

# Caracterización inmunofenotípica de las células de la médula ósea de ratas

✉ Teresa Serrano-Sánchez<sup>1</sup>, Esteban Alberti-Amador<sup>1</sup>, Lourdes Lorigados-Pedre<sup>1</sup>, Iván Díaz-Armesto<sup>2</sup>, Lisette Blanco-Lezcano<sup>1</sup>, Araceli Vallejo-Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN)  
Ave. 25 No. 15805 e/ 158 y 160, Playa, CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Hospital Clínico Quirúrgico "Joaquín Albarrán"  
Ave. 26, Playa, Cuidad de La Habana, Cuba

Fax: (537) 33 6339, 33 2420, 33 6302; E-mail: teresa.serrano@infomed.sld.cu

REPORTE

## RESUMEN

En la actualidad se conoce que las células de la médula ósea (CMO) constituyen una fuente potencial para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, entre las que se destacan las de origen hematológico y neurológico. Se sabe también que estas células son capaces de diferenciarse en células nerviosas, de ahí que sean consideradas como una fuente valiosa para el tratamiento de afecciones neurológicas que tienen como sustrato una pérdida celular subyacente. Con el objetivo de caracterizar las CMO, se realizó la titulación de los anticuerpos que se emplearon para la caracterización celular. Esto permitió evaluar la dilución de trabajo más eficaz de estos anticuerpos y caracterizar estas células desde el punto de vista inmunofenotípico. Se titularon cuatro anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes epítopes celulares (CD34; CD38; CD45 y CD90), teniendo en cuenta las especificaciones propuestas por el fabricante para cada uno de ellos. Utilizando un gradiente de Ficoll, se aislaron las células mononucleares de la médula ósea de rata (n=20), las cuales se evaluaron mediante una técnica inmunocitoquímica que permite la identificación de moléculas en la superficie celular. Para cada anticuerpo se obtuvo una dilución de trabajo cuya identificación de las células fue similar a la que se describe con la dilución sugerida por el fabricante. Se observó además, que la población estudiada era CD34; CD38; CD45 y CD90 positivas para las diferentes diluciones. Los resultados indicaron el porcentaje de expresión de cada uno de los marcadores caracterizados inmunofenotípicamente sobre la población celular de la médula ósea, además de que constituyen un ahorro económico, si se tiene en cuenta que con la optimización de la dilución de trabajo del anticuerpo se disminuye la cantidad de reactivo que se ha de utilizar.

## Introducción

Las células de la médula ósea (CMO) son una fuente alternativa importante, con un elevado grado de confiabilidad para el trasplante celular en aquellas enfermedades en las que se necesita la generación del tejido dañado, como en las enfermedades neurológicas. Debido a que se han presentado serios problemas éticos con otras fuentes utilizadas para el trasplante celular (como, por ejemplo, el tejido fetal) y que su disponibilidad ha estado limitada, los científicos se dieron a la tarea de encontrar otras fuentes celulares alternativas no embrionarias, ricas en células progenitoras y células madre [1], capaces de presentar un fenotipo neural *in vitro* [2, 3] e *in vivo* después del trasplante [4, 5]. El trasplante de CMO se ha utilizado; de manera exitosa, en animales que han sufrido un daño cerebral traumático [6] y en la isquemia estriatal para reducir el déficit motor que aparece después del daño [7]. Más recientemente se ha realizado el trasplante de CMO autóloga para revertir el déficit cognitivo observado en un modelo animal de enfermedad de Huntington [8].

El objetivo de esta investigación consistió en realizar la titulación de diferentes anticuerpos capaces de detectar proteínas en la membrana de las células mononucleares (CD34; CD38; CD45 y CD90). Ello permitió determinar la dilución de trabajo más eficaz para cada uno de estos anticuerpos y al mismo tiempo caracterizar las células obtenidas a partir de la médula ósea de ratas. Para el Centro de Restauración Neurológica este estudio reviste gran importancia, ya que al conocer las características inmunofenotípicas de estas

células se aportan datos de interés relacionados con su estadio de diferenciación y su potencialidad para el empleo en protocolos de trabajo que las incluyan en sus diseños de tratamiento.

## Materiales y métodos

Como sujetos experimentales, se utilizaron ratas de la línea Sprague Dawley (SD), con un peso corporal entre 250 y 300 g (CENPALAB, La Habana, Cuba). Se distribuyeron 5 animales por caja, con acceso libre al agua y al alimento y con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, hasta que fueron sacrificadas para el estudio inmunocitoquímico [9]. Se incluyeron todos los animales que no mostraron signos de infección o lesión de algún tipo ni en la cara ni en las extremidades, así como los que no mostraron falta de pelaje u otra alteración que indicara que no era una rata normal. El tamaño de la muestra fue de n=20.

