adiposo y su aplicación clínica. 2009:197-221
12. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007;327:449-62
13. Liu Y, Wang L, Fatahi R, Kronenberg M, Kalajzic I, Rowe D, Li Y, Maye P. Isolation of murine bone marrow derived mesenchymal stem cells using Twist2 Cre transgenic mice. *Bone* 2010;47:916-25
14. Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Int J Transfus Med* 2010;98:93-107
15. Spitkovsky D, Hescheler J. Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic

applications. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2008;17(2):79-90

16. Bernad A, García S, Rubio D, Paz MF, García-Castro J. Bioseguridad y uso de células madre mesenquimales. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2008;30(1):39-44
17. Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, Xu T, Le A, Shi S. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 2009;27:1421-32
18. Mao F, Xu WR, Qian H, Zhu W, Yan YM, Shao QX, Xu HX. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells in collagen-induced mouse arthritis. *Inflamm Res* 2010;59:219-25
19. Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. *J Virol* 2009;83(11):5918-27
20. Tyndall A, Pistoia V. Mesenchymal stem cells combat sepsis. *Nat Med* 2009;15(1):18-20
21. Yamaza T, Ren G, Akiyama K, Chen C, Shi Y, Shi S. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2011;90(3):317-24
22. Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjoui Z, Jahromi BM, Akrami M, Rohani L, Monabati A, Noorafshan A, Omrani GR. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;93:228-34
23. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevasis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and Natural Killer cells. *Stem Cells* 2006;24:74-85
24. Youd M, Blickarz C, Woodworth L, Touzjian T, Edling A, Tedstone J, Ruzek M, Tubo R, Kaplan J, Lodie T. Allogeneic mesenchymal stem cells do not protect NZB X NZW F1 mice from developing lupus disease. *Clin Exp Immunol* 2010;161:176-86
25. Sung JH, Yang HM, Park JB, Choi GS, Joh JW, Kwon CH, Chun JM, Lee SK, Kim SJ. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2008;40(8):2649-54
26. Wright NA, Otto WR. Mesenchymal stem cells: plasticity of differentiation. *Exp Dermatol* 2008;17:873-95
27. Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, Okochi H, Asashima M. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400:461-65
28. Wu L, Wu Y, Lin Y, Jing W, Nie X, Qiao J, Liu L, Tang W, Tian W. Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix. *Mol Cell Biochem* 2007;301:83-92
29. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 2008;82:238-47
30. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-

renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007;9:204

31. Handschel J, Meyer U. Infection, vascularization, remodelling - are stem cells the answers for bone diseases of the jaws? *Head Face Med* 2011;7(5) <http://www.head-face-med.com/content/7/1/5>
32. Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, Chen C, Chen W, Wang S, D Le A, Shi S. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *JBMR* 2010;25(7):1668-79
33. Dégano IR, Vilalta M, Bagó JR, Matthies AM, Hubbell JA, Dimitrioud H, Biancoe P, Rubioa N, Blanco J. Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomater* 2008;29:427-37
34. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 2003;4:92-6
35. Chung HJ, Jung JS, Park TG. Fabrication of adipose-derived mesenchymal stem cell aggregates using biodegradable porous microspheres for injectable adipose tissue regeneration. *J Biomater Sci* 2011;22:107-22
36. Tsai KS, Yang SH, Lei YP, Tsai CC, Chen HW, Hsu CY, Chen LL, Wang HW, Miller SA, Chiou SH, Hung M, Hung SC. Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice. *Gastroenterol* 2011;141:1046-56
37. Da Silva Mierelles L, Beyer Nardi N. Murine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Hematol* 2003;123:702-11
38. Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S, Yamada T, Nakata S, Ohkuma M, Miyachi EI, Marunouchi T, Matsunaga K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J Dermatol Sci* 2007;48:43-52
39. Madonna R, Geng YJ, De Caterina R. Adipose Tissue-Derived Stem Cells : Characterization and Potential for Cardiovascular Repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1723-9
40. Tapp H, Hanley EN, Patt JC, Gruber HE. Adipose-Derived Stem Cells: Characterization and Current Application in Orthopaedic Tissue Repair. *Exp Biol Med* 2009 234:1-9.
41. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101-9
42. Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A. Long-term Cultures of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Frequently Undergo Spontaneous Malignant Transformation. *Cancer Res* 2009;69:5331-9.
43. Nasiry A, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reprod* 2007;22(5):1304-9