

Método sensible para monitorizar la migración de las células madre mesenquimales de la médula ósea en modelos murinos

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000200002>

Del Real A¹, López-Delgado L¹, Sañudo C¹, Pérez-Núñez MI², Laguna E², Menéndez G², Garcés C², García-Montesinos B³, García-Ibarbia C¹, Santurtún A⁴, Riancho JA¹

1 Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Universidad de Cantabria. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Santander (España)

2 Servicio de Traumatología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Universidad de Cantabria. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Santander (España)

3 Servicio de Cirugía Maxilofacial. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander (España)

4 Unidad de Medicina Legal. Universidad de Cantabria. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Santander (España)

Fecha de recepción: 23/01/2020 - Fecha de aceptación: 08/04/2020

Trabajo premiado por una beca para asistir al 41º Congreso de la ASBMR (Orlando, 2019)

Resumen

Objetivo: Las células madre mesenquimales (MSCs) son atractivas en la terapia regenerativa de patologías humanas. En los modelos murinos, en los que se trasplantan MSCs humanas, es muy importante poder distinguir el origen de las MSCs identificadas en los órganos de ratones. El objetivo de este estudio fue determinar el rendimiento del análisis basado en PCR de secuencias Alu humanas para detectar ADN humano después de la infusión de células madre de médula ósea humana (hBMSCs) en ratones inmunodeficientes.

Material y método: Las hBMSCs se obtuvieron de la cabeza femoral de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo de cadera. Se infundieron 10⁶ hBMSCs por vía intravenosa mediante inyección en el seno retro-orbitario de ratones NOD/SCID. Después se evaluó la presencia de ADN humano en pulmón, hígado y hueso.

Resultados: En mezclas de ADN *in vitro*, el ADN humano se detectó fácilmente con una buena relación logarítmica-lineal. De manera similar, cuando se mezclaron osteoblastos humanos y de ratón, se detectaron fácilmente 1-10 células humanas entre 10⁵ células de ratón. Asimismo, se detectó el ADN humano en los pulmones 1 y 7 días después de las infusiones celulares en ratones NOD/SCID. Sin embargo, el ADN humano se detectó de manera inconsistente en el hígado y los huesos.

Conclusión: La detección de secuencias Alu es un procedimiento eficaz para detectar ADN humano. Los resultados confirman que la mayoría de las hBMSCs inyectadas por vía intravenosa quedan atrapadas en los pulmones. Por lo tanto, de cara al tratamiento de trastornos esqueléticos, se necesitan procedimientos para aumentar la migración de dichas células al hueso.

Palabras clave: células madre mesenquimales, osteoporosis, migración celular, terapia regenerativa, secuencias Alu.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es la enfermedad ósea más frecuente, caracterizada por una baja masa ósea y alteración de la microestructura. Esto se debe a un desequilibrio entre la formación y la resorción óseas que causa pérdida de conexiones entre las distintas trabéculas óseas y un mayor adelgazamiento y porosidad del hueso cortical. En consecuencia, se produce mayor fragilidad del hueso y un incremento del riesgo de padecer fracturas (Fx)^{1,2}.

Los osteoblastos, las células especializadas en formar hueso, se originan por la diferenciación de células madre mesenquimales (MSCs)³. Estas células son multipoten-

tes y pueden diferenciarse a una amplia variedad de tipos celulares del mesodermo, como los osteoblastos, adipocitos o condrocitos. Las MSCs son candidatos de gran interés para la medicina regenerativa, porque migran a lesiones esqueléticas donde tienen la capacidad de formar nuevo hueso⁴. La importancia de las MSCs en el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa se ve reflejada en los numerosos estudios existentes en este campo^{5,6}. Además, en estos momentos hay más de 250 ensayos clínicos con MSCs, como se puede ver reflejado en la base de datos de ensayos clínicos (clinicaltrials.gov).

