

# Obtención de células madre mesenquimales y participación de estas en la modulación de la respuesta inmune

## Isolation of mesenchymal stem cells and their participation in the modulation of the immune response

Salomé Bustos-Araya<sup>1</sup>, Yeimy Montenegro-Matamoros<sup>2</sup>,  
Christian Swirgsde-Baltodano<sup>3</sup>, Daniela Trigueros-Hernández<sup>4</sup>,  
Rodolfo Vargas-González<sup>5</sup>, Juan José Mora-Román<sup>6</sup>

*Fecha de recepción: 2 de octubre de 2017*

*Fecha de aprobación: 3 de marzo de 2018*

Bustos-Araya, S; Montenegro-Matamoros, Y; Swirgsde-Baltodano, C; Trigueros-Hernández, D; Vargas-González, R; Mora-Román, JJ. Obtención de células madre mesenquimales y participación de estas en la modulación de la respuesta inmune. *Tecnología en Marcha*. Vol. 31-3. Julio-Setiembre 2018. Pág 29-40.

DOI: 10.18845/tm.v31i3.3899



- 1 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Correo electrónico: ana.bustosaraya@ucr.ac.cr.
- 2 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Correo electrónico: yeimy.montenegro@ucr.ac.cr.
- 3 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Correo electrónico: rusoswirgs@hotmail.com.
- 4 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Correo electrónico: grettel.trigueros@ucr.ac.cr.
- 5 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Correo electrónico: rodolfo.vargasgonzalez@ucr.ac.cr.
- 6 Máster en Bioquímica, Departamento de Farmacia Industrial, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. juanjose.moraroman@ucr.ac.cr.

## Palabras clave

Células madre mesenquimales; médula ósea; tejido adiposo; cordón umbilical; inmunomodulación.

## Resumen

Las células madre mesenquimales (CMM) son un tipo de células pluripotentes, en forma de huso, con la capacidad de diferenciarse en condrocitos, osteocitos y adipocitos, entre otros. Estas células pueden ser obtenidas a partir de la médula ósea, el tejido adiposo o la sangre de cordón umbilical, lo que ha permitido estudiar sus propiedades estructurales y funcionales. Aunque la médula ósea ha sido la principal fuente de las CMM, se ha encontrado que existen aspectos que dificultan su uso, entre ellos una limitada tasa de crecimiento, la variación en la capacidad de diferenciación de acuerdo con la edad del donante y el riesgo del procedimiento para la toma de la muestra. Por ello, los estudios en el tejido adiposo y la sangre de cordón umbilical han aumentado, así como también de los métodos actualmente empleados para la extracción de CMM en todas las fuentes. En la actualidad, se conoce que estas células presentan una gran capacidad inmunomoduladora, por lo que ha generado diversos estudios preclínicos y clínicos para su posible uso como tratamiento en personas con enfermedades autoinmunes y la enfermedad de injerto contra huésped en pacientes trasplantados.

## Keywords

Mesenchymal stem cells; bone marrow; adipose tissue; umbilical cord; immunomodulation.

## Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) are a type of spindle-shaped pluripotent cells with the ability to differentiate into chondrocytes, osteocytes, and adipocytes, among others. These cells can be obtained from bone marrow, adipose tissue or umbilical cord blood; this fact has allowed to study its structural and functional properties. Although bone marrow has been the main source of MSC, it has been found that there are aspects that hinder its use, including a limited growth rate, variation in the capacity to differentiate according to the bone marrow donor's age, and risk in the sampling procedure. Therefore, studies in adipose tissue and umbilical cord blood have increased, as well as in methods currently used for the extraction of MSC from all sources. Currently, these cells are known to have a high immunomodulatory capacity; for that reason, this has generated several preclinical and clinical studies for their possible use as treatment in people with autoimmune diseases and graft-versus-host disease in transplant patients.

## Introducción

Las células madre mesenquimales (CMM) son un tipo de células pluripotentes en forma de huso, con la capacidad de diferenciarse en condrocitos, osteocitos, adipocitos, entre otros. Estas células pueden ser obtenidas a partir de la médula ósea, el tejido adiposo o la sangre de cordón umbilical (CU), lo que ha permitido estudiar sus propiedades estructurales y funcionales [1].

Aunque en un principio, su principal medio de obtención era la médula ósea, hoy se obtienen preferiblemente de tejido adiposo y del CU. Su aislamiento básicamente se debe a su capacidad para adherirse al plástico. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés) les ha otorgado el nombre de células estromales mesenquimales y

ha impuesto una serie de criterios que estas deben cumplir para ser llamadas de esta forma. Por ejemplo, deben adherirse al plástico mientras son cultivadas y presentar la forma de huso que las caracteriza. Segundo, deben tener un inmunofenotipo específico, caracterizado por la expresión de moléculas en su superficie como CD105, CD73 y CD90, y la no expresión de CD45, CD34, CD14, CD79 alfa, cuyas funciones serán descritas más adelante, y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). Por último, *in vitro* deben diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos [2] [3].

En la actualidad, se sabe que presentan una gran capacidad inmunomoduladora, por lo que su posible uso en terapias de tratamiento para enfermedades autoinmunes y la enfermedad de injerto contra huésped en pacientes trasplantados ha generado diversos estudios preclínicos y clínicos para tratar de entender cuál es la función específica que cumplen en la regulación de la respuesta inmunológica [2].

