

El lisado plaquetario humano permite una eficiente expansión y estabilidad de las células estromales mesenquimales procedentes de gelatina de Wharton mediante la captación y liberación de factores regenerativos solubles

Mariana Cañas-Arboleda, Karl Beltrán, Carlos Medina, Bernardo Camacho, Gustavo Salguero.

Unidad de Terapias Avanzadas

Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud — IDC BIS.

Este resumen corresponde al trabajo publicado en *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21, 6284; doi:10.3390/ijms21176284

Introducción.

Las células estromales mesenquimales procedentes de gelatina de Wharton (CEM-GW) son células multipotentes con limitada renovación celular, baja formación de tumorigénesis e inmunogenicidad debido a la ausencia en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC – II) y una baja expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40 (Herberts et al., 2011; Jacobs et al., 2013, Lim et al., 2019; Windt et al., 2017), dichas células tienen la ventaja de presentar mayor tasa proliferativa, alta expresión de algunos marcadores embrionarios y ser menos heterogéneas y de más fácil acceso y aislamiento que las CEM obtenidas de tejido adulto (Bongso y Fong, 2013). Las CEM-GW son caracterizadas por su capacidad inmunomoduladora lo que las hace óptimas para ser usadas como Producto Medicinal de Terapia Avanzada alogénico (“off-the-shell”) en estudios clínicos enfocados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y ortopédicas (Liau et al., 2020). En este contexto, es de vital importancia establecer procesos productivos grado BPM que aseguren la reproducibilidad y calidad de todo Producto Medicinal generado a partir de dichas células, con base en esto, el presente trabajo se enfocó en establecer un medio de cultivo óptimo para el proceso de aislamiento, y expansión de CEM-GW para su futuro uso como Producto Medicinal en Investigación en ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes enfermedades que aquejan a la comunidad colombiana.

Metodología.

Se realizó la evaluación de la cinética de crecimiento, la caracterización inmunofenotípica, capacidad inmunomoduladora y secretoma de CEM-GW (n=4) expandidas en medio DMEM suplementado con 10% de Lisado Plaquetario Humano (LPH, n = 3, batch 2, 5, 8), Suero Humano (SH, n = 3, batch 74, 77, 84) y Suero Fetal Bovino (SFB, n = 2, Batch 1, 2).

Resultados y Discusiones.

No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre la proliferación celular en presencia de los diferentes suplementos de cultivo. Sin embargo, después de 72 h de cultivo, se observó un aumento en la luminiscencia de CEM-GW cultivadas en presencia de LPH, en comparación a SH (2,3 0,65 veces de cambio, $p < 0,0001$) y SFB (2,7 1,3 veces de cambio, $p < 0,0001$, Figura 1a). La morfología celular evaluada en CEM-GW mostró una forma típica alargada con pequeño citoplasma en células expandidas en LPH (lo que permitió obtener PD mayores con bajo tiempo duplicacional), mientras que células cultivadas en SH y SFB mostraron una forma similar a un fibroblasto con citoplasma agrandado (Figura 1b).

No se encontraron alteraciones del perfil inmunofenotípico de las CEM-GW cultivadas con LPH, SH y SFB, encontrándose expresión de CD105, CD90, CD73 y CD274 y ausencia en la expresión de CD34, CD45, HLA-DR y CD31. En cuanto a la capacidad inmunosupresora de linfocitos T (Figura 2), tampoco se encontraron diferencias estadísticas cuando dichas células fueron cultivadas en LPH, SH y SFB.

Durante el crecimiento de CEM-GW en presencia de los diferentes suplementos de cultivo, se encontró consumo principalmente de factores como PDGF -AA (91.1%), AB (94.4%), BB (98%), EGF (93.2%) y Angiogenin (79.8%) en CEM-GW cultivadas con LPH, dicho comportamiento no fue observado en los cultivos suplementados con SH y SFB donde se evidenció en tiempo 0 concentraciones bajas de dichos factores (Figura 3). Así mismo, se observó una acumulación de factores pro-angiogénicos y pro-supervivencia como osteoprotegerin, HGF, GM-CSF y IGF1 en el sobrenadante de CEM-GW cultivadas con LPH en comparación con las cultivadas con SH y SFB ($p < 0.05$, Figure 4). Adicionalmente, se observó una acumulación de factores inmunomoduladores como IL-6 (Razón de cambio 266.5; 5 días vs. 0 días), GRO Alpha (Razón de cambio 24.3; 5 días vs. 0 días) y G-CSF (Razón de cambio 6.0; 5 días vs. 0 días) en el sobrenadante de CEM-GW cultivadas con LPH.

