

estado de senescencia o bien pueden estar generando resistencia a este estadio.

Abstract

Study of mesenchymal stem cells (MSCs) is essential to provide information leading to new therapies for the regeneration of damaged tissues. The aim of this study was to isolate and characterize the life cycle of cultured stem cells and compare results between cells of early and late passages using estimates of senescence such as life cycle graph, quantification of lactate, senescence-associated activity of the enzyme β -galactosidase, changes in mitochondrial membrane potential and Hoechst staining, to determine in what cell age are they. Results in the life cycle graph showed that these have not yet reached a state of senescence. However, their morphology and granularity showed changes with time, whereas in the quantification of lactate was detected only lactate concentration in cells showing later passages a value of 61.2 μ M. β -GAL activity increased in late passage cells almost 10 times more than in early passage cells, whereas in the analysis of changes in mitochondrial membrane potential of MSCs in early passages were worth nearly 30 fluorescence green / red while later passages showed a fluorescence ratio of these 26. On the other side in Hoechst staining there were no differences between the clumps in the DNA by cells of early and late passages. Results of this study demonstrate that MSCs have not reached the stage of senescence or could be that they are making resistance to this stage.

**Caracterización del ciclo de vida de un cultivo de células madre mesenquimales (MSCs)
aisladas de lipoaspirado y determinación de sus cambios fisiológicos asociados a senescencia**

Autor:

Juan Pablo Cortés Tique

Pontificia Universidad Javeriana.

Carrera 7 N° 40-62.

Tel: (571) 3208320.

Bogotá D.C. 2011

**Caracterización del ciclo de vida de un cultivo de células madre mesenquimales (MSCs)
aisladas de lipoaspirado y determinación de sus cambios fisiológicos asociados a senescencia**

Autor:

Juan Pablo Cortés Tique

Ingrid Schuler Ph. D

Bióloga

Decana académica

Janeth Arias Palacios M. Sc. M. Ed

Bacterióloga

Directora de carrera

**Caracterización del ciclo de vida de un cultivo de células madre mesenquimales (MSCs)
aisladas de lipoaspirado y determinación de sus cambios fisiológicos asociados a senescencia**

Autor:

Juan Pablo Cortés Tique

Bernd R. Stab II Ph. D

Bioquímico

Director de tesis

Sonia Luz Albarracín Cordero M. Sc. Ph. D

Licenciada en Biología

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la resolución N° 13 de

Julio de 1946

Tabla de contenido

	Pág
Resumen	
Abstract	
Introducción.....	1
Marco teórico.....	2
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Materiales y métodos.....	4
1. Aislamiento y cultivo de MSCs derivadas de tejido adiposo.....	4
2. Cuantificación de poblaciones celulares y duplicación de MSCs...5	
2.1 Congelamiento de MSCs.....	5
3. Cuantificación de lactato.....	6
4. Senescencia asociada a actividad β -galactosidasa.....	6
5. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial.....	6
6. Fragmentación nuclear.....	7
Resultados.....	7
1. Aislamiento de MSCs, caracterización del cultivo celular y determinación de las duplicaciones de población.....	7
2. Cuantificación de poblaciones celulares, duplicación de población, y ciclo de vida.....	8
3. Cuantificación de lactato.....	9

4. Senescencia asociada a actividad de β -GAL.....	11
5. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial.....	12
6. Tinción de Hoechst.....	13
Discusión.....	15
1. Cuantificación de poblaciones celulares, duplicación de población, y ciclo de vida.....	15
2. Cuantificación de lactato.....	16
3. Senescencia asociada a actividad de β -GAL.....	16
4. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial.....	17
5. Tinción de Hoechst.....	18
Conclusiones y recomendaciones.....	18
Bibliografía.....	18

Índice de figuras

Figura 1. Foto de microscopia óptica de luz en aumento 40X del cultivo de MSCs aisladas de lipoaspirado. Células de pase 0.....	8
Figura 2. Número de duplicaciones de población al cabo de 51 días de cultivo.....	9
Figura 3. Curva patrón de lactato en condiciones de pH 9,8 de buffer hidracina sulfato después de 15 minutos de incubación.....	10
Figura 4. Curva patrón de lactato en condiciones de pH 9,6 de buffer hidracina sulfato después de 10 minutos de incubación.....	10
Figura 5. Concentraciones de lactato tanto para MSCs de pases tempranos como para aquellas de pases tardíos.....	11
Figura 6. Actividad β-galactosidasa en las muestras de MSCs de pases tempranos y tardíos.....	11
Figura 7. Cambios en el potencial de membrana entre células de pases temprano y tardíos.....	12
Figura 8. Granularidad correspondiente a MSCs de pases tempranos y tardíos.....	13
Figura 9. A. Tinción múltiple de Hoechst de MSCs de pases tempranos en microscopio confocal olympus ix 81 en un aumento de 20X.....	13
Figura 9. B. Tinción múltiple de Hoechst de MSCs de pases tardíos en microscopio confocal olympus ix 81 en un aumento de 20X.....	14
Figura 9. C. Tinción de Hoechst para una MSC de pase temprano en microscopio confocal olympus ix 81 en un aumento de 20X y zoom 11... 	14
Figura 9. D. Tinción de Hoechst para una MSC de pase tardío en microscopio confocal olympus ix 81 en un aumento de 20X y zoom 11... 	15

Abstract

Study of mesenchymal stem cells (MSCs) is essential to provide information leading to new therapies for the regeneration of damaged tissues. The aim of this study was to isolate and characterize the life cycle of cultured stem cells and compare results between cells of early and late passages using estimates of senescence such as life cycle graph, quantification of lactate, senescence-associated activity of the enzyme β -galactosidase, changes in mitochondrial membrane potential and Hoechst staining, to determine in what cell age are they. Results in the life cycle graph showed that these have not yet reached a state of senescence. However, their morphology and granularity showed changes with time, whereas in the quantification of lactate was detected only lactate concentration in cells showing later passages a value of $61.2 \mu\text{M}$. β -GAL activity increased in late passage cells almost 10 times more than in early passage cells, whereas in the analysis of changes in mitochondrial membrane potential of MSCs in early passages were worth nearly 30 fluorescence green / red while later passages showed a fluorescence ratio of these 26. On the other side in Hoechst staining there were no differences between the clumps in the DNA by cells of early and late passages. Results of this study demonstrate that MSCs have not reached the stage of senescence or could be that they are making resistance to this stage.

Resumen

El estudio de las células madre mesenquimales (mesenchymal stem cells ó MSCs) es fundamental para poder proveer información que lleve a nuevas terapias para la regeneración de tejidos dañados. El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar el ciclo de vida de un cultivo de células madre y comparar resultados entre células de pases tempranos y pases tardíos usando diferentes estimadores de senescencia tales como ciclo de vida: cuantificación de lactato, actividad de la enzima β -galactosidasa, cambios en el potencial de membrana mitocondrial y fragmentación nuclear. Lo anterior para determinar en qué fase del ciclo celular se encuentran las MSCs. Los resultados de ciclo de vida sugieren que estas aún no han llegado al estado de senescencia. Sin embargo, su morfología y granularidad mostraron cambios con el tiempo, y la cuantificación de lactato solo fue detectada en células de pases tardíos mostrando un valor de $61,2\mu\text{M}$. Adicionalmente, la actividad β -GAL se incrementó en las células de pases tardíos casi 10 veces más que en las células de pases tempranos, y el análisis de cambios de potencial de membrana mitocondrial las MSCs de pases tempranos obtuvieron un valor de casi 30 de fluorescencia verde/roja mientras que las de pases tardíos mostrando una relación de estas fluorescencias de 26. No se encontraron diferencias entre las aglutinaciones en el DNA por parte de las células de pases tardíos y tempranos. Estos resultados demuestran que las MSCs de este estudio no han llegado al estado de senescencia o bien pueden estar generando resistencia a este estado.