En algún momento se sugirió que estas células debían ser llamadas señalizadores medicinales, debido a la amplia gama de sustancias con propiedades inmunomoduladoras que ellas secretan. Entre estas están el factor de crecimiento de hepatocitos (HFG, por sus siglas en inglés), la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la interleucina 10 (IL-10), y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1, por sus siglas en inglés) [4].

Esta revisión busca explicar cómo se obtienen estas CMM de los distintos tejidos anteriormente mencionados y los mecanismos implicados en la regulación de la respuesta inmune en los cuales participan.

### Fuentes para la obtención de CMM

La médula ósea ha sido la principal fuente de obtención de las CMM, pero se ha encontrado que el producto presenta una limitada tasa de crecimiento, una variación en la capacidad de diferenciación de acuerdo con la edad del donante y riesgo en el procedimiento para la toma de la muestra. Por ello, han aumentado los estudios en otros tejidos, principalmente el tejido adiposo y la sangre de CU [5] [6].

### Médula ósea

Aunque existen muchas investigaciones sobre métodos para obtener estas células a partir de médula ósea, una de las más recientes fue llevada a cabo por Gudleviciene y colaboradores [7]. Dicho grupo desarrolló un estudio piloto para evaluar dos métodos de extracción de CMM de médula ósea. Lo anterior se debió a que usualmente se requieren volúmenes muy grandes para llevar a cabo dicha extracción [8].

Con el primero, se aspiraron 60 mL de médula ósea, usando 10 tubos de venopunción de 6 mL con heparina de litio y se procesaron mediante centrifugación a través del gradiente de Ficoll (CfFG, por sus siglas en inglés). Se diluyeron (1:1) con medio estándar 1640 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) y se transfirieron a tubos de centrifuga cónicos de 50 mL en gradiente de Ficoll (proporción 1:3 de Ficoll y de médula ósea). La centrifugación se realizó durante 20 min a 300 g. Posteriormente, se recogieron las células mononucleares en un anillo blanquecino y se transfirieron nuevamente a tubos de centrifugación cónicos de 50 mL; se lavaron dos veces con 20 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) que contenía 10 % de suero fetal bovino (SFB). Se contaron las células mononucleares con la cámara de recuento Bürker y se colocaron en matraces ventilados de 175 cm<sup>2</sup> a una densidad de células redondas de 100 x 10<sup>6</sup>/matraz. Las células se cultivaron en la incubadora durante 24 horas en medio DMEM que contenía 10 % de SFB, bajo condiciones estándar de 5 % de CO<sub>2</sub> y 37 °C [7].

Con el segundo método, se extrajeron 6 mL de médula ósea (un tubo de venopunción de 6 mL). Estos se transfirieron a un tubo de centrifugación cónico de 50 mL y se añadió amortiguador

de lisis de eritrocitos (RBC, por sus siglas en inglés), en la proporción 1:5. El tubo se mezcló manualmente durante 1 minuto y se centrifugó inmediatamente por 5 min a 480 g. Posteriormente, se desechó la capa superior y se resuspendió el sedimento con 5 mL de medio RPMI 1640 y se lavó dos veces usando centrifugación bajo las mismas condiciones. Finalmente, el volumen total de *pellets* se resuspendió y se transfirió al matraz ventilado de 175 cm<sup>2</sup>. Se cultivó en la incubadora durante 24 horas en medio DMEM que contenía 10 % de SFB, bajo condiciones estándar de 5 % de CO<sub>2</sub> y 37 °C [7].

En ambos métodos, después de 24 horas se retiró el medio y las células se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Se utilizó medio para células madre basal (humano), que contenía 10 % de SFB especial para CMM humanas para el subsecuente cultivo. El medio se cambió cada 3 a 4 días. Cuando las células adherentes alcanzaron confluencia, se trataron con tripsina-AEDT (ácido etilendiaminotetraacético), se lavaron dos veces con PBS, se contaron y se distribuyeron en matraces nuevos de 175 cm<sup>2</sup> a una densidad de 2 x 10<sup>6</sup>/frasco. Luego, se incubaron en las mismas condiciones (5 % de CO<sub>2</sub> y 37 °C) (pasaje 0 o P0). En este estudio el proceso de tripsinización se repitió dos veces, una vez para la formación de la segunda monocapa (pasaje 1) y otra para la tercera (pasaje 2). Las CMM de los ocho donantes se expandieron hasta la tercera monocapa. Después, se calculó el número total de células, y se recogieron para el análisis por citometría de flujo [7].

El cálculo del número CMM se determinó usando una cámara de recuento de Bürker en cada pasaje y se expresó en términos de número de células absoluto. El análisis inmunofenotípico de CMM se llevó a cabo utilizando el análisis de identificación basado en citometría de flujo de seis colores. Las CMM se identificaron usando siete marcadores clave: CD105+ (endoglina, glicoproteína que forma parte del complejo del receptor del TGF-β), CD73+ (5'ectonucleotidasa, relacionada con mecanismos de adhesión celular), CD90+ (antígeno de timocito-1, marcador de precursores mesenquimales tempranos) [9], CD14- (receptor de lipopolisacáridos, que se expresa específicamente en células mielomonocíticas), CD34- (expresada selectivamente en las células madre precursoras de la hematopoyesis), CD45- (antígeno común de leucocitos y proteína constitutiva de todas las células hematopoyéticas) y HLA-DR- (rol fundamental en la respuesta inmune, al presentar los péptidos antigénicos al linfocito T cooperador) [10].