Para la monitorización de las células humanas trasplantadas en modelos animales se utilizan técnicas de imagen como la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones, y células marcadas previamente con un fluoróforo para poder detectar la señal *in vivo*^{7,8}. Una aproximación alternativa consiste en detectar la presencia de ADN humano en modelos animales *ex-vivo*; es decir, una vez se haya completado el tratamiento, evaluar la presencia de ADN de origen humano en el órgano de interés por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)⁹⁻¹¹. Las secuencias o elementos Alu son elementos cortos repetitivos e intercalantes del genoma (SINE), con aproximadamente una longitud de 300 pares de bases. Existen más de 1 millón de copias de secuencias Alu en el genoma humano, que ocupan sobre un 10% del genoma completo^{12,13}. Por su pequeño tamaño, distribución específica entre especies y su elevadísimo número de copias, son una diana muy útil para detectar células humanas. Sin embargo, gran parte de las técnicas experimentales basadas en Alu para detectar ADN genómico únicamente humano no alcanzan los límites de sensibilidad y especificidad necesarios para poder distinguirlos de ADN de otros primates o roedores^{13,14}. Funakoshi y cols. han desarrollado un método de PCR cuantitativa a tiempo real altamente sensible y específico basado en Alu para discriminar las células humanas de las células de roedores, para evitar posibles reacciones cruzadas con estos¹¹.

El objetivo de este estudio fue determinar el rendimiento del análisis basado en PCR de secuencias Alu humanas para detectar ADN humano después de la infusión de células madre de médula ósea humana (hBMSCs) en ratones inmunodeficientes (NOD/SCID).

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de hBMSCs

Las hBMSCs se obtuvieron de la cabeza femoral de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo de cadera. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica de Cantabria y los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. De la cabeza femoral se extrajeron cilindros de hueso trabecular con un trócar y de estos se realizaron lavados en PBS para obtener las células de la médula ósea. Los lavados se centrifugaron en Ficoll para obtener la capa mononuclear, que es la que finalmente se cultivó hasta llegar a un estado de confluencia del 80%.

Ratones NOD/SCID e infusión de células

Se utilizaron ratones inmunodeficientes NOD/SCID, obtenidos de Charles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, Massachusetts, EE.UU.), a los que se les infundieron 10⁶ hBMSCs por vía intravenosa en el seno retro-orbitario.

Aislamiento de ADN y PCR cuantitativa a tiempo real

El fémur de ratón y los cilindros de hueso humano se homogeneizaron con un politrón en tampón de lisis y proteínasa k, que se mantuvo en una incubación durante toda la noche a 55°C con agitación. Los tejidos blandos, pulmón e hígado, se homogeneizaron directamente en tampón de lisis y proteínasa k. Después se aisló el ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, y se precipitó con etanol 100%. Se evaluó la presencia de ADN humano en el ADN extraído de esos órganos (pulmón, hígado y hueso) mediante PCR en tiempo real, con una temperatura de hibridación de 56°C durante 40 ciclos, utilizando los cebadores y el protocolo propuestos por Funakoshi¹¹ (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores y la sonda de hidrólisis utilizada para la detección de secuencias ALU

Nombre	Secuencia (5'→3')
Cebador directo (101 F)	5'-GGTGAAACCCGCTCTACT-3'
Cebador reverso (206 R)	5'-GGTTCAAGCGATTCTCCTGC-3'
Sonda de hidrólisis (144RH)	5'-CGCCCGGCTAATTTTGTAT-3'

En todos los casos se incluyeron controles negativos sin ADN (NTC, *non template controls*) y ADN extraído de tejidos de ratones sin hBMSCs. Asimismo, se analizaron ADN extraído de mezclas artificiales de células humanas y de ratón, así como mezclas de ADN humano y ADN murino purificados. Se estimó el ciclo umbral (Ct) de cada muestra, es decir, el ciclo de amplificación a partir del cual eran detectables los amplicones. Lógicamente, existe una relación inversa entre la cantidad de ADN diana presente en la muestra y el Ct.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los pacientes que donaron las hBMSCs, siguiendo los formularios y procedimientos aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Cantabria. Con respecto a los experimentos con animales, el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Cantabria y la Consejería de Sanidad de Cantabria, según lo establecido por la normativa vigente.