Introducción

Las células madres mesenquimales (MSC) aisladas de tejido adiposo han sido utilizadas muy ampliamente para el tratamiento de enfermedades y reconstrucción de tejidos dañados, ya que siendo células multipotentes pueden diferenciarse en ciertos linajes celulares como osteocitos, condrocitos, adipocitos y miocitos, sin embargo también se ha revelado que poseen la habilidad de generar células que no son de origen mesodérmico como hepatocitos y neuronas. Esta capacidad de reconstrucción de tejidos se ha demostrado que también hace parte de procesos de secreción de factores de crecimiento que alteran el microambiente de tejidos enfermos y heridos, lo cual promueve la proliferación celular en estos [1-3].

Los cultivos de MSCs guardan algunas características similares a las de cualquier cultivo de células somáticas cultivadas *in vitro*, así, luego de un número determinado de divisiones celulares, las células entran en estado de senescencia para luego detener por completo su proliferación lo cual limita bastante la aplicación terapéutica que se le pueden dar a las MSCs que se cultivan *in vitro*. Los procesos que se han visto involucrados en la generación de senescencia replicativa son de acortamiento progresivo y modificación estructural de telómeros, y el daño del DNA por muchas causas entre las cuales destacan la acumulación de inhibidor quinasa ciclo dependiente p16INK4a y estrés oxidativo. MSCs cultivadas *in vitro* con bajos contenidos de suero y suplementadas con factores de crecimiento, se ha visto que presentan una proliferación relativamente rápida por 43 a 77 días, mientras que aquellas que son suplementadas con 10% de suero prolongaron su tiempo de proliferación de 74 a 104 días lo cual se aproxima de 7 a 9 duplicaciones de población (PD) haciendo pases al 70% de confluencia [3].

El interés de estudiar las características y los cambios fisiológicos de las MSCs a través del tiempo en cultivos *in vitro* es para conocer su capacidad replicativa y de diferenciación celular con el ánimo de usarlas en terapias para la regeneración de tejidos e ingeniería de tejidos; así como conocer si existen diferencias entre parámetros asociados a la senescencia entre cultivos de MSCs jóvenes, viejas y senescentes para que en estudios posteriores se pueda determinar la edad de las células (jóvenes, viejas o senescentes) de acuerdo con los resultados de los parámetros evaluados en este estudio.

Marco teórico

El concepto de envejecimiento hace referencia a los cambios que ocurren a través tiempo en los animales, los cuales se asocian al incremento en la vulnerabilidad de los organismos a ser afectados por enfermedades y condiciones adversas generadas por el ambiente, disminución de la movilidad y agilidad, entre otros [4]. El envejecimiento atribuido a las células madre ó SCs (del inglés Stem Cells) consiste en el hecho de que este tipo de células son las responsables de la regeneración de tejidos después de alguna lesión y del control homeostático que los tejidos u órganos puedan llegar a tener. Sin embargo, no se ha dilucidado si bien este fenómeno de pérdida de la capacidad regenerativa se debe, al envejecimiento de las SC o la incapacidad de desarrollar sus funciones por causa del ambiente proporcionado dentro de un tejido viejo [5,6].

El envejecimiento en todo tipo de células es un proceso que suele estar acompañado por una incidencia de eventos mutagénicos atribuida al daño que sufre el DNA. Estos daños se pueden dar como consecuencia de ataques por parte de especies reactivas de oxígeno ó ROS (del inglés Reactive Oxygen Species), desgaste de telómeros, errores en la replicación, radiación UV, entre otros. A pesar de que existen sistemas de reparación del DNA, estos no son perfectos y pueden presentarse ciertas alteraciones en la integridad genómica que no son detectadas por dichos mecanismos de reparación y por ende suelen acumularse con el paso del tiempo generando células cancerígenas. Las SC que se caracterizan por poseer un ciclo de vida duradero, pueden acumular tantos eventos como para la generación de tumores malignos gracias a que las células progenitoras que cuentan con las mutaciones, pasaran dicha característica a su descendencia; es por esto que las SC se consideran un punto crítico en la generación de cáncer gracias a su longevidad, sin embargo se sugiere que existen diferentes mecanismos que constan de proteínas supresoras de tumores [7] los cuales detienen el ciclo celular o inducen apoptosis, a pesar de ello, cabe destacar que la demanda de células progenitoras es tal en todos los tejidos que las rutas de supresión tumoral desgastan las SC generando en ellas envejecimiento [5].

El envejecimiento puede llevar a las células a la detención del ciclo celular siendo este un fenómeno irreversible, generando así lo que se conoce como senescencia replicativa en la cual las células no pueden dividirse mas ya que han llegado al límite de su capacidad de replicativa. Por lo tanto se ha sugerido que este mecanismo es programado como consecuencia del acortamiento de telómeros y la ausencia de telomerasa la cual está asociada a condiciones de estrés [7].

Las MSCs tienen la capacidad de diferenciarse bajo condiciones *in vitro* en múltiples tipos de células dependiendo del estímulo, principalmente en

osteocitos, adipocitos, condrocitos, miocitos y células neuronales [3]. Las MSCs fueron aisladas de medula por primera vez por Friedstein hace 40 años y gracias a estudios posteriores se han logrado aislar de otros tejidos e incluso usarlas como base de tratamientos terapéuticos para la regeneración de estos, sin embargo su potencial terapéutico está siendo investigado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes [8,9]. Estas células son apropiadas para estudios tanto de tratamientos terapéuticos como de envejecimiento celular gracias a su potencial de diferenciación en diferentes linajes celulares y la facilidad con la que pueden ser aisladas, por lo cual en este estudio se llevaron a cabo los ensayos con este tipo de células madre.

A pesar de que las MSCs tienen un gran potencial en el campo de ingeniería y reconstrucción de tejidos, estas células en estado de vejez sufren una pérdida de su capacidad proliferativa y de diferenciación cuando son cultivadas *in vitro* por lo que incluso se ha demostrado que pueden llegar a estado de senescencia replicativa al igual que cualquier otra célula somática, limitando su potencial terapéutico. Al entrar en estado de senescencia, las MSCs muestran una morfología irregular y bastante grande [3,10].

En cultivos *in vitro* de MSCs no se ha llevado a cabo la cuantificación de lactato en diferentes edades para determinar si existe alguna diferencia en este parámetro el cual podría estar asociado al envejecimiento o senescencia. Por otro lado, se ha reportado que la producción de lactato por parte de las MSCs incrementa de una manera directamente proporcional a la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo y también dependiendo de las tensiones de oxígeno que se manejan en él, ya que las dos principales rutas de obtención de energía química por parte de las células consisten en el ingreso de una molécula de piruvato para la fermentación láctica en condiciones de anaerobiosis o bien, puede ingresar en forma de Acetil-CoA al ciclo de ácidos tricarboxílicos. Sin embargo, existe evidencia que soporta que a altas concentraciones de suero y glucosa como lo son 10% y 4500 mg/L respectivamente se induce un ambiente anaerobio propicio para la producción de lactato [11]. Se ha reportado que la producción de lactato es del orden de $2,48 \times 10^{-1}$ a $7,67 \times 10^{-1}$ pmol/cell/h incubando de 17 a 32 horas calculado por modelos matemáticos considerando balances de materiales [12].

