

Propiedad de síntesis de FVIII y FvW por las células madre mesenquimales procedentes del Líquido Amniótico.

A. Soriano-Filiu¹, A.I. García-Guillén¹, M. Fernández-Arrausi¹, E. García-Navarro², J.E. Millán-Rivero², D. Sánchez-Salinas², J.M. Moraleda², M.P. Quesada-Rico², N. Marín- Atucha¹.

¹ Departamento de Fisiología Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

² Trasplante hematopoyético/Terapia Celular, IMIB-Arrixaca, Edif Laib, Campus Salud, El Palmar.

Introducción: La hemofilia es una enfermedad genética recesiva ligada al cromosoma X en la que la sangre no puede coagular correctamente. Esta alteración genética provoca un déficit de factor VIII de la coagulación en el caso de la hemofilia A o de factor IX si hablamos de la hemofilia B. La frecuencia de esta enfermedad es baja por lo que a la Hemofilia se la conoce como enfermedad rara, siendo la hemofilia A seis veces más frecuente que la B. El déficit de estos factores plasmáticos puede producir desde hemorragias leves a severas, estando el grado de la intensidad hemorrágica inversamente relacionado con la concentración plasmática del FVIII o IX. El déficit puede ser desde leve (actividad del factor 5%-40%), moderado (1-5%) o severo (actividad <1%). El tratamiento consiste en terapia de reemplazo del factor respectivo, obtenido a partir de plasma o de forma recombinante.

El factor VIII se sintetiza principalmente en el endotelio del sinusoides hepático y en menor grado en otros lechos vasculares. Recientemente se ha descrito que las células madre estromales mesenquimales (MSCs) derivadas de diferentes fuentes tisulares humanas (médula ósea, hígado, cerebro y pulmón), presentan la capacidad de producir FVIII in vitro [1]. En cultivo, estas células, son capaces de sintetizar y de secretar de forma continua FVIII funcional, aunque en cantidades mucho menores que las células sinusoidales hepáticas. Con respecto a las MSCs de los tejidos extraembrionarios, existe muy poca información sobre el potencial de estas células como fuentes de FVIII. [2]. En cuanto al concepto general de células madre o *Stem Cell* (SC) del término en inglés, son consideradas células madre aquellas que están dotadas de la capacidad de auto-renovación, de la producción de más células madre. Son células capaces de originar células hijas comprometidas en determinadas rutas de desarrollo que tendrán como futuro la especialización en cualquier estirpe celular, donde ejercerán una función particular por la que fueron desarrolladas [3]. Las SC se definen en función de dos caracteres esenciales: su capacidad de auto-renovación temporalmente ilimitada, y su amplia capacidad de diferenciación [4, 5, 6].

Las SC se originan desde el estado de blastocisto hasta el estadio de máximo desarrollo del individuo. En función de su grado de diferenciación, existen: a) las células madre totipotenciales, capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular existente, inclusive el trofoblasto, el cual dará lugar a la placenta, el cordón umbilical y los tejidos extraembrionarios [7, 8, 9]; b) las células madre pluripotenciales, caracterizadas por la capacidad de diferenciarse a las tres capas embrionarias inclusive la línea germinal [10, 11, 12] y c) las células madre multipotenciales, que son específicas de línea y por tanto limitadas a una de las capas embrionarias en particular, dependiendo de cuál sea su origen.

Las células madre mesenquimales MSCs son una población de SC que se encuentran en