## Obtención de células mononucleadas de la médula ósea de rata

Se anesteciaron las ratas SD machos por vía intraperitoneal con hidrato de cloro al 7% (0.6 mg/kg de peso corporal). Se le realizó un corte de la piel en las patas traseras, decolando el tejido paralelo al hueso y se les extrajo ambos fémur. Durante 30 minutos, el hueso extraído se colocó en una placa de Petri con solución salina fisiológica al 0.9%. La médula ósea se obtuvo pasando PBS estéril (NaCl, 8 g/L; KCl, 0.2 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.09 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.26 g/L, pH 7.2) con una

1. Prockop DJ. Marrow stromal cell as stem cell for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:7-4.
2. Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cell *in vitro*. *Exp Neurol* 2000;164:247-56.
3. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364-70.
4. Brazelton TR, Fabio M, Rossi V, Keshet GL, Blau HM. From marrow to brain: Expression of Neuronal Phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-79.
5. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-82.
6. Mahmood A, Lu D, Yi L, Chen JL, Chopp M. Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *J Neurosurg* 2001;94:589-95.
7. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene D, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002;174:11-20.

✉ Autor de correspondencia

jeringuilla a través de una de las epífisis del fémur. Las células de la médula ósea se recogieron en tubos estériles para su posterior lavado por centrifugación [10].

#### Aislamiento de las células mononucleadas de la médula ósea de ratas

Las células de la médula ósea que estaban en suspensión, se lavaron con PBS 1 X, 3 veces durante 10 minutos a 2 000 rpm a 20 °C. Se colocaron 2.5 mL de Ficoll-Hypaque en un tubo de cristal graduado y se depositaron 5 mL de la mezcla PBS-células en suspensión, dejándolos caer por las paredes del tubo de forma cuidadosa. Se centrifugó durante 45 minutos a 2800 rpm, a una temperatura de 20 °C. Se extrajo la capa de células mononucleadas, succionando con una pipeta, y seguidamente se lavaron. El sobrenadante se desechó en un recipiente con hipoclorito y el sedimento celular se resuspendió en PBS 1X [11].

#### Técnica inmunocitoquímica

El ensayo inmunocitoquímico empleado en este estudio permitió detectar, de manera específica, las proteínas de superficie celular. Se utilizó un formato en el cual las láminas de 12 pocillos se recubrieron con las células mononucleadas a las cuales se unió el anticuerpo monoclonal específico contra una de las proteínas en estudio CD34, CD38, CD45 y CD90. Después del lavado, se detectó la cantidad de anticuerpo monoclonal unido específicamente con el empleo de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con biotina, que actuó como reactante secundario. Este procedimiento permitió la entrada de la avidina amplificando la respuesta del sistema cuando se le añadió el sustrato cromogénico. La lectura se realizó mediante un microscopio de luz [12].

Tanto la titulación de los anticuerpos como la caracterización de las células de la médula ósea se realizaron por medio del método inmunocitoquímico anteriormente descrito. Ambos estudios incluyeron la utilización de un control negativo.

#### Resultados y discusión

La tabla 1 muestra el resultado de la titulación a los anticuerpos tipificadores. Para cada uno se ensayaron cuatro diluciones seriadas, y finalmente se seleccionó una para la cual se pudo demostrar que era posible la detección inmunofenotípica de la molécula de superficie celular. El marcador CD34 fue positivo a una dilución de 1:40; el CD38, a una dilución de 1:200; el CD45, a una dilución de 1:50 y el CD90, a una dilución de 1:20.

En la tabla 2 se muestran dos de las principales características de los anticuerpos utilizados, así como la dilución de trabajo propuesta por el fabricante y la optimizada por el laboratorio. Para los anticuerpos CD34, CD38, CD45 y CD90 se logró una dilución mayor que la propuesta por el fabricante, lo cual per-

Tabla 2. Características de los anticuerpos tipificadores.

AcMo	Subclase	Marcadores	Dilución de trabajo (recomendada por el fabricante)	Dilución de trabajo (optimizada en el laboratorio)
CD34	IgG1	Células estromales y hematopoyéticas	1:5	1:40
CD38	IgG1	Hematopoyéticas	1:100	1:200
CD45	IgG2	Hematopoyéticas	1:25	1:50
CD90	IgG1	Estromales	1:10	1:20

mitió caracterizar a las células mononucleares de la médula ósea de las ratas.

