
Células Mesenquimales Estromales

MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Dr. Antonio A. Carrasco Yalan^{1,2}, Dr. Hugo N. Ríos Díaz^{1,3}, Dr. Jorge F. Castillo Aguirre^{1,3,4}

RESUMEN

Las células mesenquimales estromales (MSC, por sus siglas en inglés) son una población celular que ha sido adecuadamente caracterizada biológicamente en años recientes. Es una población celular con propiedades especiales en el medio de cultivos y con una específica expresión de marcadores celulares en estudios de citometría de flujo. Su presencia en médula ósea es muy baja y desde el punto de vista ultraestructural presenta vimentina, la cual interviene mucho en las modificaciones morfológicas de estas células en cultivos. Adicionalmente las MSC tienen en su membrana citoplasmática una amplia variedad de receptores de citocinas que hace suponer la diversidad de subpoblaciones dentro de las MSC. Hay muchas fuentes de MSC donde destaca la médula ósea, células progenitoras fetales (amnios, sangre de cordón umbilical, placenta y otros), y tejido graso. Al parecer la expresión de genes de pluripotencialidad en células progenitoras fetales hace que las MSC de sangre de cordón umbilical tengan mayor capacidad de replicación in Vitro. Las propiedades paracrino e inmunomoduladora de las MSC han sido ampliamente estudiadas en modelos experimentales; que han permitido explorar la utilidad clínica de las MSC en estudios de fase I a III en una variedad de enfermedades donde destaca la enfermedad injerto contra huésped e infarto de miocardio. La potencialidad clínica de MSC debe ser adecuada y metodológicamente estudiada en ensayos clínicos.

SUMMARY

Mesenchymal stromal cells (MSC) are a population cell that had been recently biologically characterized. It is a population cell with special properties in culture media and with a specific cell markers expression by flow cytometry. Its presences on bone marrow is pretty low and from the ultrastructural point of view present vimentin, which interacts on cells morphological modifications on cultures. MSC presents a chemokines receptor repertoire on their membrane cells that

make feasible subpopulations diversity among MSC. There are many MSC source as: bone marrow, fetal stem cells (amniotic membrane, umbilical cord blood, placenta and others), and adipose tissue. It looks that the pluripotential genes expression on fetal stem cell makes that umbilical cord blood MSC had a mayor proliferation capacity in vitro. The paracrine and immunomodulatory MSC capacities had been extensively studied on experimental models; those had led to explore the MS utility on the clinic by means of phase I to III triáis on a variety of diseases as: graft versus host disease and myocardial infarction. The clinical potency of MSC must be accuracy and methodologically studied on clinical trials.

Por mucho tiempo descritas como células del estroma en diferentes tejidos, las células mesenquimales estromales (MSC, por sus siglas en inglés) son en la actualidad una subpoblación celular que ha sido biológicamente identificado y cuyo potencialidad en la práctica clínica va en aumento.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

Referidas inicialmente como células del estroma, conformada por una población mixta de fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y macrófagos; además de presentar coloración FAL +, Sudan +, Esterasa +. Fueron en algunas ocasiones denominadas como MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cells) y células MIAMI (Marrow Isolated Adult Multilineage Inducible Cells).

No fue hasta el 2005 que fueron adecuadamente denominadas Multipotent Mesenchymal Stromal Cells y caracterizadas por un consenso del ISCT¹, mostrando que era una población celular muy escasa y que en los cultivos, muestran gran de expansión in Vitro y capacidad de adherencia en el cultivo. La colonias de MSC in vitro son denominadas CFU-Fibroblast like cells, virtud a la forma fusiforme que presentan (figura 1). Las CFU-Fibroblast like cells, disminuyen con edad, tóxi-

1 Instituto de Criopreservación y Terapia celular, Lima Perú.

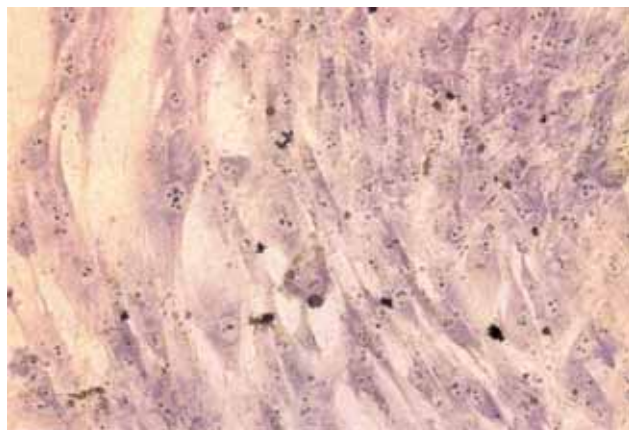
2 Departamento de Hematología Clínica del Hospital Militar Central, Lima, Lima Perú.