RESULTADOS

Mezclas de ADN humano y de ratón

En los procedimientos de detección de ADN de origen humano en un organismo distinto, como, por ejemplo, el ratón, es imprescindible una alta sensibilidad y especificidad de la técnica. Para ello la primera valoración de la técnica de detección empleada en este artículo se realizó con mezclas de ADN y con mezclas de distinto número de células de origen humano y de ratón. Para evaluar la cantidad de ADN de cada muestra se ha utilizado un espectrofotómetro (DeNovix DS-11, Wilmington, EE.UU.). En primer lugar, se mezclaron soluciones patrón de 100 ng/μL de ADN humano con 100 ng/μL de ADN de ratón en relación 1:1 y se hicieron hasta 8 diluciones seriadas 1:10 en ADN de ratón. De esa manera, se obtuvieron diluciones progresivas de ADN humano, en presencia de cantidades de ADN de ratón prácticamente constantes. Los niveles de expresión en la escala Ct fueron 11,5; 14,6; 17,2; 21,0; 23,8; 26,8; 30,0; 32,5 y 33,6; para 100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL, 0,1 ng/μL, 0,01 ng/μL, 1 pg/μL, 0,1 pg/μL, 0,01 pg/μL y 0,001 pg/μL de ADN humano, respectivamente ($r^2=0,992$; $p<0,0001$) (Figura 1). En varios experimentos independientes, el ciclo umbral (Ct) para NTC fue de 34,6±1,8, por lo que se consideró 31 (2 desviaciones estándar por debajo de la media de los NTC) como el Ct máximo para considerar como positiva la presencia de ADN humano en una muestra. No se detectó señal cuando se analizaron hasta 100 ng de ADN únicamente de ratón (Ct fue de 34,7±1,6).

Posteriormente, se mezclaron osteoblastos humanos y de ratón a distintas proporciones previa a la extracción de ADN para simular la técnica de manera real. Se pudieron detectar fácilmente 10 células humanas en una mezcla de 10⁵ células de ratón (Ct 25,6) e incluso una sola célula quedaba próxima al límite de detección (Ct 30,8) (Figura 2).

Figura 1. A) Detección de distintas concentraciones de ADN humano en una alta concentración de ADN de ratón. B) Mismos resultados utilizando una escala logarítmica en el eje de abscisas que pone de manifiesto la relación log-lineal esperada. Se muestran en la figura el valor de r^2 de la regresión de Pearson y el valor p significativo para la regresión lineal. La línea discontinua en A) y B) muestra el valor umbral de detección de ADN de origen humano al mezclar distintas concentraciones

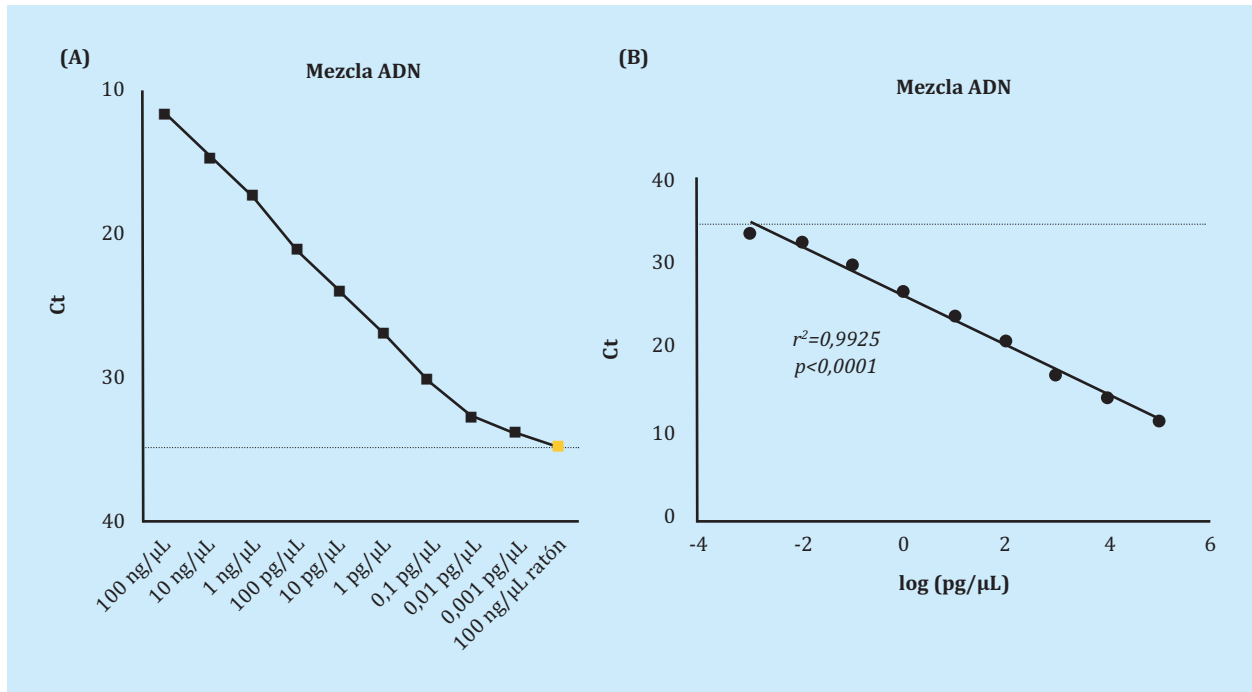
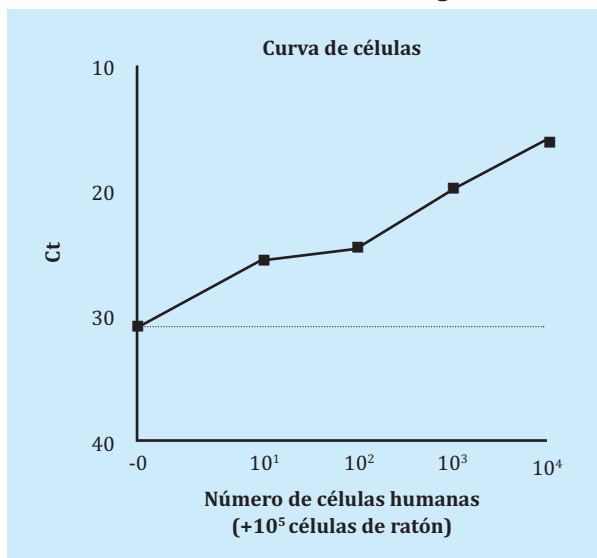