Para la caracterización de esa población celular, se extrajeron los fémur de las ratas SD (n=20), y se determinó el porcentaje de células positivas para los marcadores CD34; CD38; CD45 y CD90 por un método inmunocitoquímico. Para cada caso se utilizó el correspondiente control negativo (Figura 1 A, B, C, D y E).

8. Lescaudron L. Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of Huntington's Disease: Behavioral and morphological outcomes Intern. J Neurosci 2003;113:945-56.

9. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care 1984;Vol. 2.

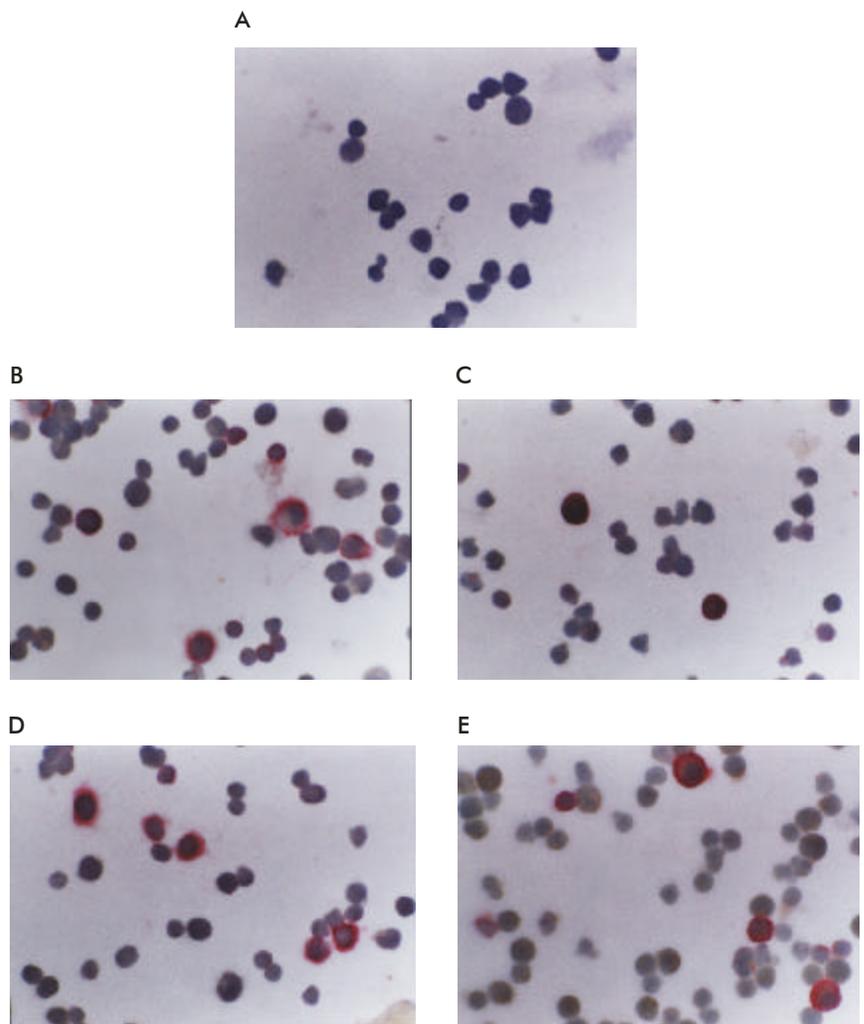


Figura 1. Células mononucleadas caracterizadas. A) Control negativo; B) Células de médula ósea positivas al marcador CD34, dilución 1:40; C) Células de médula ósea positivas al marcador CD38, dilución 1:200; D) Células de médula ósea positivas al marcador CD45, dilución 1:50 y E) Células de médula ósea positivas al marcador CD90, dilución 1:20.

Tabla 1. Diluciones de trabajo para cada uno de los anticuerpos monoclonales (AcMo).

CD34	1:5	1:10	1:20	1:40*
CD38	1:100	1:200*	1:400	1:800
CD45	1:25	1:50*	1:100	1:200
CD90	1:10	1:20*	1:40	1:80

\*Dilución de trabajo óptima para el anticuerpo específico.

La figura 2 muestra la media del porcentaje de células positivas para cada uno de los antígenos de superficie celular, e indica la contribución de cada marcador al porcentaje general de la caracterización: CD34 = 19.33%; CD38 = 20.80%, CD45 = 17.27% y CD90 = 23.52%. Los resultados sugieren que las células presentan una baja expresión de estos marcadores.