3 Profesor del Capítulo de Hematología, Facultad de Medicina de la Universidad de San Martín de Porres, Lima Perú.

4 Profesor de Hematología y Oficina de Postgrado de la Universidad de San Martín de Porres, Lima Perú.

cos (QT - RT) y virus; presentando además una capacidad de expansión muy alta (de 230 veces en 28 días de cultivo hasta 6966 veces en 58 días de cultivo).²

Fig 1. CFU fibroblast-like. Colonias obtenidas post cultivo al 5 día



Muchos investigadores han concertado y establecido los marcadores de diferenciación de las MSC por técnicas de citometría de flujo ³⁻⁵ (tabla 1) y establecieron que toda MSC debe tener al menos diferenciación a tres tipos de tejidos: graso, óseo y cartilaginoso ⁶ (figura 2).

Tabla N° 1. CD (cluster of differentiation) de MSC

Marcadores Positivos Esenciales:
<ul style="list-style-type: none"> ICAM-1 (CD 90), SH2 (CD 105), SH3 & 4 (CD 73), CD 45 intermedio
Otros marcadores positivos menos utilizados:
<ul style="list-style-type: none"> ALCAM (CD 166), VCAM (CD 106), CD271, CD10, CD49A, CD146, D7-FIB, Stro-1, CD 29
Marcadores Negativos:
<ul style="list-style-type: none"> CD 14, CD 1 lb, CD 79 a, CD 19, CD 133, CD 34

Nuestro grupo ⁷ en cooperación con la Universidad de Stanford realizó el estudio de 25 muestras de médula ósea con el panel de MSC definido como: CD45+/- CD34- CD79- CD90+ CD105+; obteniendo como resultado que el 0.20% (DE 0.08%) de las células nucleadas totales tenían fenotipo de MSC.

La ultraestructura de MSC ha sido adecuadamente definida y se observa que son positivas para vimentina. Precisamente esta proteína intracelular las que dan la forma características de MSC y de los cambios que se pueden inducir en su forma al ser modificado a otros tipos de tejidos ⁸, inclusive alguna otras proteínas intracitoplasmáticas pueden aparecer (figura 3).

Fig. 2. A: MSC indiferenciadas, B: diferenciación osteogénica (coloración von Kossa), C: adipogénica (coloración rojo de congo), D-E: Diferenciación condrogénica (coloración Safranina O y colágeno tipo II)

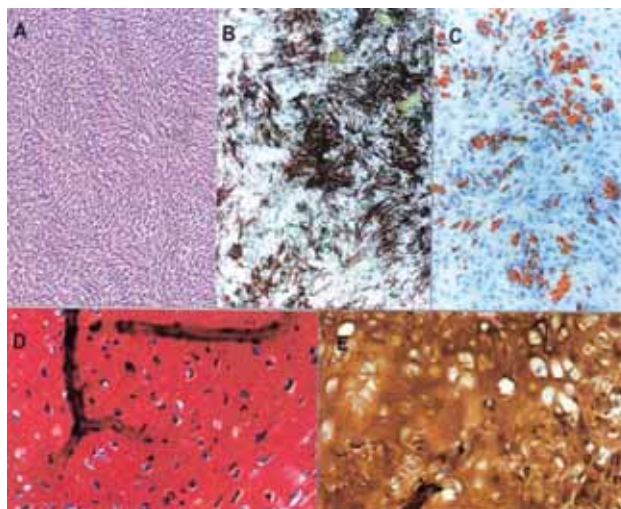
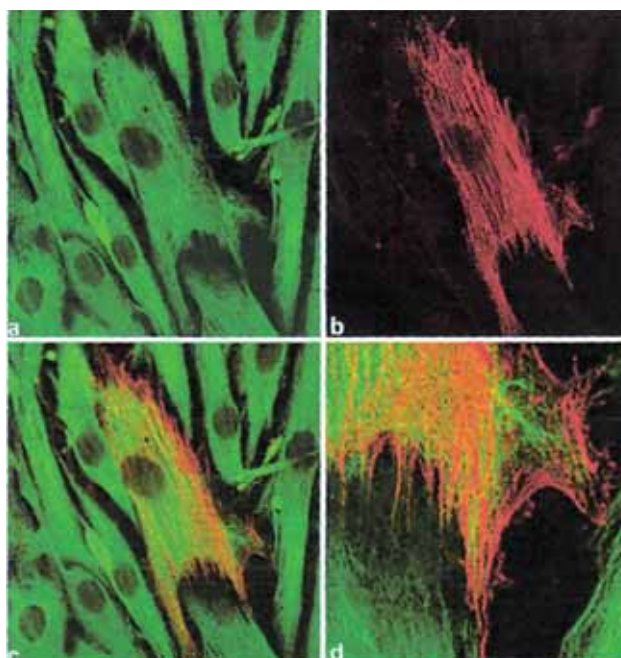