Con ambos métodos, se alcanzaron las posibles dosis terapéuticas en el mismo período: 1,4 x 10<sup>8</sup> células se obtuvieron después de 29 días, por el método CfFG, y 8,7 x 10<sup>7</sup> de CMM después de 27 días, usando lisis de RBC. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos. Con ello, los autores demostraron que con el uso de la lisis de RBC puede aislarse una cantidad eficiente de CMM humanas a partir de pequeños volúmenes (solo 6 mL) de médula ósea en comparación con los volúmenes más grandes normalmente usados (60 mL) y la centrifugación en gradiente de Ficoll [7].

### Tejido adiposo

El tejido adiposo se deriva del mesodermo embrionario, cuya formación se presenta en el segundo trimestre del embarazo. Recientemente se ha demostrado que contiene células madre multipotentes, que pueden diferenciarse hacia linajes específicos tales como el adipogénico, el condrogénico, el osteogénico, el miogénico y el neurogénico [11].

Macroscópicamente se distinguen cinco tipos de tejido adiposo [12]:

1. Médula ósea, que ocupa el espacio no necesario para la hematopoyesis.
2. Grasa parda, que es muy termogénica. Rodea órganos mayores en el recién nacido para luego desaparecer en el adulto.
3. Tejido graso mamario, que provee nutrientes y energía durante la lactancia, y es regulado por hormonas del embarazo.

4. De soporte mecánico, que se encuentra en la grasa orbitaria, en la palma de la mano y en la planta de los pies. No presenta mayores cambios ante la influencia hormonal.
5. Grasa blanca, que provee energía y aislamiento. Es reconocido actualmente como un órgano endocrino que secreta adiponectina, leptina y otras adipocinas con efectos fisiológicos. Es el que presenta mayores cambios en volumen a lo largo de la vida.

Este tejido posee la habilidad de cambiar de volumen durante la vida de un individuo. Los cambios menores son por hipertrofia celular, mientras que los mayores son por hiperplasia y aumento de la vascularización. Estos cambios están mediados por una población de células troncales multipotentes, con propiedades similares a las obtenidas de la médula ósea [13].

Considerando la incidencia de obesidad en la población actual, esta es una fuente abundante y accesible. Además, ha provocado menos controversia en lo relacionado con factores bioéticos. Se ha visto que podría utilizarse como terapia celular regenerativa. Consistiría en una estrategia integral más lógica y eficaz, pues sería capaz de aportar no solo células madre, sino también diversas moléculas activadoras y reguladoras, producidas o inducidas por ellas. Estas tendrían la capacidad para favorecer la diferenciación de las células implantadas y estimular el desarrollo de las células propias del tejido receptor, lo que contribuiría a una regeneración más fisiológica del tejido dañado [14] [15] [16].

La aspiración del tejido adiposo (liposucción-lipoaspiración) es uno de los procedimientos estéticos más realizados en el mundo y, aunque su objetivo original consiste en retirar la grasa no deseada, puede establecerse como la forma ideal de obtener células madre derivadas de grasa (ASC, por sus siglas en inglés) autólogas, para intervenir en la regeneración tisular [12].

Entre las ventajas de emplear este procedimiento se encuentran el ser de acceso sencillo, un procesamiento fácil de realizar; en la mayoría de personas, la posibilidad de extraer varios mililitros de grasa sin perjuicio estético; seguro, menos molesto y agresivo que las punciones medulares (puede realizarse bajo anestesia local), y el hecho que se pueden criopreservar las células [17]. En cuanto a seguridad, según datos de 1994 al año 2000, no se han reportado muertes en 66 570 procedimientos de liposucción y las complicaciones serias se han dado en alrededor de 0,68 por 1000 casos [12].

La lipoaspiración se realiza a nivel del tejido blanco del tronco y extremidades. Sin embargo, hay estudios que demuestran contradicción en la abundancia de células en estos sitios. Las áreas del tronco presentan un 22 % más de ASC que las extremidades [18]. Asimismo, la capacidad proliferativa celular es alta en todos los depósitos grasos de pacientes jóvenes, a diferencia de los de edad avanzada, donde es mayor en las extremidades [19].

Según la bibliografía encontrada, los diversos métodos confluyen en las siguientes etapas generales: Se comienza con una liposucción al paciente bajo anestesia local o sedación, o mediante la toma durante una cirugía de abdominoplastía. A continuación, la muestra es colocada en tubos respectivos, los cuales se rellenan con igual volumen de suero fetal bovino y se somete a centrifugación, con el fin de obtener un tejido adiposo purificado. Posteriormente, se utiliza colagenasa para digerir la matriz extracelular a una temperatura de 37 °C y se vuelve a centrifugar por aproximadamente 10 minutos para descartar el sobrenadante y obtener el botón celular. Luego, se agregan algunas sustancias químicas para eliminar detritos celulares y colagenasa residual. Seguidamente, se determina el número de células viables, las cuales son sembradas en suero fetal bovino, agregando algunos antibióticos, a una temperatura de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se espera a que alcancen una confluencia del 70 % (aproximadamente entre el quinto y séptimo día) para incubarlas con tripsina a 37 °C y disgregarlas. Se centrifugan y se elimina el sobrenadante. Las células tripsinizadas se resuspenden en medio de cultivo para eliminar la tripsina y para su posterior conteo, en ocasiones, en cámara de Neubauer. En este punto, se pueden emplear terapéuticamente o ser criopreservadas para su posterior uso [11] [15] [20] [21].