Habitualmente se han empleado estos marcadores de superficie celular para la identificación de células en etapas tempranas, pero estudios más abarcadores han mostrado que el inmunofenotipo de las células obtenidas de esta fuente, es mucho más complejo, ya que pueden expresar un espectro de marcadores más amplio que está sujeto al estado de diferenciación celular [13, 14]. Ese resultado apoya los bajos porcentajes de expresión de estos marcadores celulares en este estudio, teniendo en cuenta que, durante la diferenciación de estas células, los antígenos de superficie celular aparecen y desaparecen en un momento determinado del desarrollo evolutivo de la célula.

En la subpoblación de células hematopoyéticas, el marcador CD34, así como el CD38 y el CD45, poseen inmunofenotipo característico de esta población, ya que constituyen marcadores de linaje celular [15, 16].

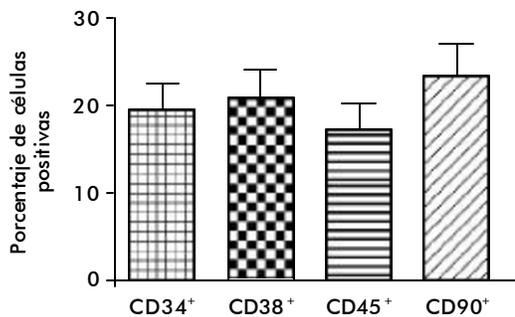


Figura 2. Media del porcentaje de células positivas para los marcadores CD34, CD38, CD45 y CD90.

En la subpoblación de células mesenquimales que forman parte del repertorio de las células de la médula ósea, las cuales también se han denominado células madre estromales, se ha identificado otro antígeno de superficie válido para su caracterización, el CD90 [13, 17]. Este fue detectado de manera satisfactoria en las células del presente estudio, y aportó también un porcentaje en la identificación de ellas como el resto de los antígenos.

Hace varias décadas se consideró que entre las células madre adultas de la médula ósea, solo un tipo conservaba la capacidad regenerativa. Sin embargo, hoy se sabe que la composición de la médula ósea es más compleja, ya que se ha identificado un grupo heterogéneo de células madre adultas que incluyen, además de las hematopoyéticas y mesenquimales mencionadas, la denominada población lateral [18] y las células progenitoras adultas multipotentes [19].

El presente estudio apoya el concepto actual de la heterogeneidad de las poblaciones de células madre adultas que forman la médula ósea, pues la identificación de los antígenos CD34; CD38; CD45 y CD90 fue posible en todos los casos, y estos representan subclases de poblaciones existentes en la médula ósea en diferentes estadios de diferenciación.

## Conclusiones

1. La población estudiada era CD34; CD38; CD45 y CD90, positivas para las diferentes diluciones de trabajo que se utilizaron.

2. Para cada anticuerpo se obtuvo una dilución de trabajo, en la cual era posible la caracterización de las células de manera similar a la de la dilución sugerida por el fabricante.

3. Este estudio permitió conocer la contribución diferencial aportada por cada uno de los marcadores celulares al porcentaje general de las células inmunofenotípicamente caracterizadas.

4. Los resultados de esta investigación contribuyen al ahorro económico de nuestro país, si tenemos en cuenta que con la optimización de la dilución de trabajo del anticuerpo se disminuye la cantidad de reactivo a utilizar.

10. Amador A, García R, Serrano T, Blanco L, Martínez L, Mendoza Y, *et al.* Evaluación de la supervivencia de las células mononucleadas en un modelo de ratas con lesión estriatal por ácido quinolinico. *Rev Neurol* 2005;40(9):518-22.

11. Böyum A. Separation of Leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:77-84.

12. Kranz BR, Thierfelders S. Improved detection of terminal transferase (TdT): the use of detergents on glutaraldehyde fixed comdehyde cells prevents denaturation and diffusion artefacts. *Leuk Res* 1986;10:1041-49.

13. Prosper f, Verfaillie CM. Células madre adultas. *An Sist Sanit Navar* 2003;26:345-56.

14. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments and trans-differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.

15. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: Hype and reality. *Hematol* 2002;1:369-91.

16. Langman J. Embriología Médica. Ciudad de La Habana: Pueblo y Educación, 1997; 21-32.

17. Haynesworth S, Baber M, Caplan A. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cell, are detected by monoclonal antibodies. *Bone Marrow Transplant* 1992;13:69-80.

18. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from post natal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30:896-904.

19. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Porada CD, Ogawa M. Engraftment and multilineage expression of human bone marrow CD34- cell *in vivo*. *Ann NY Acad Sci* 1999;872:220-31.