ISBN 970-27-1045-6

CULTIVO DE CELULAS PRECURSORAS OBTENIDAS DE CORDON UMBILICAL DE HUMANO

Ponce-Regalado Maria Dolores, Ortuño-Sahagún Daniel, Gudiño-Cabrera Graciela

Lab. Desarrollo y Regeneración Neural, Dpto de Biología Celular y Molecular
CUCBA U de G.
ggudinoc@cucba.udg.mx

Introducción

En 1961 Till y McCulloch demostraron la existencia de precursores hematopoyéticos y propusieron que estas células tienen la habilidad de auto-renovarse y de generar diversas células para formar tejidos diferentes. El problema con el potencial de estas células es controlar su crecimiento y diferenciación.

La hematopoyesis es un complejo sistema de multiplicación celular que involucra mecanismos de proliferación, diferenciación y maduración, incluyendo todas las líneas celulares que originan a todos los componentes celulares de la sangre (granulocitos, macrófagos, eritrocitos etc.). Todas las líneas celulares hematopoyéticas se originan de células madre o células progenitoras totipotenciales.

Las células madre producen factores de trascripción que controlan su destino así como su auto-renovación, además que cada linaje se encuentra controlado por una combinación única de estos factores, que pueden ser expresados individualmente según el linaje.

En un individuo adulto hay tejidos en los que algunas de sus células se dividen activamente, pero otras no. Entre los que se dividen están la médula ósea y la piel, en ellos encontramos células precursoras que se reproducen y generan células especializadas de sangre y de piel respectivamente. En otros tejidos se han encontrado también células madres especializadas, capaces de reproducirse y de generar tejidos especializados y sólo esos tejidos. Estas células madre especializadas son muy escasas y difíciles de aislar como en el caso de las células precursoras.

Es importante destacar que para que una célula madre pueda considerarse pluripotencial, tiene que cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, debe ser capaz de diferenciarse a células especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que se han diferenciado y finalmente, que se produzca un asentamiento claro y persistente de estas células en el tejido diana, tanto en presencia o ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta. En estos momentos no existe ningún estudio que cumpla todos estos criterios de forma estricta, aunque algunos trabajos indican de manera bastante evidente la posible existencia de células madre adultas pluripotenciales.

La existencia de células madre adultas en distintos tejidos, incluyendo el hematopoyético, el neuronal, epidérmico, gastrointestinal, músculo esquelético, músculo

cardíaco, hígado, páncreas o pulmón esta demostrado. Sin embargo, cada vez parece más evidente que las células madre adultas derivadas de estos órganos, no sólo pueden generar células maduras de dicho tejido sino también tejidos derivados de otras capas embrionarias, siendo el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas capaces de diferenciarse a tejidos como hepatocitos, músculo cardíaco, endotelio o a tejidos derivados de las tres capas embrionarias. Este fenómeno, denominado versatilidad o capacidad de transdiferenciación de las células madre adultas, no está exento de controversia, ya que mientras algunos estudios lo apoyan, otros trabajos recientes cuestionan la existencia de una auténtica versatilidad de las células, justificando algunos de los hallazgos de versatilidad en función de fenómenos de fusión celular o incluso cuestionando abiertamente los resultados experimentales (Verfaillie C.M.2003).

En estudios reportados por Broxmeyer y Gluckman (1989), demostraron que la sangre obtenida del cordón umbilical (UCB) es rica en células progenitoras hematopoyeticas (HSPC), y que estas células podrían ser usadas en transplantes, por lo que las células madre hematopoyéticas, representan un potencial para contribuir en la reparación de órganos dañados.

Estas células constituyen un banco de reserva para el mismo paciente, ya que son perfectamente compatibles inmunológicamente. Las células madre de embriones proliferan indefinidamente y pueden diferenciarse espontáneamente, dependiendo de las condiciones en las que se encuentren, a cualquier tipo de tejido. Con capacidad para transdiferenciarse hacia distintos tejidos, lo que evidencia su gran plasticidad (Mitchell, KA. y Weiss K. 2002).

Las células madre hematopoyéticas de humano son utilizadas en transplantes de médula ósea como una fuente alternativa de estás. Ya que las células hematopoyéticas en cordón umbilical son un ideal para terapia génica.

Anticuerpos marcadores de diferenciación (CD cluster differentiation antigen)

El antígeno $CD34^+$ es empleado como marcador de células hematopoyéticas de humano o progenitores celulares de humano. De hecho la mayor parte de las colonias formadas son encontradas células en $CD34^+$ de fracciones celulares y donde se comprueba que las células de cordón son altamente ricas en $CD34^+$ más que las de medula ósea (Kim K.D.Fujiki Y. 1999).