los tejidos adultos, que pueden diferenciarse *in vitro* a células osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas, miogénicas, entre otras líneas [13]. También se ha descrito la capacidad diferenciadora multipotencial de las MSCs derivadas de tejidos extraembrionarios. En humanos, el proceso de formación de los tejidos extraembrionarios no se conoce por completo. Sí se sabe que la amniogénesis comienza con la formación de la membrana amniótica y que es poco después cuando el mesodermo extraembrionario se convierte en el ectodermo amniótico a causa de su estrecha relación con el amnios en estado maduro. En su interior, contiene el Líquido Amniótico (LA), siendo el amnios quien regula tanto la composición como el volumen de LA [14]. De ahí que el LA pueda ser considerado como un tejido extraembrionario que muestra presencia de MSCs [15], teniendo éstas la capacidad de diferenciación, características multipotentes y una inmunogenicidad reducida [16, 17]. Las MSCs existentes en el LA, se sabe que expresan marcadores de células madre embrionarias y de células adultas, por esta razón son consideradas como intermedias entre las células madre embrionarias y las células madre adultas [18]. Además están provistas de marcadores mesenquimales específicos en su superficie [19]. Recientemente se ha descrito que las MSCs procedentes del LA, secretan en cultivo, cantidades de FVIII y FvW biológicamente activas [20]. Nuestro objetivo de estudio consiste en la caracterización fenotípica, la potencialidad del LA procedente de partos a término y la capacidad del mismo como fuente secretora activa de FVIII y FvW.

Los tejidos extraembrionarios son una fuente de MSCs muy atractiva. Habitualmente son desechados tras el parto y tienen un potencial proliferativo aparentemente mayor que el de MSCs de los tejidos adultos como la médula ósea. Además poseen características inmunomoduladoras, antiinflamatorias y de baja inmunogenicidad. Las propiedades citadas previamente, junto con la capacidad de síntesis *in-vitro* de FVIII y FvW biológicamente activos, destaca la importancia de profundizar en el conocimiento de las MSCs de los tejidos extraembrionarios y de cómo se regula esta secreción. En base a lo anteriormente expuesto, el presente estudio evalúa cómo a partir del líquido amniótico en embarazos a término, es posible obtener MSCs que expresen FVIII y FvW.

Material y Métodos: La fuente celular del LA, ha sido extraída de mujeres con embarazos a término que eran sometidas a cesárea por motivos médicos. A partir del LA se ha llevado a cabo el aislamiento, la purificación y la expansión de células mesenquimales humanas (hMSCs). Las muestras de LA se han centrifugado a 1600 r.p.m. durante 10 minutos a una concentración del 15% en agua bidestilada para llevar a cabo la lisis hematopoyética. A continuación, se ha procedido a centrifugación bajo las mismas condiciones siendo el medio de disolución un tampón fosfato salino (PBS). El pellet obtenido se resuspende en medio de cultivo Amniomed y se siembra en frascos de 25cm² que se mantienen bajo unas condiciones de 37°C de temperatura y un aporte de 5% CO₂ durante 7-10 días, hasta que aparecen las primeras colonias. Es en este momento cuando se modifican las condiciones del medio de cultivo pasándose a utilizar un medio de cultivo bajo en glucosa (DMEN) suplementado con un 20% de suero bovino fetal. A posteriori las colonias se seleccionan con una resiembra en fase 0 hasta ser usadas en fase 2-3. El potencial transdiferenciador a estirpes adipogénica, osteogénica y condrogénica se ha realizado usando los protocolos del kit de diferenciación de células madre mesenquimales (R&D Systems human) Partiendo de 6x10⁵ células en fase 2, se cultivan 2x10⁴ células con medio estandarizado y complementado con los aportes correspondientes en cada una

de las diferenciaciones. Se han cultivado además paralelamente controles negativos con 2×10^4 células. La diferenciación adipogénica se ha evaluado tras 3 semanas en cultivo por detección de vacuolas intracitoplasmáticas cargadas de grasas neutras que se colorean de rojo con la tinción Oil-Red. La diferenciación osteogénica ha sido evaluada tras 3 semanas en cultivo por la presencia de cambios en la morfología, demostración de los depósitos de calcio con Alizarín Red y detección de la actividad de la fosfatasa alcalina con técnicas de inmunohistoquímica. La diferenciación condrogénica se ha evaluado tras 3 semanas en cultivo y se ha detectado la presencia de proteoglicanos en la matriz extracelular con a pH ácido, técnicas de inmonufluorescencia que muestran presencia de colágeno.

Algunas muestras de las hMSCs del LA en pase 2 han sido estudiadas mediante citometría de flujo, donde se ha podido caracterizar la expresión fenotípica por la presencia de marcadores mesenquimales de superficie y por PCR para demostrar la existencia de las sondas de los genes de interés, del factor VIII y el factor vonWillebrand.