Con anestesia local se pueden obtener hasta 200 g de tejido. Un gramo de tejido adiposo contiene  $5 \times 10^3$  ASC, aproximadamente 500 veces más que la misma masa de médula ósea [13]. Se ha determinado que existe una concentración de células madre de una muestra de grasa hasta 40 veces mayor que en una de médula ósea, lo que le da ventajas para su aislamiento y manipulación a gran escala [22] [23].

Como complemento, estas células muestran una caracterización muy similar a las derivadas de médula ósea, y son positivas para la expresión de moléculas de adhesión y proteínas de membrana tales como CD29 (integrina  $\beta 1$ ), CD44 (receptor de ácido hialurónico) [24], CD90 (Thy-1: antígeno de timocito-1) [24] [25], enzimas de superficie como CD13 (aminopeptidasa) [26], receptores de factores de crecimiento como CD71 [24], antígenos específicos como CD105 (endoglina) [24] [26], CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) [26] [27] y STRO-1 (antígeno estromal precursor-1) [24] [26], y marcadores específicos de moléculas de adhesión y proteínas de membrana tales como CD34 (marcador de células hematopoyéticas) [28], CD49d (VLA-4), CD106 (VCAM-1) y CD54 (ICAM-1) [24], conocidas por su amplia participación en la interconectividad celular y la respuesta inflamatoria.

No se han observado diferencias significativas entre las células derivadas de médula ósea y de adipocitos con respecto a la adherencia al estroma, el crecimiento, la senescencia celular, la capacidad de diferenciarse en diferentes líneas celulares y la eficiencia de la transducción genética [11] [29].

### Cordón umbilical

Entre las fuentes de obtención de CMM, las que han tomado mucho auge en los últimos años son los tejidos de la placenta, el líquido amniótico, la gelatina de Wharton y el CU. El sitio donde se encuentran principalmente las CCM es el tejido que recubre los vasos sanguíneos del CU. La sangre del CU es utilizada, pero actualmente es tópico de controversia, debido a ciertos aspectos éticos que median en su obtención. No obstante, se ha vuelto más común guardar o donar la sangre de esta fuente para que pueda ser utilizada posteriormente. Los CU se obtienen de su donación; se recogen en un frasco esterilizado y se trasladan al banco de tejidos en un plazo máximo de 24 horas. Tras su recepción, se mantienen en PBS a 4 °C hasta su procesamiento [30] [31] [32].

De forma general, para aislar las células madre mesenquimales a partir de cordón umbilical (CMM-CU), se debe lavar el cordón con PBS y cortarlo transversalmente en fragmentos de 0,5 a 1 cm. Estos se someten a digestión enzimática durante 3 horas a 37 °C con agitación rotatoria en presencia de combinaciones de colagenasa 0,075 %, hialuronidasa 0,05 % o tripsina 0,125 %, y se elimina el tejido sobrante utilizando un filtro de 100  $\mu$ m. Luego, se determina el número de células viables, para lo cual se resuspenden en DMEM con 2 mM de un medio rico en L-glutamina, SFB 20 %, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 g/mL) y anfotericina B (0,25 mg/mL), y se cultiva la suspensión en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 2 días de cultivo, se reemplaza el medio y se observa al microscopio la presencia de células adherentes, que proliferan. Al superar la confluencia del 80 %, se trata con una solución de tripsina. Tras comprobar la viabilidad y ajustar la concentración, se transfiere a frascos de cultivo y se cultiva de nuevo para lograr su expansión. El recuento celular se lleva a cabo mediante incubación a concentraciones saturadas de anticuerpos monoclonales marcados, tales como CD105-ficoeritrina (PE, por sus siglas en inglés), CD90-PE-Cy5, CD73-PE, CD34-PE, CD45-fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), CD31-PE y FITC-IgG2a de ratón. Tras eliminar el exceso de anticuerpo mediante lavado con PBS, las células se analizan por citometría de flujo, lo cual se hace por medio de la lectura de fluorescencia [5] [33] [34].

Posteriormente, es posible realizar la diferenciación en tejidos osteogénicos, adipogénicos y linfocitarios. La diferenciación osteogénica y adipogénica se basa en la siembra de CMM-CU en pocillos, el crecimiento en incubadora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, y la sustitución del medio dos veces por semana hasta alcanzar la confluencia. En el momento de la confluencia, se añade un medio de cultivo diferente para promover la diferenciación. Para la diferenciación osteogénica se añade un medio con 200 nM de hidrocortisona, 50 g/mL de ácido ascórbico y 10 nM de β-glicerofosfato, mientras que para la diferenciación adipogénica se añade un medio con 60 M de indometacina, 10 M de dexametasona y 5 mg/mL de insulina. Por su parte, para la diferenciación linfocitaria, mediante un gradiente de densidad en Ficoll, se aíslan las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de donantes sanos. Esta suspensión se incuba en PBS con diacetato de carboxifluoresceína éster succinimidil (CFSE, por sus siglas en inglés) 0,125 μM por 5 minutos. Posteriormente, se lava con PBS y SFB 2 %, se resuspende en un medio de crecimiento con SFB 5 %, y se cultiva en pocillos utilizando 1,25 g/mL de fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés) como estímulo mitogénico. Las CMM-CU se añaden al pocillo en una relación 1:10 respecto al PBMC [35] [36].