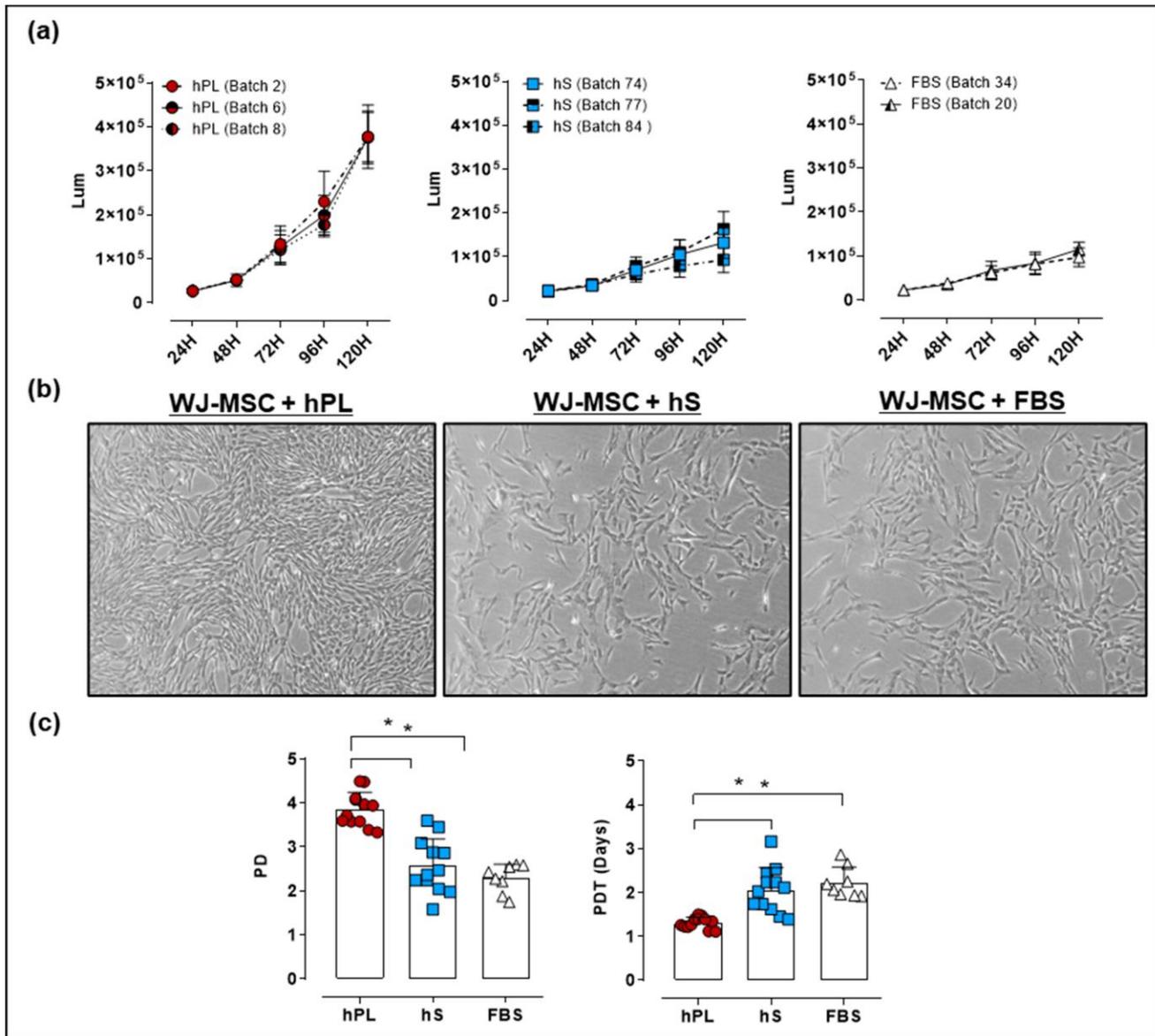


Figura 1. Evaluación del crecimiento de CEM-GW con 10% LPH, SH y SFB. (a) Cinética de proliferación y viabilidad de CEM-GW determinada por CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Unidades: Luminiscencia); (b) Evaluación microscópica de CEM-GW en pase 2 (Magnificación 50X) (c) Duplicación poblacional (PD) y tiempo de duplicación poblacional de CEM-GW sembradas con 10% LPH, SH y SFB (verde, n = 4 batches), SH (Azul, n = 3 batches) y SFB (Rojo, n = 2 batches). Media \pm SD, * $p < 0.05$, análisis Tukey's test.