Fig. 3. a: Vimentina, b: Actina, c: Vimentina+Actina, d: amplificación de c.



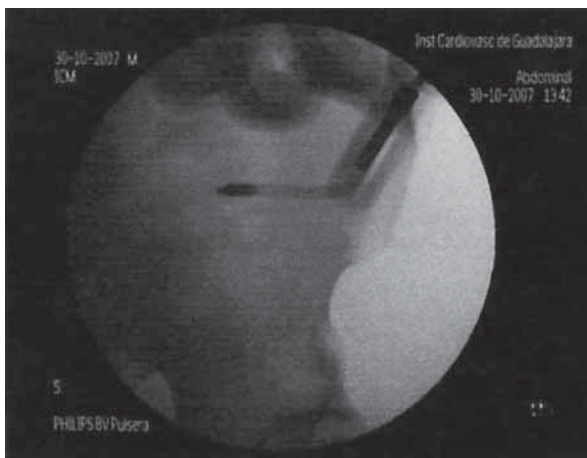
Adicionalmente las MSC presentan una amplia variedad de receptores en la membrana citoplasmática de la familia de CCR, CXC, CCL y CXCR, todas ellas receptoras de citoquinas que modifican su respuesta. Esta variedad de receptores hace suponer que MSC son un grupo heterogéneo de células y que estas responden distinto a diferentes factores, al menos en relación a su velocidad de crecimiento, donde algunos crecen rápido y otros más lento.⁹

FUENTES DE MSC

Han sido descritos diferentes tejidos (conocidos como fuentes) de donde se pueden obtener MSC, destacando entre ellas la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo.

Por mucho tiempo el uso de MSC de médula ósea ha sido la fuente con mayor utilización, para ello se debe realizar un aspirado de médula ósea y luego hacer una selección celular con cultivos subsecuentes. Diversas metodologías han sido utilizadas con la finalidad de obtener mayor cantidad de MSC, entre ellas aspiradas repetitivas, bilaterales y otras técnicas más. Recientemente nuestro grupo ⁷ logro mediante el uso del MarrowMiner se puede obtener hasta 6.28 veces mayor concentración de MSC de médula ósea versus el aspirado estándar (figura 4).

Fig. 4. Aspirado de médula ósea con MarrowMiner



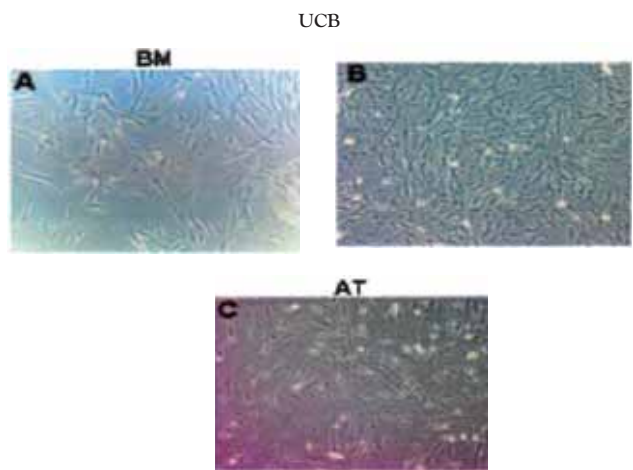
El tejido adiposo es una fuente interesante a evaluar puesto que puede ser obtenida por litros y con ello obtener una cantidad suficiente de MSC. Inclusive ya existen en el mercado un sistema automatizado Celution® 800/CRS de la empresa Cytori, que pueden concentrar las células no hematopoyéticas (entre ellas MSC) del total del lipoaspirado.