Aun cuando la obtención de CCM de CU tiene ventajas con respecto a la obtención de la materia prima, y favorece una alta diferenciación, es un proceso de gran dificultad y de baja tasa de éxito; esta varía según diversos autores entre un 0 y un 60 %. Actualmente, no se ha determinado una técnica estandarizada que asegure la obtención de CCM de todas las unidades de sangre de CU. En este momento, se habla de que la única forma de garantizar una mejor tasa de éxito es cuando se parte de unidades óptimas, con un alto número de células [37].

### Mecanismos de regulación de la respuesta inmune por parte de las CMM

Como se mencionó anteriormente, las CMM son potentes herramientas en la terapia de renovación de tejidos, debido a su capacidad de derivarse en varios linajes. Sin embargo, ha llamado la atención la capacidad inmunomoduladora que han llegado a demostrar en estudios preclínicos y clínicos [4]. Las características principales que estas presentan a la hora de regular la respuesta inmune son las siguientes:

1. Baja inmunogenicidad, producto de la ausencia en la expresión de moléculas de MHC tipo II y co-estimuladoras de la respuesta adaptativa, entre estas los antígenos CD80 y CD86, los cuales en conjunto activan los linfocitos T cuando se unen al receptor CD28 que dichos linfocitos presentan en su superficie y los inhiben cuando se unen a sus receptores CD152 [38]. También, poseen una expresión constitutiva mínima de MHC tipo I, lo que facilita su uso para trasplantes alogénicos [39].
2. Capacidad de suprimir las respuestas asociadas a procesos inflamatorios promovidos por células del sistema inmunológico adquirido (linfocitos T colaboradores 1 o Th1, linfocitos T citotóxicos o CD8+ y linfocitos B). Por otra parte, inducen una respuesta celular del sistema inmunológico asociada a procesos antiinflamatorios [39].
3. Regulación de la actividad de las células de la respuesta inmune innata, como los linfocitos NK (Natural Killers) y las células presentadoras de antígeno, al moderar la liberación de citoquinas que participan en la comunicación celular responsable de la coordinación de la respuesta de estas células [38].

Por ende, las CMM pueden interferir en la biología, la activación y la generación de las distintas células del sistema inmunológico, coordinando tanto la respuesta innata como la adquirida.

### Efectos de la CMM en la respuesta inmune innata

Algunos estudios han demostrado que las CMM tienen un efecto directo sobre las células dendríticas y los macrófagos en general, en su maduración y diferenciación. Este altera la capacidad de estas células de liberar citoquinas proinflamatorias. Como consecuencia, se dificulta la presentación de antígenos, por una disminución en la expresión del MHC tipo II. Las CMM mediante la producción de la prostaglandina E2 (PGE2), un fuerte mediador inflamatorio, inducen en estas células la producción de interleucina 10 (IL-10, citoquina antiinflamatoria con la capacidad de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa o TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés, producidos por macrófagos y linfocitos T) [38] [40].

Con respecto a las células NK, estudios *in vitro* han demostrado que cuando estas células son incubadas con las CMM, pueden inhibir su actividad citotóxica, ya que disminuyen la expresión de receptores de superficie. Estos son los encargados de regular su actividad citolítica, además de disminuir su proliferación [40].

Los neutrófilos son otras células importantes de la inmunidad innata. En infecciones bacterianas son rápidamente movilizadas y activadas para eliminar los microorganismos mediante fagocitosis. Para eliminar a las bacterias, en los neutrófilos ocurre un proceso conocido como estallido respiratorio. Este consiste en el aumento súbito del consumo de oxígeno por parte de la célula gracias al sistema NADPH-oxidasa. Como consecuencia, se da una producción explosiva del radical superóxido, utilizado para la destrucción de agentes patógenos, junto con una regulación de la respuesta inflamatoria mediante la quimiotaxis de otros polimorfonucleares [41]. Las CMM son capaces de retardar la apoptosis espontánea de neutrófilos en reposo y activados, mediante la supresión de este estallido respiratorio, gracias a la disminución de la producción de IL-6, citoquina proinflamatoria con la capacidad de inducir las reacciones de fase aguda coordinadas por células de la respuesta innata [38] [42].

### Efectos de las CMM en la respuesta inmune adaptativa

Las CMM modulan la respuesta inmune a través de la expansión de células T reguladoras (CD4+), las cuales se encargan de moderar la proliferación de células inmunes. Su activación está dada por el MHC y por la secreción de PGE2 y el TGF- $\beta$ , capaces de inhibir la proliferación de células inmunitarias [40].

Con respecto a los linfocitos CD8+, se ha demostrado en estudios *in vitro* que las CMM obtenidas con algún antígeno de tipo viral intracelular han sido menos sensibles al efecto lítico de estos. Se ha empleado interferón gamma (IFN- $\gamma$ , por sus siglas en inglés) para incrementar en ellas la expresión superficial de las moléculas de MHC tipo I. No obstante, este efecto no restaura la propensión a la muerte celular inducida por los linfocitos citotóxicos, lo que sugiere que las CMM inhiben su actividad por mecanismos de supresión de las citoquinas encargadas de activar estas células [43].