Resultados: Las células hMSCs del LA en cultivo mostraron la morfología alargada típica de las MSCs. Las características morfológicas de las células que crecen adherentes en cultivo son cambiantes. Depende de si se trata de células recién extraídas, procedentes de explantes primarios o células expandidas en cultivo o a los diferentes pases, habiéndose establecido el mismo (Figura 1).

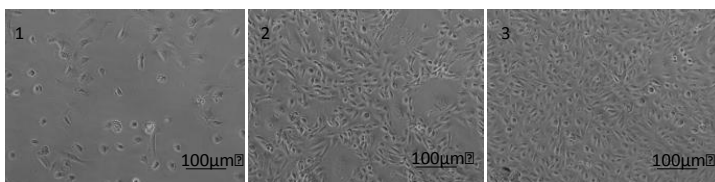


Figura 1. Comparativa células de LA en cultivo Desde la siembra (1) hasta ser expandidas en cultivo a los 10 días (2) hasta que logran establecerse en cultivo. (3)

Además el estudio por citometría de flujo corroboró estos resultados, mostrando que eran células positivas para los marcadores CD90, CD73, CD105 y negativas para los marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34 (Figura 2).

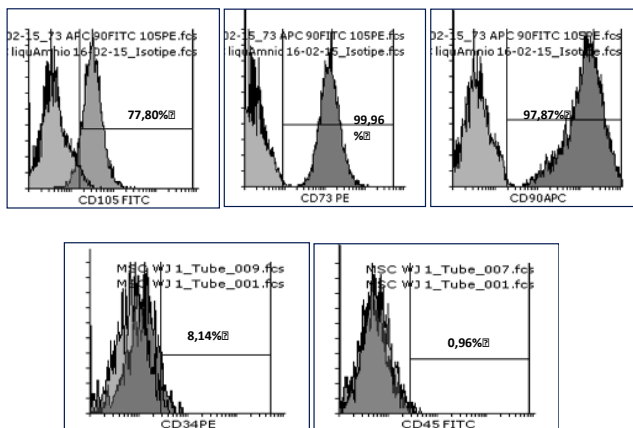


Figura 2. Citometría de flujo del cultivo de las MSCs procedentes del LA.

Consecuentemente el LA obtenido en embarazos a término presenta células madre MSCs que pueden ser cultivadas, expandidas y se diferencian in vitro (Figura 3).

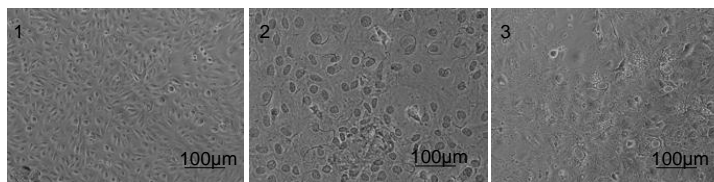


Figura 3. Cultivo MSCs procedentes de LA. Control negativo (1). Diferenciación condrogénica (2). Diferenciación adipogénica (3).

Además hemos comprobado mediante caracterización genotípica, que las células procedentes del LA, resultan positivas en cuanto a la presencia de cDNA procedente de FVIII y FvW.

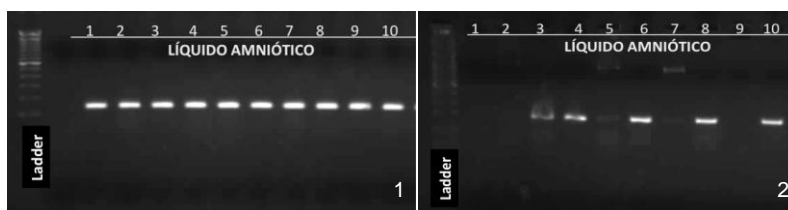


Figura 4. Todas las muestras de LA expresan FVIII, sonda de 194pb (1). La mayoría de las muestras de LA expresan FvW sonda de 200pb (2).

Conclusión: Puesto que estas MSCs del LA obtenido en el tercer trimestre de la gestación, son capaces de expresar en su totalidad FVIII y en su gran mayoría FvW, se necesitarán estudios futuros para comprender mejor su potencial, como una fuente celular útil en el tratamiento de los pacientes hemofílicos.