Figura 2. Curva de amplificación de la qPCR con el ADN obtenido de distintas mezclas. Las mezclas parten de distintos números de células de origen humano mezcladas con 10^5 células de ratón. La línea discontinua muestra el valor umbral de detección de ADN de origen humano



Análisis de ADN humano en tejidos de ratón

A continuación, se analizaron los tejidos de ratones NOD/SCID no fracturados tratados con hBMSCs por vía intravenosa. Además, se compararon estos niveles con los detectados en muestras de ADN de hueso humano diluido, como controles positivos. Se pudo localizar el ADN humano en los pulmones en el primer día y 7 días después de las infusiones celulares (Ct $22,6 \pm 0,7$ y $30,6 \pm 3,7$, respectivamente). Sin embargo, el ADN humano se de-

teció de manera inconsistente en el hígado y los huesos (Figura 3). Hay una disminución de ADN humano entre los días 1 y 7 en las muestras de pulmón, pero estas diferencias no son significativas. Sin embargo, al comparar los niveles de ADN humano del día 1 con las muestras que no tienen ADN sí son significativas (Figura 4).

DISCUSIÓN

La reparación de fracturas óseas es un proceso complejo, donde se dan una serie de mecanismos moleculares regulados por diversos factores que llevan a formar nuevo hueso. Esta reparación, en ocasiones, puede verse alterada por el envejecimiento y por distintas alteraciones óseas, como la osteoporosis o la necrosis avascular, entre otras⁵. La terapia regenerativa trata de solventar estos desequilibrios evitando los rechazos por alo-trasplantes y las reacciones inmunológicas adversas. Para ello se han empleado nuevos biomateriales osteoinductivos, factores de regulación osteogénica y las MSCs¹⁵. En particular, son de gran interés y existen múltiples estudios de las MSCs en este campo. Las MSCs se caracterizan por tener una capacidad de renovación alta y también de poder formar nuevos tipos celulares de origen mesodérmico, como los osteoblastos o los adipocitos. Además, tienen efectos in-muno-moduladores y segregan factores que inducen la diferenciación celular^{5,16}.