El segundo tipo de célula implicada en la respuesta inmune adaptativa son las células B. Estas se encargan de generar anticuerpos y, mediante una selección clonal, de diferenciarse en células de memoria para desarrollar una respuesta inmune mucho más eficaz ante un segundo contacto con un antígeno dado [38]. La alteración en la respuesta por parte de los linfocitos T citotóxicos, mediada por las CMM por los mecanismos mencionados, produce una interacción defectuosa con las células B. Dicha situación afecta la proliferación y la diferenciación de estas a células plasmáticas, encargadas de liberar anticuerpos. Este efecto indirecto sobre la funcionalidad de las células B se ve reforzado por la actividad inhibitoria directa de las CMM sobre estas células, mediante la regulación de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- $\alpha$ , que promueven la actividad de linfocitos CD4+ [44].



## Aplicaciones terapéuticas

Las CMM han demostrado ser una alternativa viable en la regeneración de numerosos tejidos. Como se describió anteriormente, estas tienen el potencial para diferenciarse hacia distintos linajes celulares con una tasa de proliferación mayor a la de muchas células diferenciadas, como los osteoblastos y los condrocitos. En estudios *in vivo* en ratones y caninos que presentaban defectos craneofaciales y en huesos largos del cuerpo, se ha demostrado que su uso puede contribuir satisfactoriamente en el tratamiento de estos. Asimismo, debido a su diferenciación en varios tejidos, han sido estudiadas para la regeneración de tendones desgastados y en el tratamiento de la artrosis de rodilla, que consiste en el desgaste de la articulación [6].

Sin embargo, debido a sus capacidades inmunomoduladoras, hoy los estudios se centran en su uso para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, en personas que han sido trasplantadas. Esta patología consiste en la activación de la respuesta inmune del huésped contra el injerto, por lo que puede generar complicaciones como la destrucción de tejido celular y, por ende, la pérdida de funcionalidad del órgano de forma progresiva [45]. En algunos estudios clínicos, el uso de CMM en personas trasplantadas ha contribuido a disminuir la proliferación de linfocitos T reactivos y a atenuar la inflamación neutrofílica que se origina por la secreción de citoquinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  [46].

En investigaciones recientes, se han publicado resultados de su aplicación en personas con trasplante de riñón. Estos indican que los pacientes que después de trasplantados fueron tratados con CMM autólogas presentaron un efecto beneficioso, demostrado por la baja incidencia de rechazo agudo e infecciones oportunistas. En otro estudio en que se analizaron variaciones según la vía y el tiempo de administración, se introdujeron CMM de la médula ósea en la fosa ilíaca cerca del riñón injertado, al mismo tiempo que se realizaba el trasplante. Mediante este procedimiento, se demostró la factibilidad de la inducción inmunorreguladora por vía de inyección intraósea de CMM del donante vivo en el trasplante de riñón, así como la tolerancia a este procedimiento por parte de los pacientes [46].

Actualmente, la seguridad en la administración de CMM, sobre todo a corto plazo, no está en duda. Los estudios en distintas patologías, como la enfermedad de injerto contra huésped, no evidencian reacciones adversas, embolia pulmonar o aumento de infecciones luego de una infusión aislada. Las interrogantes se centran en la dosis, la periodicidad y la seguridad del tratamiento a largo plazo. Esto debido a que el destino de las células infundidas aún no es bien conocido. Estas células poseen tropismo para dirigirse a los sitios de inflamación y en ausencia de ella, se depositan mayormente en el pulmón, el hígado y el riñón; por lo tanto, existe un porcentaje muy pequeño de ellas que podría permanecer en un lugar específico por un tiempo prolongado. Se sabe que en modelos murinos, 50 % de los glomérulos de ratas tratados con CMM evidenciaron un depósito adipocitario con signos de fibrosis, lo que indica una respuesta patológica a largo plazo, por su diferenciación en adipocitos. Esto podría originar una falla renal [39].

## Conclusiones

La CMM pueden ser obtenidas de distintos tejidos del ser humano y utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, con el uso del método de lisis de RBC puede aislarse la cantidad eficiente de CMM humanas a partir de pequeños volúmenes (solo 6 mL) de médula ósea, en comparación con los volúmenes más grandes normalmente usados (60 mL), por lo que representa un buen método alternativo.



Respecto a la obtención de células madre de tejido adiposo, se ve como una opción que además de favorecer la diferenciación de células, ofrece características tales como abundancia celular, accesibilidad y menor controversia por factores bioéticos.

Abonado a lo anterior, el procedimiento mediante extracción de células del CU y la sangre que contiene, antes considerados desechos médicos, se ha convertido en un campo de estudio, debido a la alta concentración de células madre que se puede obtener de esta fuente. El uso de CMM de CU parece ser un método viable a futuro gracias a la facilidad con la que se puede obtener la materia prima, así como su capacidad intrínseca de mayor expansión en comparación con otras fuentes de CMM. Si bien se logra aumentar la tasa de éxito por medio de la estandarización de un método para su obtención a partir del CU, también se necesita ampliar la cantidad de estudios sobre este tema y una legislación que respalde dicha investigación.