Por otro lado, la actividad de la enzima pH6 β -galactosidasa (β -GAL) ha sido asociada con la senescencia de MSCs de ratón y humanas, e incluso fibroblastos senescentes, por lo que está establecida como marcador molecular de envejecimiento. Aunque no se comprende muy bien la razón por la que la actividad de β -GAL incrementa en los últimos pases de los cultivos celulares, se ha reportado que no existe diferencia en la actividad de esta enzima en donadores de MSCs de diferentes edades, sin embargo se sugiere que esta actividad está asociada a la ruta RAS y a la disfunción de los lisosomas [13].

Siendo entonces, el interés de estudiar las características y los cambios fisiológicos de las MSCs a través del tiempo en cultivos *in vitro* para prolongar su capacidad replicativa y de diferenciación celular con el ánimo de usarlas en terapias para la regeneración de tejidos e ingeniería de tejidos, es necesario conocer si existen diferencias entre parámetros asociados a la senescencia entre cultivos de MSCs jóvenes, viejas y senescentes para que en estudios posteriores se pueda determinar la edad de las células (jóvenes, viejas o senescentes) de acuerdo con los resultados de los parámetros evaluados en este estudio.

Objetivo general

- Caracterizar proceso de envejecimiento y/o senescencia de MSCs en un cultivo celular

Objetivos específicos

- Aislar y cultivar MSCs derivadas de lipoaspirado humano.
- Caracterizar el ciclo de vida de las MSCs en un cultivo celular y verificar su senescencia.

Materiales y métodos

1. Aislamiento y cultivo de MSCs derivadas de tejido adiposo

Utilizando tejido adiposo proveniente de lipoaspirado de un paciente de 45 años, previo consentimiento informado, se realizó el siguiente protocolo de extracción de MSCs para una muestra de 100ml de volumen de lipoaspirado: Se eliminó la sangre presente en la muestra para después realizar 3 lavados adicionando PBS 1X suplementado con solución de antibióticos 1X en relación 1:1. Luego se adicionaron 10ml de colagenasa tipo 1 10X. Se incubaron a 37°C por 1 hora verificando la digestión cada 5 minutos para luego adicionar medio DMEM suplementado con antibióticos y suero bovino fetal en relación 1:1. La solución obtenida se filtró sobre una maya de nylon con poros de 3mm aproximadamente, el filtrado obtenido se distribuyó en 50ml por tubo falcon. Se realizaron 3 centrifugaciones a 400 g por 10 minutos a 10°C de cada tubo falcon eliminando el sobrenadante después de cada centrifugación y luego resuspendiendo los pellets en 20ml de PBS 1X suplementado con antibióticos por cada falcon para volver a centrifugar. Para cada falcon se añadieron 16ml de medio DMEM suplementado con antibióticos y suero bovino fetal para resuspender el pellet final. A partir de cada falcon se retiraron los 16 ml de medio de manera que se crearon 2 placas de 75cm³ cada una con 8ml de medio con células.

Las placas de 75cm³ obtenidas a partir de lipoaspirado de una paciente de 45 años, se mantuvieron en 10 ml de medio DMEM con 10% de suero bovino fetal y 1% de solución de antibióticos 100x (penicilina 10000 U/ml, estreptomycin 10000µg/ml, anfotericina B 25µg/ml), a 37°C, humedad del 10%, dióxido de carbono al 5% y oxígeno al 20% hasta lograr una confluencia de mas o menos 80%, luego de lo cual se procedía a la tripsinización que se realizó de la siguiente manera:

Se retiró el medio de la placa para luego adicionar 5ml de PBS 1X. Se retiró el PBS y se adicionaron 2ml de tripsina 1X. Se incubó por 5 minutos a 37°C, luego se adicionaron 5ml de DMEM con suero fetal bovino y solución de antibióticos para inocular 2ml de la solución anterior (aproximadamente 1,6x10⁵ células) y se completan con DMEM con suero bovino fetal y solución de antibióticos hasta 10ml. Se incubaba por aproximadamente 13 días hasta alcanzar una confluencia del 80% para repetir el procedimiento.

2. Cuantificación de poblaciones celulares y duplicación de MSCs

Después de aproximadamente 13 días de incubación (80% de confluencia) luego de realizado el aislamiento se tripsinizaron las MSCs para generar 2 viales con células congeladas y eliminar 6ml de cultivo, propagando los restantes 2ml de cultivo completando a 10ml con medio y luego incubando a las condiciones anteriormente descritas. Cuando los cultivos poseían un 80% de confluencia se procedía a tripsinizarlo para hacer conteo celular y 2 viales congelados por placa para obtener 2 para cada edad celular. Para calcular la duplicación de las células se procedió con la formula:

$$PD = \text{Log} (N/N_i) 3,33$$

Donde Ni es la población de partida y N es la población final.

Para determinar el ciclo de vida las MSCs se realizó una figura relacionando los días de incubación con su respectivo tiempo de duplicación celular.

2.1 Congelamiento de MSCs

Se tripsinizaron las MSCs cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 80% para luego realizar el conteo celular en cámara de Neu Bauer con tripan azul con un factor de dilución ½ para después centrifugar el cultivo a 1500 rpm por 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 400 µl de solución de congelamiento (suero bovino fetal con 10%DMSO). Se realizaron 2 viales para congelar para cada edad celular de manera que se adicionan 200µl de la solución anterior a cada vial y se almacenan a -70°C. Después de pasadas 24 horas se almacenan en nitrógeno líquido.

3. Cuantificación de lactato

Se estandarizó la elaboración de una curva patrón usando concentraciones de 240, 120, 60 y 30 μ M de lactato usando un buffer hidracina sulfato 0,046M pH 9,8 y pH 9,6 leyendo a los 10, 15 y 20 minutos. A partir de cultivos de pase 1 y pase 8, correspondientes a células de pases tempranos y pases tardíos respectivamente, se tomaron 3 alícuotas de 1ml del medio de cada uno para realizar el siguiente protocolo: de cada muestra se tomaron 20 μ l, se mezclaron con 400 μ l de buffer hidracina sulfato 0,046M pH 9,8, se homogenizó en vortex para luego adicionar 20 μ l de NAD⁺ 120mM a la solución, se volvió a homogenizar en vortex y se incubó la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de esto se añadieron 20 μ l de lactato deshidrogenasa de músculo de ratón (LDH, calbiochem 427217) 1,65mg/ml (495U/ml), se incubó la solución a temperatura ambiente por 15 minutos y se leyó a 340nm.

4. Senescencia asociada a actividad β -galactosidasa

Para este ensayo se tripsinizaron células de pase 1 y pase 8 con 2ml de tripsina y 4ml de DMEM para inactivar la tripsina, tanto para células de pases tempranos como para aquellas de pases tardíos, seguidamente se centrifugaron a 1500g por 2 minutos para luego conservar en congelamiento a -80°C hasta realizar el ensayo, el conteo celular demostró que la cantidad de células en la muestra de 3ml de MSCs de pases tardíos fue de 200000 y 600000 para MSCs de pases tempranos. Este ensayo fue realizado como se describe en Biochemical Genetics: A laboratory manual [14]. Se tomaron 0,10ml de la muestra en tubos de 12x 75mm. Luego se añadieron 0,10ml del sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido 0,5mM en buffer acetato de sodio-acido acético 0,1M pH4 para incubar a 37°C por 20 minutos. la reacción fue después detenida adicionando 1,30ml de buffer glicina-carbonato 0,17M pH 9,8. El blanco utilizado fue constituido de solo sustrato y se procedió a leer a 360nm de fluorescencia. Esta reacción se basa en el clivaje del enlace β del sustrato para generar el compuesto 4-metilumbeliferona y galactosa. La 4-metilumbeliferona la cual es fluorescente, es excitable a una longitud de onda de 360nm. Se calculó la actividad del lisado de la siguiente manera:

Actividad del lisado= (fluorescencia de muestras o blanco) x 3/(mg de proteína x fluorescencia de 1nmol 4-MU).

5. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial

Se tomaron 3 placas de 25cm³, una de MSCs de pase 1 y otra de pase 8; la placa restante correspondía a MSCs de pase 1 como control. El protocolo a seguir fue el de MitoProbe™ JC-1 assay kit for flow cytometry: para cada muestra se resuspendió en 1ml de medio caliente, para el control se añadió 1 μ l de 50mM CCCP (el cual actúa como desacoplado de la membrana mitocondrial, permitiendo la entrada de iones H⁺ y del tinte dentro de la

membrana mitocondrial, sin restricción alguna) y se incubó por 5 minutos a 37°C. Se adicionaron a las muestras 10µl de JC-1 200µM el cual es un tinte que dentro del citosol se encuentra en estado monomérico y es detectable en fluorescencia verde, mientras que cuando se encuentra en la matriz mitocondrial se agrega para formar complejos detectables en fluorescencia roja. Luego se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 15 minutos, seguidamente se lavaron las MSCs con 2ml de PBS 1X y se añadió 1ml de tripsina para luego inactivar con 2ml de DMEM con 10% FBS. Se centrifugaron los cultivos a 800g por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. El análisis en citometría de flujo fue realizado leyendo a una longitud de onda de 488nm.

6. Tinción de Hoechst

Se procedió a eliminar el medio para lavar 2 veces con PBS 1X. Se trataron las células en una solución de Hoechst a una concentración de 5µg/ml, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Luego se eliminó el colorante y fueron lavadas con PBS 1X para, al final, ser analizadas por microscopía confocal.

Resultados

1. Aislamiento de MSCs, caracterización del cultivo celular y determinación de las duplicaciones de población

De la muestra de lipoaspirado se obtuvieron células con morfologías fibroblastoide, delgadas y tal como se ve en la figura 1. Dichas características son las correspondientes a las esperadas en un cultivo de MSCs de pase 0, es decir pases tempranos.

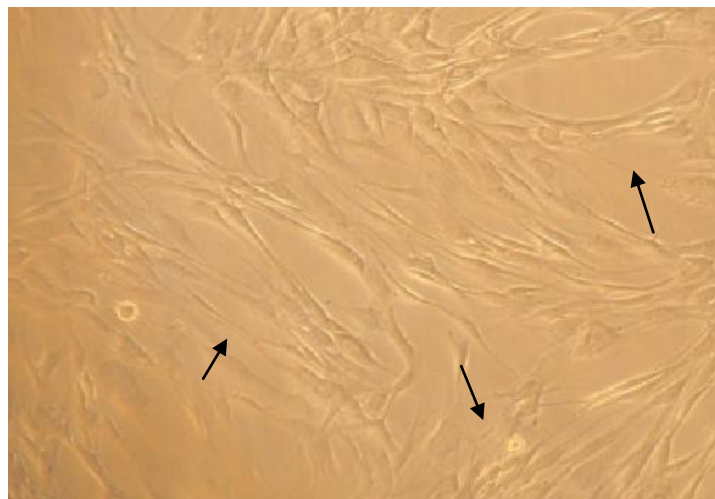


Figura 1. Foto de microscopía óptica de luz en aumento 40X del cultivo de MSCs aisladas de lipoaspirado. Las flechas indican MSCs de pase 0 cuya morfología se caracteriza por ser fibroblastoide, delgada y alargada.

2. Cuantificación de poblaciones celulares, duplicación de población, y ciclo de vida

El ciclo de vida se determina por la relación de un acumulado del número de duplicaciones de población en función del tiempo de cultivo. En la Figura 2 se puede observar que las MSCs obtuvieron aproximadamente 13 duplicaciones de población por parte del cultivo de MSCs al cabo de 51 días. Sin embargo, la figura no presenta ninguna fase estacionaria sino más bien lineal, por lo que se presume, las células no alcanzaron el estado de senescencia.

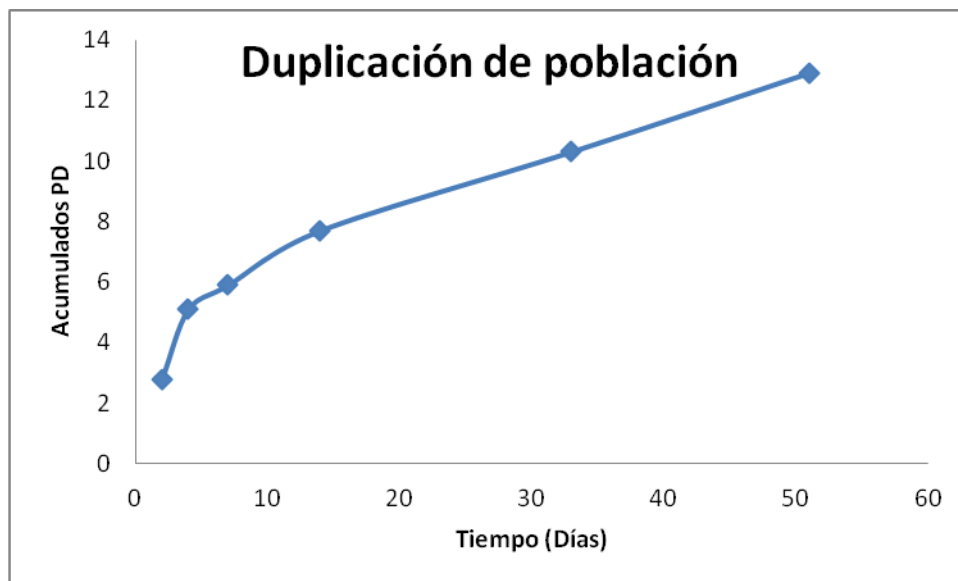


Figura 2. Gráfica de la duplicación de población al cabo de 51 días de cultivo. En esta se observa un comportamiento lineal por lo que se presume que las células en estas condiciones no alcanzaron la senescencia.

3. Cuantificación de lactato

Para la realización de la curva patrón de lactato se realizaron dos condiciones: una de pH 9,6 y otra de pH 9,8; cada una se sometió a tiempos de incubación de 10, 15 y 20 minutos. La figura 3 muestra los resultados de la curva con el mejor coeficiente de correlación obtenido, la cual se consiguió en condiciones de pH 9,8 del buffer hidracina sulfato después de 15 minutos de incubación ya que se consiguió un coeficiente de correlación de 0,97. Los datos obtenidos después de 10 y 20 minutos de incubación constaron de coeficientes de correlación de 0,9687 y 0,969 respectivamente para este mismo pH (datos no mostrados). Por otro lado, en la figura 4 se muestran los resultados de la curva con el mejor coeficiente de correlación para un pH de 9,6 del buffer hidracina sulfato después de 10 minutos de incubación contando con un coeficiente de correlación de 0,963; mientras que para los 15 y 20 minutos de incubación se obtuvieron coeficientes de 0,9626 y 0,9615 respectivamente para este mismo pH (datos no mostrados). Se procedió a usar la curva de calibración

correspondiente al buffer de pH 9,8 después de 15 minutos de incubación para calcular la concentración de lactato en las muestras.

En la figura 5 se pueden apreciar los resultados de las concentraciones de lactato obtenidas a partir de las replicas de los medios de MSCs en diferentes edades celulares. Los medios de las MSCs de pases tempranos no mostraron absorbancia alguna por lo que se presume que la producción de lactato no fue detectable; por otro lado la concentración de lactato obtenida a partir del medio de MSCs de pases tardíos fue de $60\mu\text{M}$ respectivamente con una desviación estándar de 16,5.