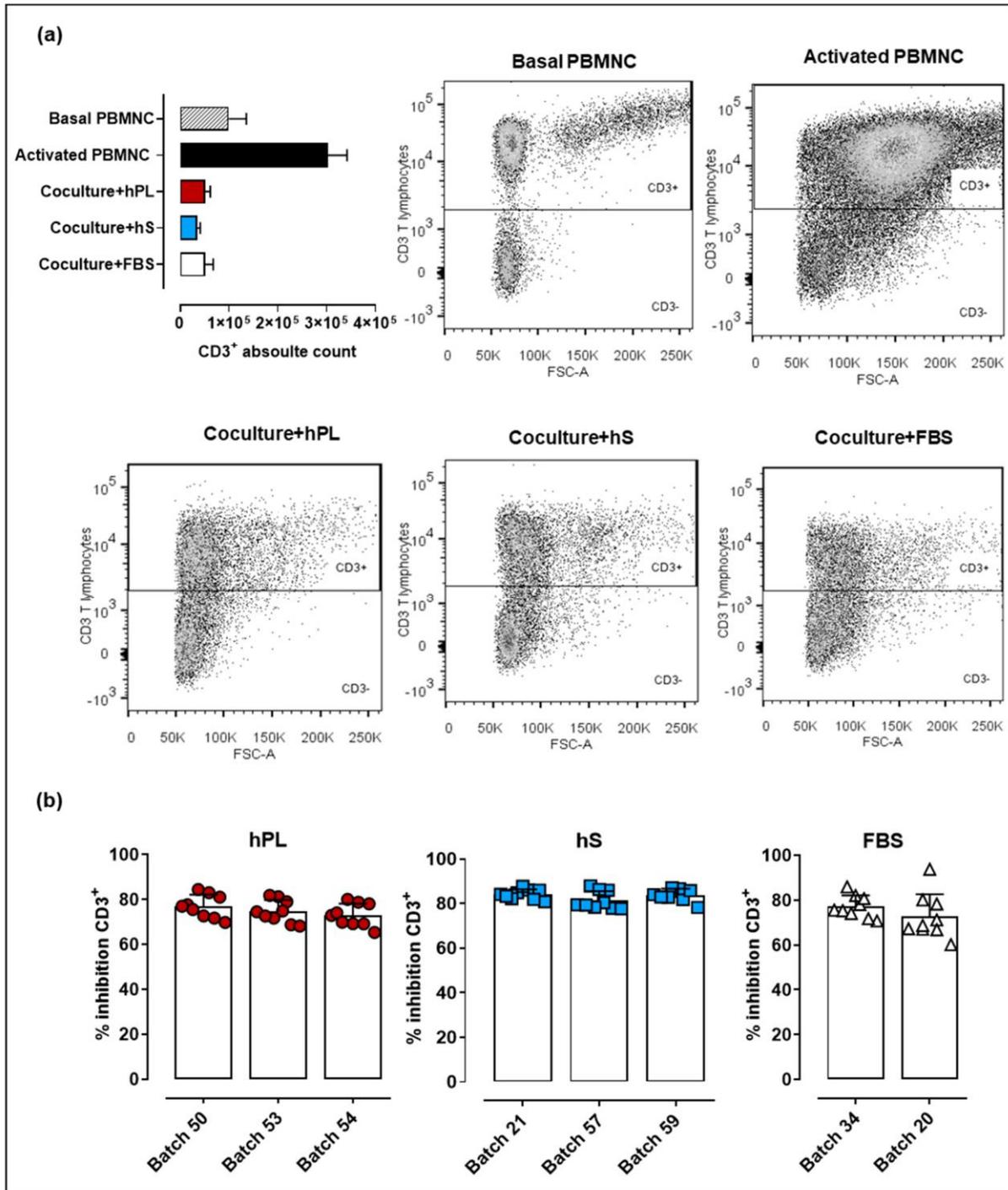


Figura 2. Potencial inmunosupresor de CEM-GW cultivadas en LPH, SH y SFB. (a) Evaluación de la inhibición de linfocitos CD3⁺ en co-cultivo con CEM-GW. (b) Porcentaje de inhibición de linfocitos CD3⁺ en co-cultivo con CEM-GW.