Las células madre pueden propagarse y conservan su habilidad para diferenciarse a diferentes tipos celulares de diversos tejidos. El crecimiento de las células hematopoyéticas depende de varios factores como interleucinas (IL3) teniendo múltiples citocinas capaces de estimular a los linajes de células progenitoras (Ruzicka k.2004).

Materiales y Métodos

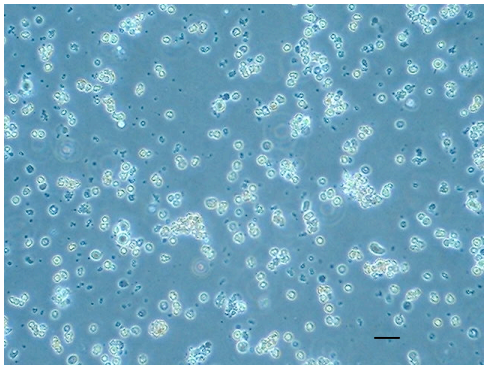
Aislamiento de células de cordón umbilical humano

Las células se obtienen de sangre de cordón umbilical humano, las cuales se diluyen 1:1 con Hanks c/Ca y Mg, posteriormente se vierten en ficoll en tubos falcón de 15 ml, y mediante el uso de una jeringa se agregó la sangre, gota a gota evitando romper el gradiente, hasta completar un volumen final de 14 ml. Posteriormente se centrifugaron a 300g por 30 min. Una vez transcurrido el tiempo se extrae el anillo con las células mononucleares, con la ayuda de una pipeta pasteur, en seguida se sometió nuevamente a centrifugación 300g por 10 min, el sedimento se resuspendió en Hanks c/Ca y Mg hasta aforar 10ml, para proceder al conteo celular con la ayuda de la cámara de Neubauer.

Resultados

Se establecieron diferentes condiciones de cultivo: 1) medio con 20% suero de caballo (SC), 2) medio con 20% Suero Fetal Bovino (SFB) y 3) medio con 10% SC y 10% SFB, todos ellos suplementados con EGF, FGF y SCF. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera de 5 % de CO_2, a 37ªC con cambio de medio 2 veces por semana. Las células que se criopreservaron se resuspendieron en medio DF-10S con 10% de DMSO y 0.1% de metilcelulosa, a una concentración de 1.0×10^{7} células por ml, se congelaron a -80ºC por 24 hrs. se almacenaron en nitrógeno líquido, hasta su uso.

La respuesta de los cultivos celulares a las diversas condiciones empleadas, muestra que la combinación de los factores utilizados (10% SC, 10% SFB + SCF), mantiene a las células indiferenciadas y en proliferación, además de conseguirse la formación de neuroesferas. En 20% SFB + SCF las células proliferan y también se mantienen indiferenciadas pero en comparación con el anterior no hay formación de neuroesferas, sin embargo la confluencia celular se presenta aproximadamente en 48 hrs.



Fotomicrografia de células indiferenciadas de sangre de cordón a las 72 h de cultivo en medio con 20%SFB en combinación con factor de crecimiento celular

Conclusión

Las células madre a partir de cordón umbilical se pueden cultivar y proliferar con una proporción y combinación especifica de sueros y factores de crecimiento. Herramienta que será de gran utilidad para el estudio de su diferenciación así como sus futuras aplicaciones terapéuticas.

Rerencias

Till JE. McCulloch EA., A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res 14: 213-222 (1961).

Verfaillie CM. Schawartz R. Reyes M. Jiang Y., Unexpected potential of adults stem cells. Ann N Y Acad. Sci. 996:231-235 (2003).

Broxmeyer HA. Gluckman E. Auerbach AD. Friedman HS. Douglas GW, Devergie A. Esperou H. Thierry D. Socie G. Lehn P et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi`s anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. N.Engl Med. 321:1174-1178 (1989).

Mitchell KE., Weiss ML., Mitchell BM., Martin P, Davis D., Morales L., Helwig B., Beerenstrauch M., Abou-Easa K., Hildreth T.I, Troyer D., Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cell 21:50-60 (2003).

Kim DK. Fujiki Y. Fukushima T. Ema H., Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 posotive and negative cells. Stem Cells. 17: 286-294 (1999).

Ruzicka K., Grskovic B., Pavlovic V., Qujeq D., Karimi A., Mueller M. M., Differentiation of human umbilical cord blood CD133+ stem cells towards myelo-monocytic lineage. Clin Chim Acta. 343:85-92 (2004).