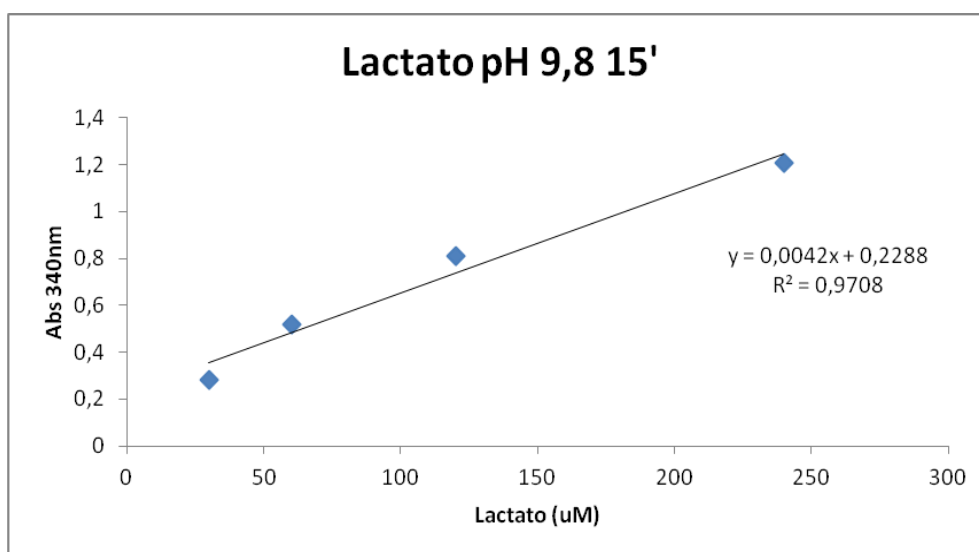


Figura 3. Gráfica de la Curva patrón de lactato en condiciones de pH 9,8 de buffer hidracina sulfato después de 15 minutos de incubación.

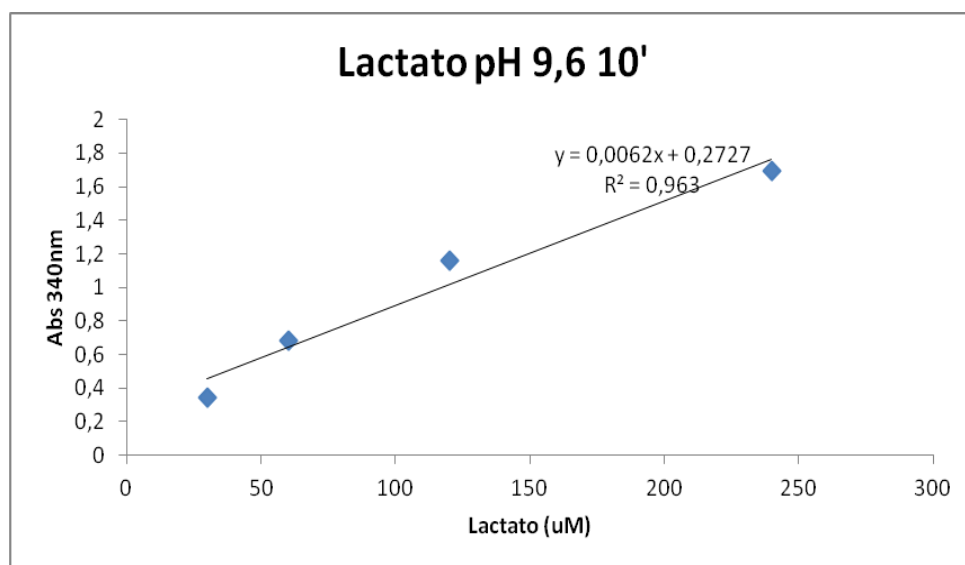


Figura 4. Gráfica de la Curva patrón de lactato en condiciones de pH 9,6 de buffer hidracina sulfato después de 10 minutos de incubación.

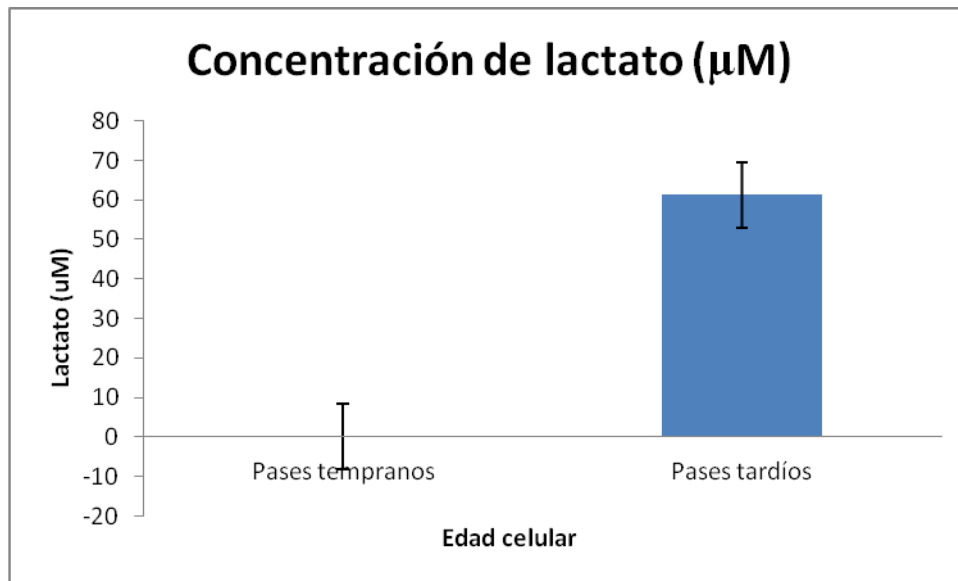


Figura 5. Gráfica de las Concentraciones de lactato tanto para MSCs de pases tempranos como para aquellas de pases tardíos.

4. Senescencia asociada a actividad de β -GAL

Los ensayos de actividad de la enzima β -galactosidasa demostraron que las MSCs de pases tardíos fue casi diez veces mayor que la actividad obtenida en las MSCs de pases tempranos con valores de 1021896 nmol/h/mg y 130493nmol/h/mg respectivamente como lo muestra la figura 6. Como se esperaba, la actividad β -GAL aumentó con el tiempo que se mantuvo el cultivo. Para este análisis solo se llevo a cabo una unidad experimental, ya que consta de un estudio preliminar por lo que no se cuenta con replicas con las que se pueda calcular la desviación estándar.