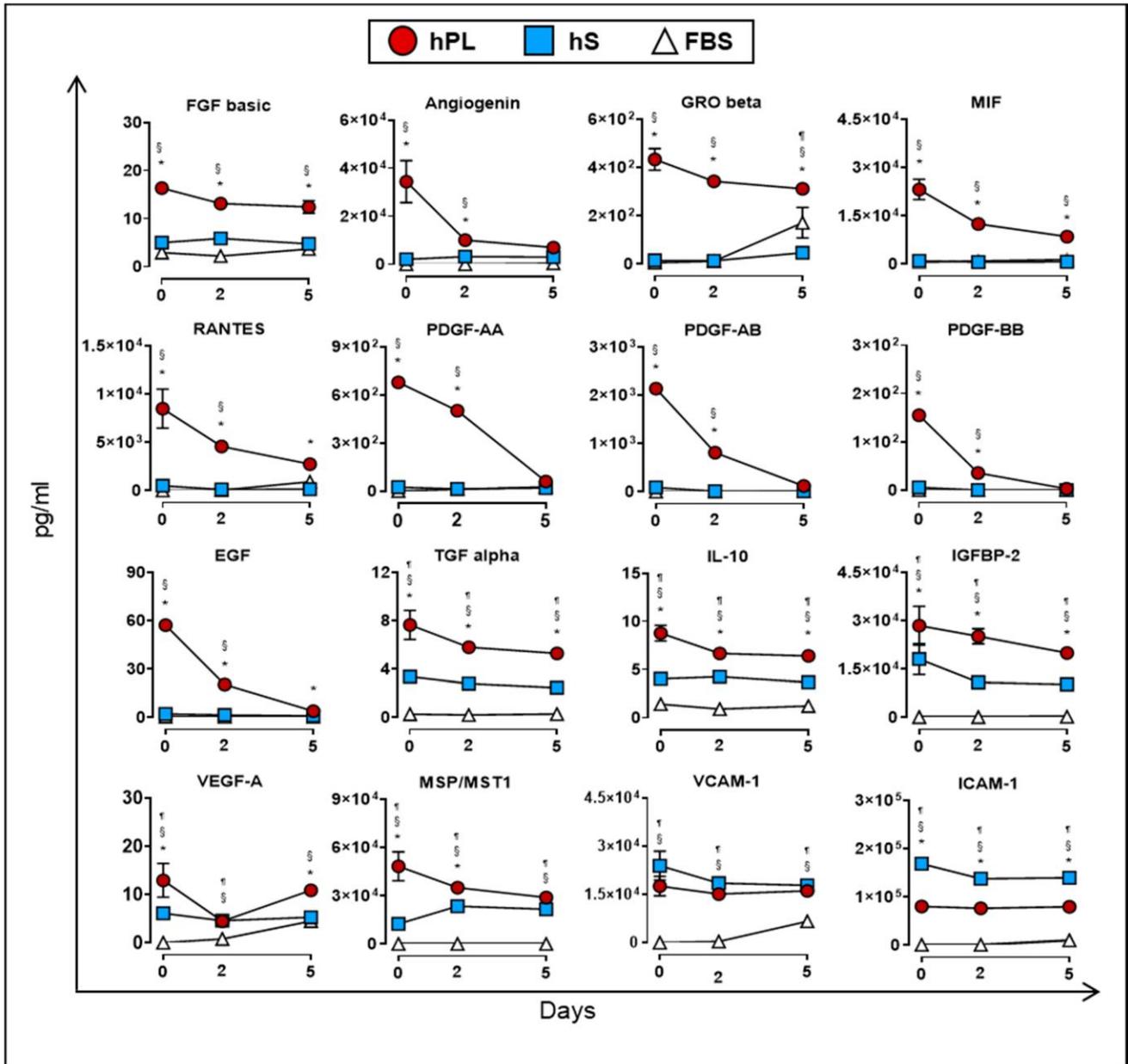


Figura 3. Consumo de citoquinas y factores de crecimiento por parte de CEM-GW cultivadas con LPH, SH y SFB.