Sin embargo las propiedades entre éstas 3 varían mucho en relación a la de capacidad de replicación in vitro y la manera de obtención. Para obtener progenitoras de médula ósea (MO) y tejido adiposo (TA) se requieren procedimientos invasivos de aspiración en sala de operaciones y de analgesia; además estos tejidos multipotenciales adultos pueden acarrear modificaciones cromosómicas virtud al envejecimiento, infecciones virales y tóxicos diversos.

La sangre de cordón umbilical (SCU) es una fuente muy interesante a evaluar puesto que la obtención es incruenta,

generalmente es considerado como un tejido de desecho y es una fuente de células progenitoras que no ha sido expuesto al envejecimiento ni eventos tóxicos. Kern y colaboradores ¹⁰ mostraron que MSC de SCU replican de una manera más prolongada (sucesivos pasajes) y en mayor cantidad en relación a MO y TA (figura 5). Este grupo de investigadores observaron que las MSC obtenidas de SCU mostraron que tienen una pobre diferenciación hacia células grasas y estos es probablemente a una caracterización de la edad ontogénica de este tejido.

Fig. 5. MSC obtenidas de A: BM (médula ósea), B: UCB (sangre de cordón umbilical) y C: AT (tejido adiposo). Se puede observar que el cultivo de sangre de cordón umbilical tiene mayor capacidad de replicación.



Además de la ya descrita SCU; otras fuentes de MSC son en general las stem cell fetales ¹¹ que involucran a otros tejidos como:

- **Líquido Amniótico:**
 - Población heterogénea.
 - MSC con genes de stem cell embrionarias (pluripotenciales): Oct4, Nanog, SSEA-4
- **Gelatina de Wharton:**
 - Se han aislado células estromales.
 - Expresan genes de stem cell embrionarias (pluripotenciales): Oct4, Sox-2, Nanog
- **Membrana amniótica (Amnios):**
 - Se han aislado stem cell epiteliales y MSC.
 - Stem cell epiteliales y MSC exhiben contacto y un efecto inmunomodulatorio.
- **Placenta:**

Diversas poblaciones celulares se han identificado.

Expresan genes de stem cell embrionarias (pluripotenciales): SSEA4, Oct4, Stro-1, Tra 181

Diferenciación en diversos tejidos

Lo destacable de las stem cell fetales es que cuentan con una serie de genes (Oct4, Sox-2, Nanog, Stro-a) que les da una propiedad peculiar, cual es el de ser fácilmente inducibles a células pluripotenciales (conocidas como iPS) y que muestran marcada y mayor capacidad de replicación y diferenciación a otros tejidos.

APLICACIONES CLÍNICAS

Las funciones de las MSC son diversas destacando dos principalmente:

- Efecto paracrino o trófico: liberando una serie de sustancia y citocinas a células vecinas.
- Efecto inmunomodulador con disminución de la respuesta inmune aguda e induciendo a la tolerancia inmunológica mediante la disminución de la respuesta Th1: \downarrow IFN- γ , \downarrow TNF- α y \downarrow IL-12; e incremento de la respuesta Th2: \uparrow IL-4, \uparrow Treg y \uparrow IL-10.^{1,4}

Estas propiedades han sido extensamente utilizadas en modelos pre clínicos y estudios fase I al III¹ incluyendo: osteogénesis imperfecta (OI), reparación ósea en osteoartritis, enfermedades autoinmunes, entre ellas lupus eritematoso sistémico, aplasia medular, medicina fetal para con OI en tercer trimestre, vehículo para terapia génica.

En los últimos años laboratorios internacionales y estandarizados han originado líneas celulares de MSC, entre ellas OSIRIS que tiene un producto en estudio que están en fase II-III principalmente en: enfermedad injerto contra huésped, en la que han dado resultados muy prometedores en algunas formas agresivas, en Infarto miocardio (OSIRIS - Prochymal™, Joshua Haré, University of Miami), en enfermedad pulmonar obstructiva crónica, con el uso de Prochymal™ de OSIRIS; estudio fase IIb, en enfermedad de Crohn (OSIRIS - Prochymal™)

Algunas aplicaciones clínicas novedosas de MSC presentadas en la Conferencia Internacional de MSC y stem cell no hematopoyéticas en Noviembre 2009 incluyen:

- Utilización de MSC allogénicas en la Injuria Renal Aguda en cirugía cardíaca con circulación extracorpórea. Los investigadores de la Universidad de Uta, Salt Lake-USA observaron que en las 72 horas post cirugía el mecanismo de hipoxemia en la neurona induce el incremento de SDF-1 (Factor Derivado del Estroma). Los cambios morfológicos observados incluyen apoptosis, inflamación, coagulación y otras. Las MSC han mostrado ser fijadas en los tejidos por acción de las SDF-1; es así que en los estudios clínicos realizados, las MSC son inyectadas en la

aorta descendente previa a la emergencia de las arterias renales produciendo mecanismos anti-inflamatorios, anti-apoptóticos, angiogénicos y mitogénicos; que llevan a una mejor performance renal.