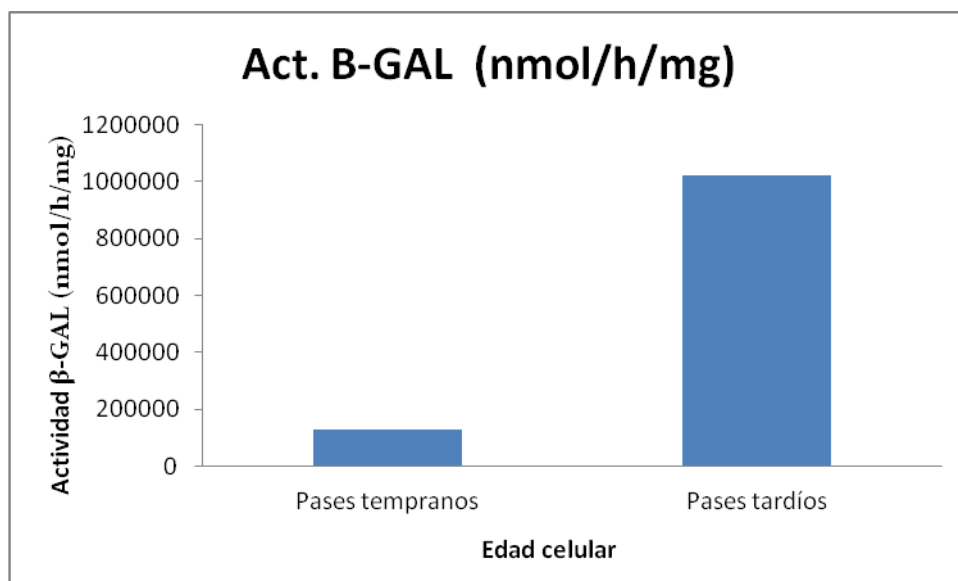


Figura 6. Gráfica de la Actividad β -galactosidasa en las muestras de MSCs de pases tempranos y tardíos.

5. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial

La figura 5 revela los cambios en el potencial de membrana de las MSCs en diferentes estadios celular; como se muestra en la figura, se presentó un potencial de membrana por parte de las MSCs de pases tempranos de una relación de 30 entre fluorescencia verde y fluorescencia roja, mientras que para las células de pases tardíos el potencial consistió de 26. Estos resultados fueron los esperados ya que. El incremento en el potencial de membrana se ha reportado que disminuye con el envejecimiento celular.

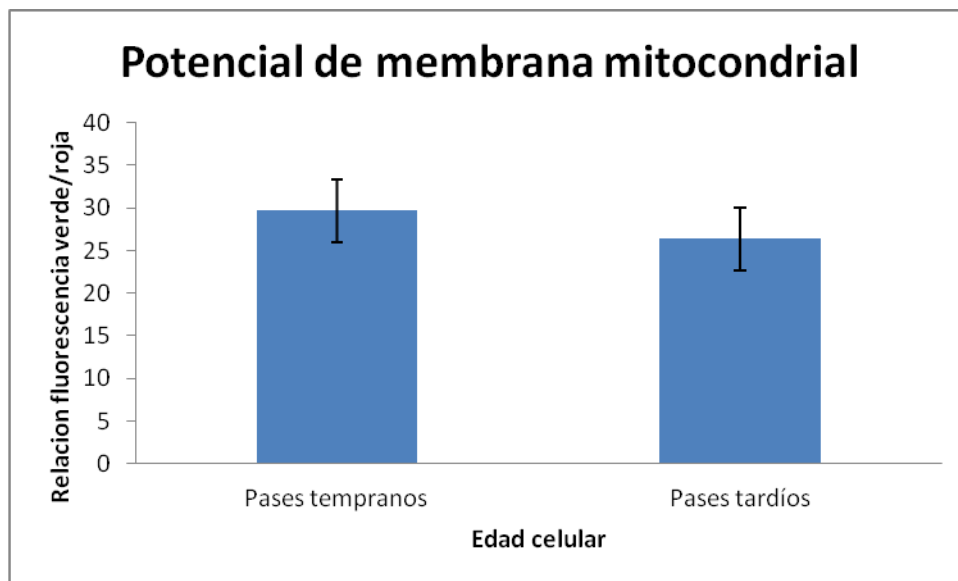


Figura 7. Gráfica de los Cambios en el potencial de membrana entre células de pases temprano y tardíos.

Por otro lado los resultados sobre el tamaño de las MSCs, donde las células de pases tempranos alcanzan un tamaño de menor, que las células de pases tardíos (datos no mostrados), lo cual concuerda con los resultados de las microscopias donde las células mostraron morfologías mas grandes e irregulares tal y como se esperaba.

Por ultimo, en la figura 8 se muestra la granularidad celular asociada tanto a las MSCs de pases tempranos como a las de pases tardíos donde estas ultimas mostraron un porcentaje de desviación de la luz en 90° del 290% mientras que las MSCs de pases tempranos mostraron este parámetro en un 260% aproximadamente. Estos resultados concuerdan con lo esperado ya que la granularidad está asociada a procesos de división mitótica que aumenta con el tiempo del cultivo.

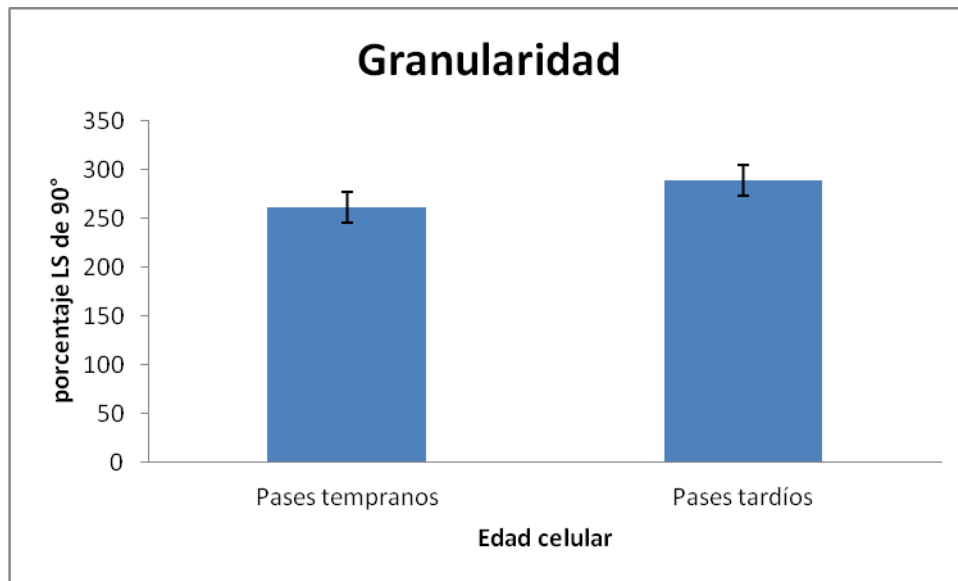


Figura 8. Gráfica de la Granularidad correspondiente a MSCs de pases tempranos y tardíos.

6. Fragmentación nuclear

La figura 9 muestra los resultados de tinción de Hoechst que demostraron la ausencia de *Mycoplasma* sp. por otro lado no existe diferencia en la aglutinación entre MSCs de pases tempranos y tardíos demostradas por la tinción tal y como se ve en la figura 9. Se esperaba que se evidenciara una diferencia entre dichas aglutinaciones del tinte dentro del DNA entre células de pases tempranos y tardíos.

