

Metodología para mejorar la eficiencia en la migración y detección de células madre mesenquimales humanas en modelos murinos

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000200001>

Naves Díaz M

Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Red de Investigación Renal del Instituto de Salud Carlos III (REDinREN-ISCIII). Instituto de Investigación Sanitaria Principado de Asturias (ISPA). Oviedo (España)

La osteoporosis es una enfermedad generalizada del sistema esquelético caracterizada por un desequilibrio entre la formación y la resorción óseas que conlleva a una pérdida de masa ósea y a un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que compromete la resistencia ósea y que condiciona como consecuencia una mayor fragilidad ósea y una mayor susceptibilidad a las fracturas¹.

En la cavidad de los huesos (médula ósea) coexisten dos células troncales: la célula madre hematopoyética, la cual da lugar a todas las células que forman la sangre y el sistema inmune, y la célula madre mesenquimal, responsable de la formación del esqueleto. Los osteoblastos o células formadoras de hueso tienen su origen por la diferenciación de las células madre mesenquimales. Estas células pluripotentes poseen la capacidad de originar una amplia variedad de tipos celulares como los osteoblastos, adipocitos o condrocitos²⁻⁴. Esta característica las convierte en candidatos de gran interés para la medicina regenerativa por su capacidad de poder migrar a las zonas de lesión teniendo la capacidad de generar hueso de *novo*⁵.

En la década de los 2000 ha crecido el interés en la utilización de las células madre mesenquimales en el campo del metabolismo óseo. Los estudios se han focalizado fundamentalmente en el tratamiento por vía intravenosa de células madre mesenquimales a niños con osteogénesis imperfecta, una deficiencia enzimática hereditaria de la síntesis de colágeno por las célu-

las mesenquimales en el hueso. Esta hipótesis se basa en la observación de que el trasplante de médula ósea puede proporcionar células estromales capaces de sintetizar colágeno intacto tipo I, reemplazando la deficiente función celular del paciente y mejorando los síntomas de la enfermedad. Se observó eficacia del tratamiento en un estudio realizado a seis niños recién nacidos, mostrando mejores tasas de crecimiento y comenzando a sintetizar hueso intacto⁶. En un segundo estudio, estos mismos autores mostraron que las células madre mesenquimales autólogas tenían una producción normal de colágeno en las cavidades óseas, y que los niños trasplantados tenían unas curvas de crecimiento similares a las de los niños trasplantados con médula ósea alogénica⁷. Este trabajo pionero ha servido de base para la aplicación exitosa de las células madre mesenquimales por vía intravenosa en otras entidades clínicas.

Las células madre mesenquimales una vez introducidas en el organismo inician un proceso que se conoce como *homing* o anidamiento en el que son retenidas en los vasos sanguíneos del tejido dañado y, desde estos vasos sanguíneos, son guiadas hasta el tejido por mediadores biológicos como quimiocinas, citoquinas y moléculas de adhesión.

Para la monitorización de las células humanas trasplantadas en modelos animales se utilizan células marcadas previamente con un fluoróforo para poder detectar la señal *in vivo* mediante resonancia



Para la monitorización de las células humanas trasplantadas en modelos animales se utilizan células marcadas previamente con un fluoróforo para poder detectar la señal *in vivo* mediante resonancia magnética o tomografía por emisión de positrones. Una alternativa a estas técnicas de imagen consiste en detectar por PCR cuantitativa a tiempo real la presencia de ADN humano transferido en el órgano de interés mediante elementos Alu, nombre que deriva de la presencia de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Alu I.



magnética o tomografía por emisión de positrones⁸. Una alternativa a estas técnicas de imagen consiste en detectar por PCR cuantitativa a tiempo real la presencia de ADN humano transferido en el órgano de interés mediante elementos Alu⁹, nombre que deriva de la presencia de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Alu I. Estos elementos Alu son secuencias cortas de unos 300 pares de bases, que se repiten a lo largo del genoma representando aproximadamente el 10% del total. Estas características y que la aparición de estas secuencias Alu se sitúa hace aproximadamente 65 millones de años, coincidiendo con el origen y expansión de los primates, las convierte en idóneas para detectar células humanas¹⁰. Sin embargo, los límites de detección de las actuales técnicas para el estudio de ADN genómico humano no permite distinguirlo de otros ADN no humanos.