La función fisiológica y la capacidad de reparación de las MSCs humanas se estudian comúnmente en xenotrasplantes realizados en roedores. Tras los xenotrasplantes por vía intravenosa, las células pueden circular ampliamente por todo el organismo, y hay que estudiar su tropismo por distintos órganos. Consecuentemente, es necesario el estudio de la distribución de estas células tras su infusión por vía sanguínea, y para ello se necesita un método muy sensible y específico de la detección de

pequeñas poblaciones de células humanas entre las células del organismo receptor. Funakoshi y cols. han desarrollado un sistema de qPCR, teóricamente muy sensible y específico, que permite detectar estas pequeñas poblaciones de MSCs humanas que han sobrevivido tras su infusión en ratón. El mecanismo se basa en secuencias Alu que por evolución de especies difieren entre sí, logrando detectar de manera altamente específica aquellas de origen únicamente humano¹¹. Debido al número extremadamente alto de copias de la secuencia Alu en el genoma humano, un único cebador podría amplificar la secuencia genómica inter-Alu, lo que puede dar como resultado la formación de productos amplificados con patrones impredecibles y complejos. Para minimizar los efectos de tales señales no específicas, el método utiliza sondas de hidrólisis, que hibrida sobre la secuencia que ha de amplificar entre ambos cebadores. Aun así, en esta reacción hay hibridaciones inespecíficas con el genoma de ratón que provocan una inevitable señal de fluorescencia de fondo, que se considera ruido de la técnica. Nuestro objetivo fue confirmar la utilidad de esa metodología en nuestro modelo.

De hecho, con este procedimiento pudimos detectar concentraciones muy bajas de ADN humano entre una alta concentración de ADN de ratón, concretamente hasta 0,01 pg/ μ L de ADN humano entre 100 ng/ μ L de ratón. En mezclas de células, el umbral de detección fue de 1-10 células humanas en 10⁵ células de ratón.

Se inyectaron hBMSCs por vía intravenosa en ratones, y se pudo comprobar con este procedimiento que, tras las primeras 24 horas y el séptimo día, únicamente eran detectables en pulmón (no se detectaron de manera consistente ni en hígado ni en hueso). Se están ensayando varias estrategias para aumentar el tropismo de las hBMSCs al tejido óseo. Una de ellas se basa en modificar las proteínas de membrana, con partículas específicas de glicosilación que permiten la extravasación y un mayor tropismo por el hueso¹⁷.

Como conclusión, los resultados confirman que la mayoría de las hBMSCs inyectadas por vía intravenosa

Figura 3. Detección de las secuencias Alu humanas en distintos tejidos de ratón tras 1 y 7 días después de la infusión de BMSCs por vía intravenosa. En color naranja se encuentran las muestras control a las cuales no se les inyectaron células. La línea discontinua muestra el valor umbral de detección de ADN de origen humano. (●) Hígado; (◻) Pulmón; (▲) Hueso. Las figuras geométricas de día 1 muestran la media de 3 ratones; Las del día 7 de 4 ratones; Y las sin células de 2 ratones. Los triángulos hacia abajo (▼), de color verde, son muestras de hueso de origen humano