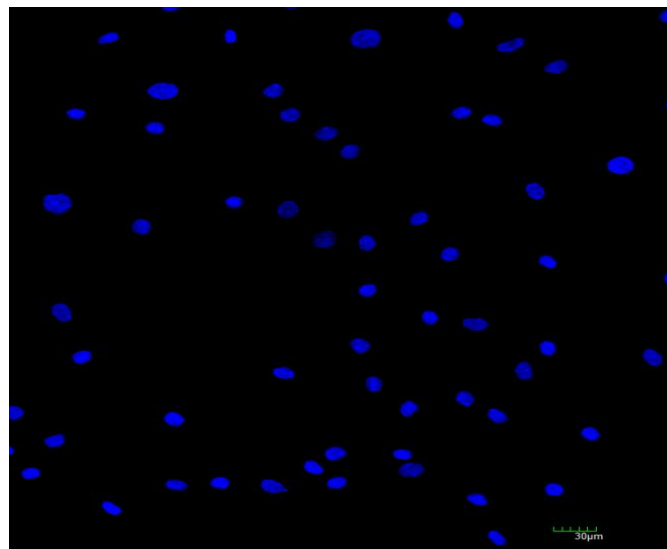


Figura 9. A. Tinción múltiple de Hoechst de MSCs de pases tempranos en microscopio confocal olympus ix 81 a escala de 30µm

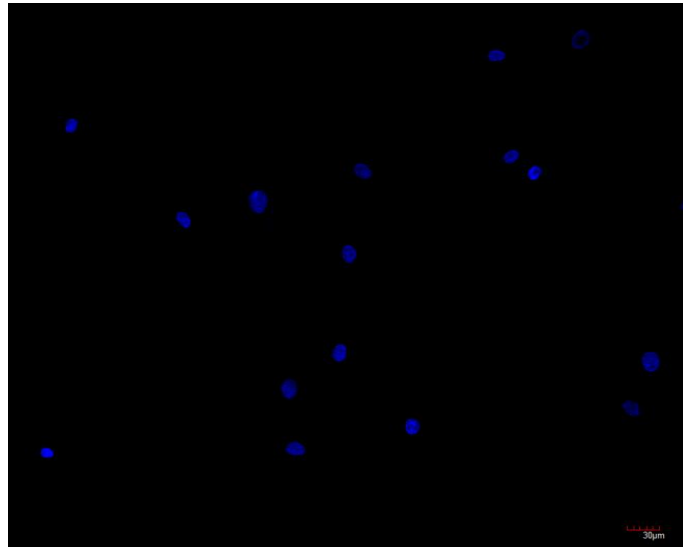


Figura 9. B. Tinción múltiple de Hoechst de MSCs de pases tardíos en microscopio confocal olympus ix 81 a escala de 30µm.

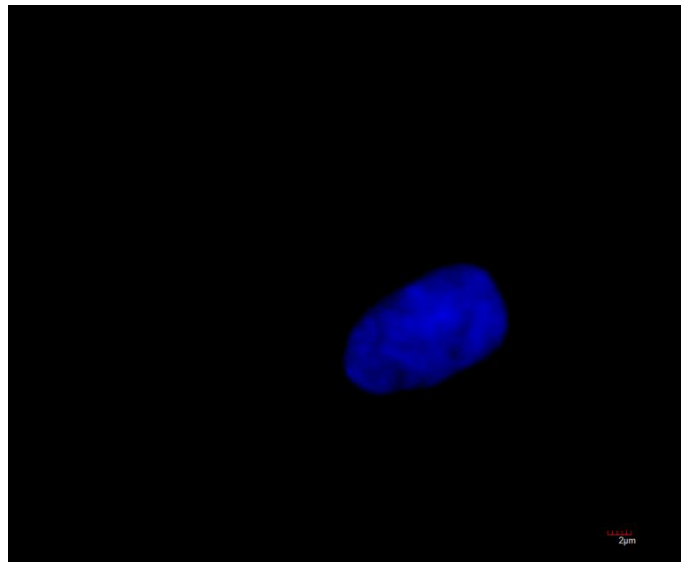


Figura 9. C. Tinción de Hoechst para una MSC de pase temprano en microscopio confocal olympus ix 81 a escala de 2µm.

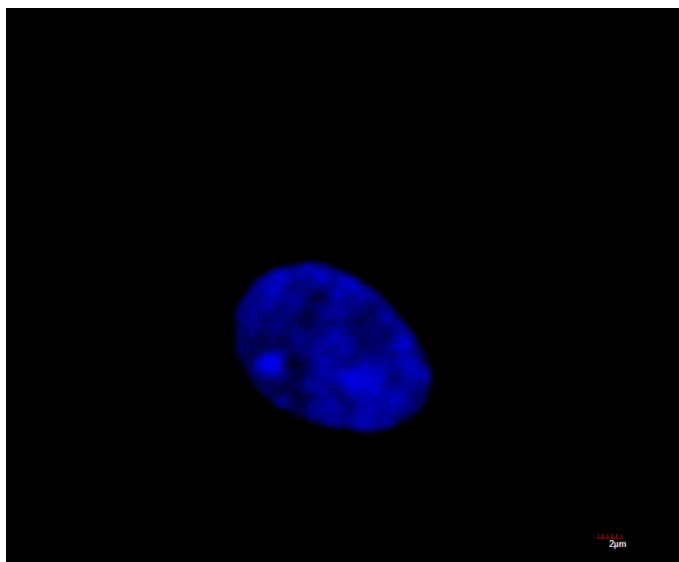


Figura 9. D. Tinción de Hoechst para una MSC de pase tardío en microscopio confocal olympus ix 81 a escala de 2µm.

Discusión

Cuantificación de poblaciones celulares, duplicación de población, y ciclo de vida

Teniendo en cuenta que los pases de hicieron cuando las MSCs se encontraban en una confluencia del 80%, el conteo celular obtenido para este porcentaje de confluencia correspondía a un número de células de 2×10^6 aproximadamente, sin embargo los tiempos para alcanzar dicha confluencia variaron dependiendo del pase que se estuviera trabajando. Según lo reportado por Tsutsumi y colaboradores [15] el tiempo necesario para obtener un número de células del orden de 10^6 se logra después de 25 días de incubación; esto se puede deber gracias a que las MSCs estaban en un estado de vejez ya que contrastando dichos resultados con los obtenidos por este estudio se presume, que el cultivo con el cual hicieron el análisis se encontraba en pase 6 ya que aproximadamente se obtuvo un número de células de 2×10^6 en el pase 6 después de 19 días de incubación.

Por otro lado, según lo reportado por Wagner y colaboradores [3] la figura de ciclo de vida de MSCs aisladas de un paciente de 44 años y cultivadas en medio comercial cambrex con 10% de FBS, demuestra que estas células llegan a senescencia al cabo de alrededor de 74 días de incubación contando con 8 PD. Los datos recopilados por este estudio demuestran que después de 51 días de incubación llegando a aproximadamente 13 PD, las MSCs no han alcanzado un estado de senescencia. Muchos factores están asociados en el desarrollo de la senescencia los cuales aun no son conocidos muy bien, sin embargo se han relacionado el acortamiento de telómeros, daños en el DNA,

acumulación del inhibidor p16INK4a, estrés oxidativo y activación de la proteína de supresión tumoral p53; la razón por la que las MSCs cultivadas en este estudio no llegan a un estado de senescencia después de un tiempo de incubación de 51 días, puede sugerir que por el hecho de que son SC, tienen la capacidad de modular el desarrollo de rutas que inducen senescencia con el fin de permanecer en un estadio de rejuvenecimiento por la reprogramación de su estado fisiológico a partir de la regulación en la expresión de Smurf2, el cual se considera que actúa también como supresor tumoral para permitir su propia proliferación marcando residuos de proteínas innecesarias con moléculas de ubiquitina para que estas sean degradadas, algunos de los parámetros que pueden modular son el estrés oxidativo y la producción de telomerasa los cuales están asociados a daños en el DNA [7,16-18].

Cuantificación de lactato

Las MSCs de pases tardíos mostraron una producción promedio de lactato de 61,23 μ M, dato que al contrastar con los logrados por funes y colaboradores [19] los cuales corresponden a una concentración de 3,5mM debido a que a pesar de que se atribuyen a datos de un cultivo primario de MSCs que deberían constar de una producción reducida de lactato, el hecho de que la incubación de este cultivo fue realizada en 1% de O₂ para generar un ambiente de hipoxia, lo que atribuye al cultivo menos tensiones de oxígeno por lo que las MSCs recurren a la fermentación láctica para obtener energía.