En este número de la Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral, Del Real y cols.¹¹ desarrollan una metodología basada en el trabajo de Funakoshi y cols., utilizando un método de PCR cuantitativa a tiempo real altamente sensible y específico basado en secuencias Alu para discriminar las células humanas de las células de roedores¹². El objetivo de este trabajo fue estudiar, mediante análisis basado en PCR de secuencias Alu humanas, el rendimiento para detectar ADN humano después de la infusión de células madre de médula ósea humana en ratones inmunodeficientes. Las células madre de médula ósea humana se obtuvieron de la cabeza femoral de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo de cadera.

Estos autores pudieron localizar el ADN humano en los pulmones de los ratones en el primer día y 7 días después de las infusiones celulares, pero este ADN humano se detectó de manera inconsistente en el hígado y los huesos

con una discreta disminución de ADN humano entre los días 1 y 7 en el pulmón, pero con claras diferencias en los niveles de ADN humano en el día 1 comparado con muestras que no contenían ADN humano.

Los autores comentan la necesidad de estudiar la distribución de estas células tras su infusión por vía sanguínea, para lo que se necesita un método muy sensible y específico de la detección de pequeñas poblaciones de células humanas entre las células del organismo receptor. Basándose en la metodología desarrollada por Funakoshi y cols.¹², Del Real y cols. pudieron detectar concentraciones muy bajas de ADN humano entre una alta concentración de ADN de ratón¹¹. Tras la inyección de células madre de médula ósea humana por vía intravenosa en ratones, estos autores comprobaron tras las primeras 24 horas y el séptimo día que las células humanas únicamente eran detectables en pulmón, sin aparecer de forma consistente ni en hígado ni en hueso. Como consecuencia de esta limitación práctica, se están ensayando varias estrategias para aumentar el tropismo de las células madre de médula ósea humana al tejido óseo, utilizando para ello la glicosilación de proteínas de membrana que permiten una mayor atracción por el hueso¹³.

Por tanto, como se ha comentado con anterioridad, si bien la utilización de células mesenquimales humanas mediante inyección por vía intravenosa para el tratamiento regenerativo del hueso es una estrategia muy prometedora, existen limitaciones metodológicas importantes al quedarse atrapadas en los pulmones y perderse rápidamente. La búsqueda de procedimientos que dirijan estas células de forma selectiva al hueso y la capacidad de mejorar su monitorización permitirá en un futuro cercano abrir una nueva vía terapéutica para el tratamiento de la osteoporosis.



Conflicto de intereses: El autor declara no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Díaz Curiel M. Osteoporosis: concepto. Fisiopatología. Clínica. Epidemiología. Rev Osteoporos Metab Miner. 2018;10 (1 Suplemento):2-4.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284:143-7.
3. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem. 2006;98:1076-84.
4. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. J Pathol. 2009;217:318-24.
5. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. Cells. 2019;8(8): 886.
6. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:8932-7.
7. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. Nat Med. 1999;5:309-13.
8. Chikate TR, Tang L. Tracking and imaging of transplanted stem cells in animals. Methods Mol Biol. 2019; online ahead of print.
9. Schubert R, Sann J, Frueh JT, Ullrich E, Geiger H, Baer PC. Tracking of adipose derived mesenchymal stromal/stem cells in a model of cisplatin-induced acute kidney injury: Comparison of bioluminescence imaging versus qRT-PCR. Int J Mol Sci. 2018;19(9): E2564.
10. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. Nat Rev Genet. 2002;3(5):370-9.
11. Del Real A, López-Delgado L, Sañudo C, Pérez-Núñez MI, Laguna E, Menéndez G, et al. Método sensible para monitorizar la migración de las células madre mesenquimales de la médula ósea en modelos murinos. Rev Osteoporos Metab Miner. 2020;12(2):40-44.
12. Funakoshi K, Bagheri M, Zhou M, Suzuki R, Abe H, Akashi H. Highly sensitive and specific Alu-based quantification of human cells among rodent cells. Sci Rep. 2017;7(1): 13202.
13. Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. Nat Med. 2008;14(2):181-7.