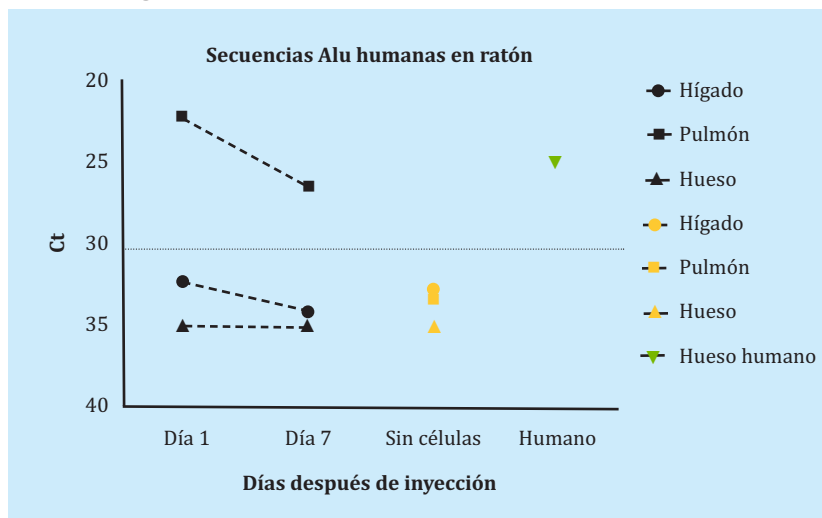
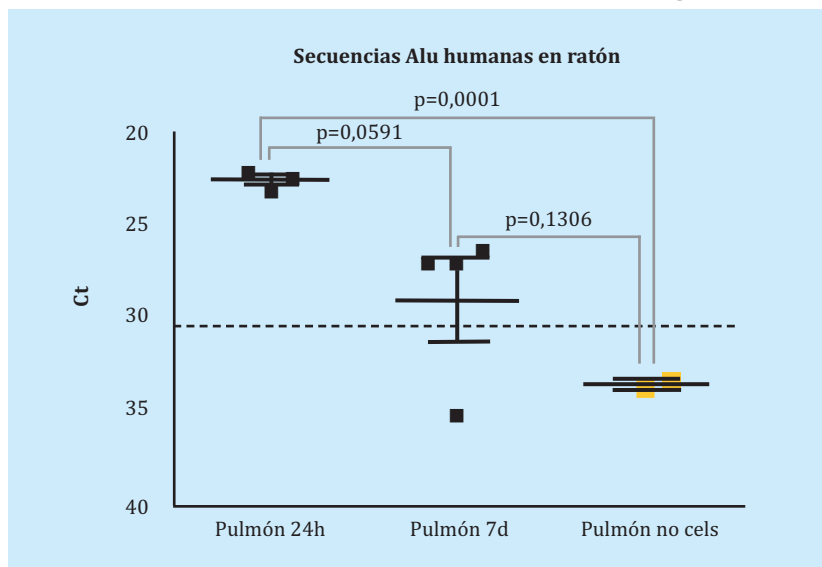


Figura 4. Detección de las secuencias Alu humanas en pulmón de ratón tras 1 y 7 días después de la infusión de BMSCs por vía intravenosa. En color naranja se encuentran las muestras control a las cuales no se les inyectaron células. La línea discontinua muestra el valor umbral de detección de ADN de origen humano



en ratones NOD/SCID se encuentran atrapadas en los pulmones y se pierden rápidamente. Por lo tanto, se necesitan procedimientos para aumentar el tropismo de estas células al hueso si se van a utilizar hBMSCs en procedimientos regenerativos esqueléticos de manera sistémica.

Financiación: Proyecto financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI16/915).

Bibliografía

1. Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, Langdahl B, Reid IR, Gold DT, et al. Postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2(1):16069.
2. Díaz Curiel M. Osteoporosis: concepto. *Fisiopatología. Clínica. Epidemiología. Rev Osteoporos Metab Miner.* 2018;10 (1 Suplemento):2-4.
3. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care. (Engl).* 2017;26(6).
4. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells.* 2019;8(8):886.
5. Iaquinta MR, Mazzoni E, Bononi I, Rotonondo JC, Mazziotta C, Montesi M, et al. Adult stem cells for bone regeneration and repair. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7:268.
6. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019 Sep;13(9):1738-55.
7. Freeman BT, Kouris NA, Ogle BM. Tracking fusion of human mesenchymal stem cells after transplantation to the heart. *Stem Cells Transl Med.* 2015; 4(6):685-94.
8. Chikate TR, Tang L. Tracking and imaging of transplanted stem cells in animals. *Methods Mol Biol.* 2019; online ahead of print.
9. Creane M, Howard L, O'Brien T, Coleman CM. Biodistribution and retention of locally administered human mesenchymal stromal cells: Quantitative polymerase chain reaction-based detection of human DNA in murine organs. *Cytotherapy.* 2017;19 (3):384-94.
10. 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.
11. 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.
12. Salem A-H, Kilroy GE, Watkins WS, Jorde LB, Batzer MA. Recently integrated Alu elements and human genomic diversity. *Mol Biol Evol.* 2003;20(8):1349-61.
13. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet.* 2002;3(5):370-9.
14. Jurka J. Evolutionary impact of human Alu repetitive elements. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(6):603-8.
15. Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, et al. Innovative biomaterials for bone regrowth. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):618.
16. Abdel Meguid E, Ke Y, Ji J, El-Hashash AHK. Stem cells applications in bone and tooth repair and regeneration: New insights, tools, and hopes. *J Cell Physiol.* 2018;233(3):1825-35.
17. 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.