La razón por la cual las cuantificaciones de lactato en células de pases tardíos y tempranos son diferentes se atribuye al hecho de que existe una lanzadera de malato-aspartato, la cual ayuda a mantener la integridad de la membrana mitocondrial gracias a la generación de gradientes de iones H⁺ por parte de estas lanzaderas; en células senescentes se ha reportado que dichas lanzaderas, tales como la de malato-aspartato y de glicerol-3-fosfato, no se encuentran presentes, por lo que las células tienden a recurrir a la fermentación láctica para compensar la generación de NAD⁺ que se perdió con la inhibición de las lanzaderas para mantener la restricción calórica [20].

Senescencia asociada a actividad β -GAL

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la actividad β -GAL para ambas edades de las células, fue diferente en un orden de casi 10 veces por parte de las células de pases tardíos con respecto a las de pases tempranos. Estos resultados comparados con los obtenidos por Stenderup y colaboradores en el 2003 [21] donde señalan que la actividad de β -GAL asociada a senescencia presentan diferencias en cultivos de distintas duplicaciones de población gracias a que las MSCs de los últimos pases consideradas como células viejas, respondían más rápidamente a la reacción

que aquellas células jóvenes es decir, de primeros pases, a una razón de 10 veces mas rápido (4% por PD para viejas y 0,4% para jóvenes).

La senescencia asociada a actividad β -GAL, se ha sugerido que se da por parte de los lisosomas ya que dicha enzima se encuentra presente en estos organelos. Esta actividad ha sido reportada en fibroblastos humanos senescentes contando con un pH de 6 para su actividad, esta mismo actividad no ha se ha reportado en cultivos de células terminales diferenciadas ni en células quiescentes, a pesar de ello no se conoce bien la razón por la que a pesar de ser una enzima con una actividad optima a pH 4 cuando se trata de β -galactosidasa lisosomal, dicha actividad en células senescentes se caracteriza por presentar pH mas elevado al cual actua, por lo que algunos autores han sugerido que tal vez, dicha actividad corresponde a otro tipo de β -galactosidasa o a la activación de la ruta Ras [22]. Sin embargo los hallazgos reportados por Kurz y colaboradores en el 2000 [23] sugieren que dicha actividad incrementa con el contenido lisosomal que se encuentra asociado al incremento de replicaciones celulares.

Cambios en el potencial de membrana mitocondrial

Según la figura 5, la disminución en el potencial de membrana mitocondrial se observa en el cultivo de células de pases tardíos, mostrando valores de 26, lo cual concuerda con lo reportado por Sugrue en el 2001 [24] donde aquellas células en estado de vejez, en incluso de senescencia presentan una disminución del potencial de membrana, tanto aquellas a las que se les indujo la sobreexpresión de p53 y generaron senescencia, como aquellas que la generaron naturalmente. Uno de los factores implicados corresponde al decrecimiento en la permeabilidad de la membrana generado por la falta en la respuesta del complejo de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPC) el cual es un complejo proteico mitocondrial que esta involucrado en la permeabilidad de la membrana interna gracias a su selectividad.

Con respecto al tamaño celular y la granularidad los resultados demuestran que ambos parámetros fueron mayores para las células de pases tardíos que para las de pases tempranos. Las proteínas asociadas a estas características son las implicadas con la fusión y fision mitocondrial, las cuales tambien determinan el estado de senescencia de las células. Resultados encontrados por Lee en el 2007 [25] demuestran que células en estado de senescencia inducida por una deleción del gen que codifica para la proteina humana de fision 1 (hFis1) muestran una granularidad del 10% mas que aquellas que no se encuentran senescentes mientras que los tamaños de las MSCs como lo reporto Wagner en el 2008 [3] tienden a ser mucho más grandes dejando de lado la morfología fibroblastoide que las caracteriza.

Fragmentación nuclear

De acuerdo a los resultados obtenidos por la tinción de Hoechst, la formación de heterocromatina dilucida que tanto las células de pases tardíos como tempranos no muestran mucha diferencia en cuanto a las aglutinaciones del tinte acoplado a los surcos menores del DNA, a diferencia de lo reportado por Funayama en el 2006 [26] el cual presenta datos donde las células senescentes tienden a formar aglutinaciones en los puntos donde el DNA esta mas condensado y por tanto, se encuentra más frecuencia de surcos menores. En dicho estudio, se revela que existe una pérdida de la proteína histonica H1 la cual esta sumamente relacionada al superenrollamiento del DNA, sin embargo se reporta que se genera un incremento en la producción HMGA2 la cual es una proteína no histonica que contiene dominios de unión al DNA y puede actuar como un factor de regulación transcripcional.

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados revelados en este estudio demuestran que este cultivo de MSCs aisladas de lipoaspirado se resisten a llegar a un estado de senescencia o bien el tiempo del cultivo no ha sido el suficiente para que desarrollen estas características por lo que se recomienda seguir expandiendo las células por un mes más para determinar si existen cambios en los marcadores asociados a senescencia.

Bibliografía

1. Schipani E, Kronenberg H. Adult mesenchymal stem cells 2008. Stembook.org
2. Zuk P. The adipose-derived stem cells: looking back and looking ahead. *Molecular biology of the cell* 2010; **21**, 1783-1787.

3. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS One* 2008; **3**, 2213-2219.
4. Goldsmith T. *The evolution of aging – How new theories will change the future of medicine*. Segunda edición. Azinet press. Estados Unidos de America 2006, 4 p.
5. Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 2008; **132**, 681-96.
6. Rando TA. Stem cells, aging and the quest for immortality. *Nature* 2006; **441**, 1080-1086.
7. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 2005; **120**, 437-47.
8. Vaananen HK. Mesenchymal stem cells. *Ann Med* 2005; **37**, 469-479.
9. Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008; **15**; 711-715.
10. Kim SH. Modulation of the heterogeneous senescence of human mesenchymal stem cells on chemically-modified surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; **56**, 683-690.
11. Deorosan B, Nauman EA. The role of glucose, serum, and three-dimensional cell culture on the metabolism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2011; **2011**, 429187.
12. Higuera G. Quantifying in vitro growth and metabolism kinetics of human mesenchymal stem cells using a mathematical model. *Tissue Eng Part A* 2009; **15**, 2653-2663.
13. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 2006; **5**, 91-116.
14. Shapira E, Blitzer M, Africk D, Miller J. *Biochemical Genetics: A laboratory manual*. Primera edición. University press. Universidad de Oxford, Nueva York. Estados Unidos de America. 1989.

15. Tsutsumi S. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **288**, 413-419.
16. Cell senescence and cáncer, Stem cell or neuroscience <http://www.sabiosciences.com/pathwayonline/20100419.php>. Consultado en noviembre del 2011.
17. Yaswen P, Campisi J. Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry. *Cell* 2007; **128**, 233-234.
18. Genetic regulation of senescence in cáncer, aging and stem cell self-renewal; molecular targeting of E3 ligases in transcriptional regulation. <http://www.umassmed.edu/igp/faculty/zhang.cfm>. Consultado en noviembre del 2011.
19. Funes JM. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci* 2007; **104**, 6223-6228.
20. Easlson E. The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast. *Genes Dev* 2008; **22**, 931-944.
21. Stenderup K. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; **33**, 919-926.
22. Minamino T. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation* 2003; **108**, 2264-2269.
23. Kurz DJ. Senescence-associated (β)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000; **113**, 3613-3622.
24. Sugrue MM, Tatton WG. Mitochondrial membrane potential in aging cells. *Biol Signals Recept* 2001; **10**, 176-188.
25. Lee S. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* 2007; **282**, 22977-22983.
26. Funayama R. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 2006; **175**, 869-880.