Sin importar el sitio de procedencia, lo interesante es el hecho de que se ha logrado demostrar la capacidad inmunomoduladora de las CMM y los mecanismos celulares asociados, así como se han podido entrever futuras aplicaciones dentro del quehacer hospitalario. No obstante, existen algunas interrogantes que deben ser esclarecidas mediante la realización de más estudios a corto y mediano plazo, para demostrar que su uso terapéutico se puede convertir en una buena opción para tratar pacientes trasplantados o con algún tipo de lesión.

## Referencias

- [1] Sánchez-Berna, C. Santiago-Díaz, y J. Jiménez-Alonso, "Acción inmunomoduladora de las células madre mesenquimales en las enfermedades autoinmunitarias", *Medicina Clínica (Barc.)*, 144(2), 88-91, 2015.
- [2] M. Najar, G. Raicevic, H. Fayyad-Kazan, D. Bron, M. Toungouz, and L. Lagneaux, "Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells," *Cytotherapy*, 18(2), 160-171, 2016.
- [3] P. Wuchter, K. Bieback, H. Schrezenmeier, M. Bornhäuser, L. P. Müller, H. Bönig, *et al*, "Standardization of good manufacturing practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications," *Cytotherapy*, 17(2), 128-139, 2015.
- [4] S. Shirjang, B. Mansoori, S. Solali, M. F. Hagh, and K. Shamsasenjan, "Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function: An up-to-date review," *Cell Immunol.* 315, 1-10, 2017.
- [5] A. Arbós, F. Nicolau, M. Quetglas, J. M. Ramis, M. Monjo, J. Muncunill, *et al*, "Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón," *Inmunología*, 32(1), 3-11, 2013.
- [6] J. A. Arévalo Romero, D. M. Páez Guerrero, y V. M. Rodríguez Pardo, "Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas", *Nova*, 5(8), 177-184, 2007.
- [7] Z. Gudleviciene, G. Kundrotas, L. Liudkeviciene, J. Rascon, and M. Jurga M, "Quick and effective method of bone marrow mesenchymal stem cell extraction," *Open Med.* 10(1), 44-49, 2015.
- [8] H. Lee, J. B. Park, S. Lee, S. Baek, H. Kim, and S. Kim, "Intra-osseous injection of donor mesenchymal stem cell (MSC) into the bone marrow in living donor kidney transplantation: A pilot study," *J. Transl. Med.*, 11-96, 2013.
- [9] C. Macías-Abraham, L. O. del Valle-Pérez, P. Hernández-Ramírez, y J. M. Ballester-Santovenia, "Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales", *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 26(4), 256-275, 2010.
- [10] R. Kuroiwa, I. Segami, R. Díaz, y C. Torres, "Antígeno Leucocitario Humano (HLA) en artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico", *Revista Peruana de Reumatología*, 4(2), 55-62, 1998.
- [11] J. A. Galván Cabrera, A. Miranda Rodríguez, J. de León Delgado, C. Macías Abraham, A. Baganet Cobas, T. Rondón Corrales, *et al*, "Aislamiento y caracterización de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo", *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(3), 375-387, 2016.
- [12] C. Pineda y C. Londoño, "Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico", *Revista Ingeniería Médica*, 3(5), 58-65, 2009.
- [13] J. K. Fraser, I. Wulur, Z. Alfonso, and M. H. Hedrick, "Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology," *Trends Biotechnol.*, 24(4), 150-154, 2006.

