

EL TGF-BETA 3 INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS STEM MESENUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HACIA CÉLULAS DEL NÚCLEO PULPOSO DEL DISCO INTERVERTEBRAL

I.F. Graciani^a, F.M. Sánchez-Guijo^a, M.V. Barbado^c, E.M. Villarón^a, N. López-Holgado^a, E. Oterino^a, S. Carrancio^a, L.I. Sánchez Abarca^a, M. Díez Campelo^a, J.A. Pérez-Simón^a, J.F. San Miguel^a, J.G. Briñón^c, J.F. Blanco^b, M.C. del Cañizo^a

^a Servicio de Hematología Hospital Universitario de Salamanca. ^b Servicio de Traumatología Hospital Universitario de Salamanca. ^c Departamento de Biología Celular y Patología. Universidad de Salamanca

Introducción: Las actuales medidas terapéuticas utilizadas en la patología degenerativa del disco intervertebral (DIV), problema socio-sanitario de primer orden, son ineficaces para detener o revertir el proceso degenerativo. En los últimos años se ha descrito la gran capacidad de diferenciación in vitro de las células stem mesenquimales (CSM) hacia múltiples tipos celulares mesodérmicos. El TGF- β 3 es un factor importante en el desarrollo embrionario de la estructura intervertebral, por lo que podría jugar un papel en la inducción de la diferenciación de las CSM hacia células del núcleo pulposo (NP). En el presente trabajo nos hemos planteado explorar la capacidad de diferenciación de las CSM hacia células del NP tras inducción con un medio enriquecido en TGF- β 3.

Material y métodos: Para ello, se aislaron CSM a partir de células mononucleadas de médula ósea obtenida de donantes sanos (n=5). Las CSM fueron expandidas en condiciones estándar en cultivo con DMEM + 10% de suero bovino fetal en atmósfera a 37°C con 5% CO₂. Tras el cuarto pase, se comprobó la pureza del cultivo (que fue > 95% en todos los casos) mediante citometría de flujo de acuerdo con el panel de consenso de la International Society for Cellular Therapy. Para la inducción de la diferenciación se empleó un medio enriquecido en TGF- β 3 durante 3 semanas, y utilizando como control las mismas CSM inducidas a diferenciarse a cartílago hialino (empleando un medio comercial estándar (NH ChondroDiff®, de Miltenyi Biotec) y las mismas CSM en medio de expansión. Transcurridas 24-48 horas del inicio de la diferenciación las células se agregan espontáneamente formando estructuras esféricas de aproximadamente 1 mm de diámetro. Los cultivos se mantuvieron durante 21 días, tras los cuales se procedió a la fijación de las muestras con paraformaldehído y a su inclusión en parafina. El análisis histológico se realizó mediante tinción con hematoxilina-eosina y Safranina-O. Además se realizó estudio inmunohistoquímico con anticuerpos frente a colágeno tipo I, colágeno tipo II y agrecano.

Resultados: Las tinciones con hematoxilina-eosina y Safranina-O de los cultivos de CSM tratadas con TGF- β 3 mostraron en todos los casos la formación de estructuras esféricas con una capa externa formada por fibras de colágeno (tanto tipo I como II) y una región interna acúmulos celulares con menor presencia de colágeno (fundamentalmente tipo II). Estas características son propias de la estructura del núcleo pulposo. Además, las CSM tratadas con TGF- β 3 fueron débilmente positivas para agrecano, a diferencia de las células diferenciadas a cartílago (agrecano positivas ++).

Conclusión: Las CSM diferenciadas in vitro con un medio enriquecido en TGF- β 3 adquieren propiedades histológicas e inmunofenotípicas similares a las células del NP del disco intervertebral.