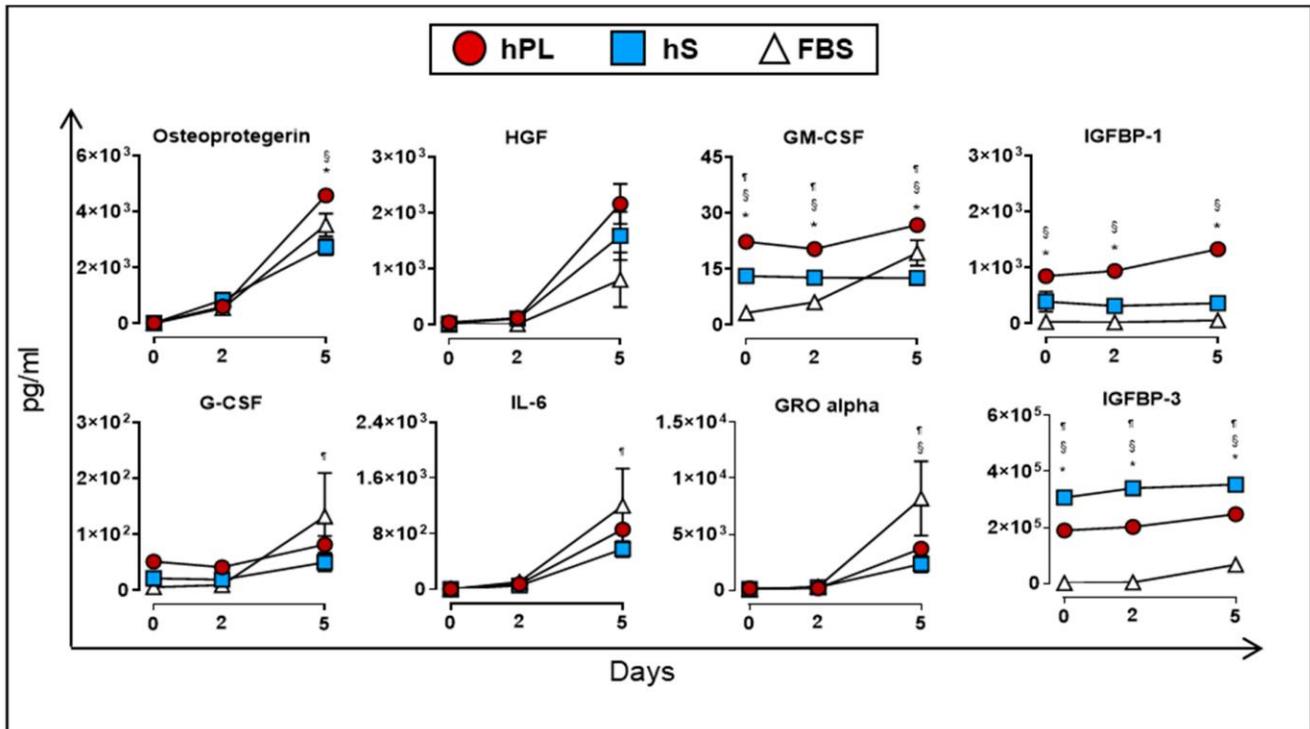


Figura 4. Liberación de citoquinas y factores de crecimiento por parte de CEM-GW cultivadas con LPH, SH y SFB.

En conclusión, el presente estudio provee información que soporta el uso eficiente de LPH como un suplemento alternativo para la expansión de CEM-GW, dicho suplemento genera un microambiente óptimo para la proliferación celular y favorece al incremento del rendimiento células, viabilidad y secreción de factores inmunomoduladores, pro-angiogénicos y de supervivencia celular lo cual potencia las características de las CEM-GW para ser usadas como terapia inmune o regenerativa.

Bibliografía

Bongso, A., & Fong, C-Y. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9:226–40. doi: 10.1007/s12015-012-9418-z.

Herberts, C.A., Kwa, M.S.G., & Hermsen, H.P.H. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine*, 9:29. doi:10.1186/1479-5876-9-29.

Jacobs, S.A., Roobrouck, V.D., Verfaillie, C.M., & Van Gool, S.W. (2013). Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunology and Cell Biology*, 91(1):32–39. doi: 10.1038/icb.2012.64.

Liau, L.L., Ruszymah, B.H.I., Ng, M.H. & Law, J.X. (2020). Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Current Research in Translational Medicine*, 68(1): 5-16. doi: 10.1016/j.retram.2019.09.001.

Lim, W.L., Liau, L.L., Ng, M.H., Chowdhury, S.R., & Law, J.X. (2019) Current progress in tendon and ligament tissue engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(6): 549-571. doi:10.1007/s13770-019-00196-w.

de Windt, T.S., Vonk, L.A., Slaper-Cortenbach, I.C.M., van den Broek, M.P.H., Nizak, R., van Rijen, M.H.P., de Weger, R.A., Dhert, W.J.A., & Saris, D.F.B. (2017). Allogeneic mesenchymal stem cells stimulate cartilage regeneration and are safe for single-stage cartilage repair in humans upon mixture with recycled autologous chondrons. *Stem Cells*, 35(1):256–64. doi: 10.1002/stem.2475.