- Utilización de MSC autólogo en la reparación ósea en la rodilla. Esta experiencia reciente de la Universidad de Tokio-Japón, mostró que la expansión de MSC de sinovia autóloga puede ser utilizada en un segundo momento para la reparación condral del fémur distal mediante cirugía endoscópica y evitando el uso de prótesis y cirugías complicadas.
- Uso de MSC en modelos experimentales en sepsis. Es conocido que la reacción inflamatoria en sepsis puede ser de tal magnitud que origina deficiencias en diferentes órganos y sistemas. La acción de LPS (que actúan en el receptor TLR4) liberado por bacterias y del TNF (que actúan en el receptor TNFR1) liberado por macrófagos inducen a las MSC a la liberación de PGE2 el cual actúa en el receptor E4 y E2 del macrófago disminuyendo su actividad, que incluye disminución de liberación de TNF e IL-6 y aumento de IL-10.^{12, 13}

PERSPECTIVAS

Es conocido que la aplicación de stem cells embrionarias pueden inducir teratomas en modelos animales y que ha sido éste uno de los principales dilemas del uso de células tan primitivas en estudios clínicos. Las MSC no están exentas de una potencial (aunque mínima) formación de tejidos atípicos como CAF (Carcinoma Asociada a Fibroblastos); por lo que será de gran importancia la observación a largo plazo de pacientes sometidos a procedimientos de terapia regenerativa, además de excluir aquellos que ya tienen diagnóstico de tumor benigno o maligno.¹⁴

Será oportuno también hacernos la pregunta inversa: ¿No será que las enfermedades autoinmunes se desatan cuando las MSC no cumplen su función? Esta es una observación realizada por investigadores españoles¹⁵ quienes descubrieron que las MSC de pacientes con púrpura trombocitopénica inmune inhiben de manera menos eficaz la proliferación de linfocitos T en comparación con controles sanos. Sin duda será un área de exploración intensa.

Finalmente, toda técnica terapéutica requiere una evaluación pre-clínica y clínica meticulosa y científica. No se puede cortar etapas en este proceso y se basará en el adecuado conocimiento de la biología y manipulación de las MSC. MSC tienen un gran potencial en medicina, no todas las MSC son iguales, se requerirá laboratorios especializados

en el manejo de MSC, no todos los pacientes responderán igual, se requerirá información de seguridad a largo plazo y el manejo con grupos cooperativos internacionales y protocolos laboratorio/clínicos estandarizados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Horwitz EM et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7(5): 393-395.
2. Clarke E & McCann SR. Age dependent in vitro stromal growth, *Bone Marrow Transplant*. 1989 Sep; 4(5): 596-597.
3. Kern et al. Comparativo Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical. *Stem Cells* 2006; 24:1294-1301.
4. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy* 2006; 8(6): 559-561.
5. Chamberlain et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* 2007; 25:2739-2749.
6. Barry et al. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36: 568-84
7. Kraft D, Carrasco-Yalán A, et al. The MarrowMiner, A Novel, Minimally Invasive Device for the Harvest of Bone Marrow: Results from the MARVELOUS Trial Demonstrate Safety, Efficacy and Improved Stem Cell Yields Compared to Standard Marrow Harvest Method. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2009, Abstract 41, pag18, 15(2): Suppl 2.
8. Ho et al., REVIEW: Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 2008; 10(4): 320-330.
9. Tormin A et al. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets. *Cytotherapy* 2009; 11 (2): 114-128.
10. Kern S et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-1301.
11. Pappa K et al. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on developmental continuum?. *Regenerative Medicine* 2009; 4(3), 423-433.
12. Krisztian Nemeth et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine* 2009; 15(1): 42-49.
13. Tyndall A et al. Mesenchymal stem cells combat sepsis. *Nature Medicine* 2009; 15(1): 18-20.
14. Kidd S et al. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy* 2008; 10(7): 657-667.
15. Pérez-Simón et al. Mesenchymal stem cells are functionally abnormal in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Cytotherapy* 2009; 11(6): 698-705