- [14] T. S. Housman, N. Lawrence, B. G. Mellen, M. N. George, J. S. Filippo, K. A. Cerveny, *et al*, "The safety of liposuction: Results of a national survey," *Dermatol. Surg.*, 28(11), 971-978, 2002.
- [15] M. Meruane y M. Rojas, "Células troncales derivadas del tejido adiposo," *International Journal of Morphology*, 28(3), 879-889, 2010.
- [16] L. Q. Leyva, C. C. L. Ramentol, S. F. Torres, y E. N. Pestana, "Células madre: una revolución en la medicina regenerativa", *MEDISAN*, 21(5), 593-600, 2017.
- [17] H. Mizuno and H. Hyakusoku, "Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells," *J. Nippon Med. Sch.*, 70(4), 300-306, 2003.
- [18] K. A. Almeida, A. Campa, M. I. C. Alonso-Vale, F. B. Lima, E. D. Daud, e I. N. Stocchero, "Fracción vascular estromal de tejido adiposo: cómo obtener células madre y su rendimiento de acuerdo a la topografía de las áreas donantes. Estudio preliminar", *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, 34(1), 71-79, 2008.
- [19] B. M. Shipper, K. G. Marra, W. Zhang, A. D. Donnenberg, and J. P. Rubin, "Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells," *Annals Plast. Surg.*, 60(5), 538-544, 2008.
- [20] R. Estrada y P. Venegas, "Comparación de diferentes protocolos para el cultivo de células madre mesenquimales de origen adiposo", *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 28(1-2), 21-28, 2007.
- [21] E. Serna-Cuéllar y L. Santamaría-Solis, "Protocolo de extracción y procesamiento de células madre adultas del tejido adiposo abdominal: coordenadas del cirujano plástico en la investigación traslacional", *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, 39(Suplemento 1), S44-S50, 2013.
- [22] B. M. Strem, K. C. Hicok, M. Zhu, I. Wulur, Z. Alfonso, R. E. Schreiber, *et al*, (2005). "Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells," *Keio J. Med.*, 54(3), 132-141, 2005.
- [23] A. C. Boquest, A. Shahdadfar, J. E. Brinchmann, y P. Collas, "Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue", *Methods in Molecular Biology*, 325, 35-46, 2006.
- [24] M. I. Arribas García de León, "Plasticidad diferencial de distintos clones de células madre mesenquimales aisladas de lipoaspirados humanos", tesis de doctorado, Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche, España, 2014.
- [25] O. G. Davies, P. R. Cooper, R. M. Shelton, A. J. Smith, and B. A. Scheven, 2015 "Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation," *J. Tissue Engineering*, 6, 1-10, 2015.
- [26] S. Huang, R. Fu, W. Shyu, S. Liu, G. Jong, Y. Chiu., *et al*, "Adipose-derived stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential," *Cell Transplantation*, 22(4), 701-709, 2013.
- [27] T. Takeuchi, A. Tonooka, Y. Okuno, M. Hattori-Kato, and K. Mikami, "Oct4B, CD90, and CD73 are upregulated in bladder tissue following electro-resection of the bladder," *Journal of stem cells & regenerative medicine*, 12(1), 10-15.
- [28] L. E. Sidney, M. J. Branch, S. E. Dunphy, H. S. Dua, and A. Hopkinson. (2014). Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 32(6), 1380-1389. doi: 10.1002/stem.1661
- [29] D. García Olmo y M. García Arranz, "Monografía XXVII: Células madre y terapia regenerativa", en *Células progenitoras multipotentes obtenidas del tejido adiposo y su aplicación clínica*, Real Academia Nacional de Farmacia, Ed.: Madrid, 2009, pp. 197-221.
- [30] M. Osorio, "Bancos de sangre de cordón umbilical", *Rev. Chil. Ped.*, 84(6), 601-603, 2013.
- [31] P. S. In't Anker, S. A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, G. M. de Groot-Swings, F. H. Claas, W. E. Fibbe, *et al*, "Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta," *Stem Cells*, 22(7), 1338-1345, 2004.
- [32] Y. Sakaguchi, I. Sekiya, K. Yagishita, and T. Muneta, "Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source," *Arthritis Rheumatol.*, 52(8), 2521-2529, 2005.
- [33] K. Bieback, S. Kern, H. Klüter, and H. Eichler, "Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood," *Stem Cells*, 22(4), 625-634, 2004.
- [34] J. C. Arango-Pineda, D. S. Olivares-Concha, M. F. Rojas-Salazar, J. C. Quintero-Mejía y W. Saldarriaga-Gil, "Pseudoquistes del cordón umbilical: Reporte de un caso clínico y revisión de la literatura", *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 64(3), 344-349, 2013.
- [35] S. A. Kuznetsov, M. H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco, and P. G. Robey, "Circulating skeletal stem cells," *J. Cell Biol.*, 153(5), 1133-1139, 2001.
- [36] J. M. Gimble and F. Guilak, "Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells," *Curr. Top Dev. Biol.*, 58, 137-160, 2003.



- [37] G. Kögler, S. Sensken, and P. Wernet, "Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood," *Exp. Hematol.*, 34(11), 1589-1595, 2006.
- [38] T. J. Kindt, R. A. Goldsby, and B. A. Osborne, *Inmunología de Kuby*. Nueva York: Editorial McGraw- Hill, 2007.
- [39] F. Espinoza, F. Aliaga, y P. Crawford, "Escenario actual y perspectivas de la terapia con células madre mesenquimales en medicina intensiva". *Rev. Med. Chile*, 144, 222-231, 2016.
- [40] A. Miranda Rodríguez, J. A. Galván Herrera, y J. León Delgado, "Propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales", *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(1), 20-31, 2015.
- [41] M. Cascales Angosto, "Estallido respiratorio de los fagocitos", *Anales de la Real Academia Nacional Farmacéutica*, 71(2): 365-386, 2015.
- [42] L. Raffaghello, G. Bianchi, M. Bertolotto, F. Montecucco, A. Busca, F. Dallegri, *et al*, "Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: A model for neutrophil preservation in the bone marrow niche," *Stem Cells*, 26(1), 151-162, 2008.
- [43] F. Morandi, L. Raffaghello, G. Bianchi, F. Meloni, A. Salis, E. Millo, *et al*, "Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens," *Stem Cells*, 26(5), 1275-1287, 2008.
- [44] G. Ren, X. Zhao, L. Zhang, J. Zhang, A. L'Huillier, W. Ling, *et al*, "Inflammatory Cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression," *J. Immunol.*, 184(5), 2321-2328, 2010.
- [45] A. Wegner, S. Pacheco, P. Céspedes, R. Guevara, L. Mallea, E. Darras, *et al*, "Enfermedad injerto contra huésped asociada a transfusión", *Rev. Chil. Pediatr.*, 78(5), 500-510, 2007.
- [46] L. M. Morera-Barrios, B. B. Socarrás-Ferrer, A. Bencomo-Hernández, y R. González-Mugica, "Utilización de las células madre mesenquimales en el trasplante renal", *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 30(3), 294-297, 2014.
- [47] U. Kunter, S. Rong, P. Boor, F. Eitner, G. Müller-Newen, Z. Djuric, *et al*, "Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure, but maldifferentiate into glomerular adipocytes," *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18(6): 1754-1764, 2017.