



DIFERENCIACIÓN “IN VITRO” DE UNA LÍNEA INMORTALIZADA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PORCINAS A CARDIOMIOCITOS, ADIPOCITOS U OSTEOCITOS.

Isabel Moscoso, Javier Barallobre, Oscar Martínez de Ilarduya, Patricia Añón y Nieves Doménech.

Unidad de Investigación. CHU Juan Canalejo (La Coruña).

En los últimos años han aumentado los estudios sobre la aplicación de las células madre para el trasplante celular y regeneración de distintos tejidos en pacientes que sufren diferentes enfermedades. Las células madre mesenquimales (CMM) de médula ósea tienen especial interés debido a su capacidad de diferenciarse a distintas líneas de tejidos como son el tejido óseo, cartílago, músculo cardíaco y adiposo, entre otros. La especie porcina, fisiológicamente similar a la humana, puede ser un buen modelo experimental para definir el potencial terapéutico de estas células.

Objetivo. Nuestro objetivo fue el aislamiento, caracterización e inmortalización de CMM porcinas (pCMM) para estudiar su potencial de diferenciación “in vitro” en distintas células aptas para su aplicación en terapia celular.

Métodos. Las pCMM se obtuvieron a partir de aspirados medulares de fémur o costilla de cerdos Large-White. Las células adherentes (CMM) tras 4 semanas en cultivo, se inmortalizaron con el plásmido pRNS-1 para conseguir líneas estables de crecimiento continuo que se caracterizaron fenotípicamente mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales. Para su diferenciación a cardiomiocitos, las células obtenidas se trataron 24 horas con 5-azacitidina 10 μ M y se determinó su fenotipo por inmunohistoquímica. Para su diferenciación a adipocitos las células se crecieron en un medio de diferenciación adipogénico y el fenotipo de las células diferenciadas se caracterizó a los 10 días por la tinción histoquímica de Oil Red-O, mientras que para obtener osteocitos se crecieron en medio osteogénico durante 21 días y el fenotipo de las células diferenciadas se caracterizó por tinciones como Rojo Alizarina y Von Kossa.

Resultados. Se obtuvieron 4 líneas estables de CMMs inmortalizadas, de ellas se escogió la denominada pBMC-2 para los estudios posteriores. La línea pBMC-2 presentó el siguiente fenotipo: CD29, CD31, CD44, CD46, SWC3 y SLA α positivo y CD45, CD56 y CD106 negativo, marcadores descritos para las CMM primarias. Tras la estimulación con 5-azacitidina, con la línea pBMC-2, obtuvimos un porcentaje variable (30-60%) de células con características de cardiomiocitos siendo positivas para α -actina, desmina y Conexina-43. En el caso de la inducción adipogénica a los 10 días, el 80% de las células presentaban vesículas lipídicas determinadas por su tinción con Oil Red O, característica de adipocitos, mientras que tras su cultivo en medio osteogénico, a los 21 días, entre el 30 y el 50 % de las células presentaban los depósitos de calcio propios de los osteocitos determinados por la tinción de Rojo Alizarina y/o Von Kossa.

Conclusion. La obtención, caracterización, inmortalización y diferenciación de pCMM a cardiomiocitos, adipocitos u osteocitos puede ser una útil herramienta para el desarrollo de modelos de terapia celular “in vivo” utilizando como modelo biomédico el cerdo.