Referencias:

- [1] Sanada C., Kuo C., Colletti E.J., Soland M., Mokhtari S., Knovich M.A., Owen J., Zanjani E.D., Porada C.D., Almeida-Porada G. (2013) Mesenchymal stem cells contribute to endogenous FVIII:c production. *J Cell Physiol.*; 228(5):1010-6.
- [2] Kuo C-J., Mokhtari S., Soland M., Soker S., Yoo J., Owen J., Knovich A.K., Atala A., Almeida-Porada G., Porada C. (2013) Amniotic fluid stem cells for the treatment of hemophilia A. *Molecular Therapy*, 21, supplement 1: S96.
- [3] Watt F.M., Hogan B.L. (2000) Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science*; 287:1427-1430.
- [4] Morrison S.J, Shah N., and Anderson D. (1997) Regulatory Mechanisms Review in Stem Cell Biology. *Cell*; 88:287-298.
- [5] Weissman I.L. (2000) Stem cells: Units of development, unit of regeneration and units of evolution. *Cell*; 100:157-168.
- [6] Eslaminejad, B., Jahangir, S., and Aghdami, N. (2010) Comparison of Proliferatioz, Senescence and Differentiation into Skeletal Cell Lineages of Murine Bone Marrow-Derived and Amniotic Fluid

Mesenchymal Stem Cells; 12(6), 615–623.

[7] Parolini O., Alviano F., Bergwerf I., Boraschi D., De Bar C., De Waele P., Dominici M., Evangelista M., Falk W., Hennerbichler S., Hess D.C., Lanzoni G., Liu B., Marongiu F., McGuckin C., Mohr S., Nolli M.L., Ofi R., Ponsaerts P., Romagnoli L., Solomon A, Soncini M, Strom S, Surbek D, Venkatachalam S, Wolbank S., Zeisberger S., Zeitlin A., (2006) Human Placenta: a source of progenitor stem cells? *J Reproduktions Med Endokrinol*; 3:117-126.

[8] Da Silva Mierelles I, Chgastelles P.C., Nardi N.B. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues. *J Cell Sci*; 119:2204-2213.

[9] Cai J., Weiss M.L., Rao M.S. (2004) In search of stemness. *Experimental Hematology*; 32:585-598.

[10] Watt F.M., Hogan B.L. (2000) Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science*; 287:1427-1430.

[11] Baksh D., Song L., Tuan R.S. (2004) Adult mesenchymal stem cell: Characterization, differentiation and application in cell gene therapy. *J. Cell. Mol. Med*; 8:301- 316.

[12] Delorme B., Chateauvieux S., Charbord P. (2006) The concept of Mesenchymal stem cells. *Regen Med*; 1:497-509.

[13] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 284 (5411):143-147.

[14] Robinson, W.P., Mcfadden, D.E., Barrett, I.J., Kuchinka, B., Penaherrera, M.S., Bruyere, H., Best, R.G., Pedreira, D.A., Langlois, S. and Kalousek, D.K. (2002) Origin of amnion and implications for evaluation of the fetal genotype in cases of mosaicism. *Prenat Diagn*; 22:1076-1085.

[15] Roubelakis, M.G., Trohatou, O., Anagnou, N.P. (2012). Amniotic Fluid and Amniotic Membrane Stem Cells: Marker Discovery. *Stem Cells International*,2012, 107836. doi:10.1155/2012/107836.

[16] Javazon, E.H., Beggs, K.J., Flake, A.W. (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes and passaging, *Exp. Hematol.*;32(5):414-25.

[17] Uccelli, A., Pistoia, V., Moretta, L. (2007) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? Review. *TRENDS in Immunology*; 28(5):219-26.

[18] Kim, J., Lee, Y., Kim, H., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, S.K., Cho, D.J., Kang, S.G., You, J. (2007). Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif.*; 40(1):75-90.

[19] Dominici Le Blanc, K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 doi: 10.1093/cyto/28.6.1037

[20] Kuo C-J. (2013). Amniotic fluid stem cells for the treatment of hemophilia A. *Molecular Therapy*. 2013 doi: 10.1038/mt.2013.10