

Aislamiento e identificación de células madre adultas a partir de la grasa infrapatelar de Hoffa

Isolation and identification of stem cells derived of infrapatelar fat pad

Luis Gustavo Celis¹, Fernando Lizcano Losada¹, Jennifer Garay¹, Edward Acero¹, María Inés Maldonado¹, Johanna Brochero¹, Diana Vargas¹, Juliana Navarro¹, Juan Guillermo Ortiz¹, Felipe Kling², Roberto Arango², Leonardo Jaimes², Germán Carrillo³

Resumen

Introducción: La grasa infrapatelar de Hoffa es una inclusión infraarticular presente en la rodilla y existen evidencias que células multipotentes están presentes en tejido adiposo del humano adulto.

Objetivo: El propósito de este trabajo es aislar e identificar células mesenquimales a partir de muestras de la grasa de Hoffa tomadas de pacientes a los que se les practicó cirugía de rodilla que expongan este tejido.

Metodología: Una vez obtenido el consentimiento informado de un total de 12 pacientes, se obtuvo la muestra de tejido graso. La grasa fue disgregada incubándola en colagenasa en PBS a 37°C y con agitación, luego se inactivó con suero fetal bovino, se separaron mediante centrifugación los adipocitos maduros de las células multipotentes y se obtuvieron las muestras para sembrar en medio Mesencult. Una porción de muestra fue utilizada para identificación mediante citometría de flujo y otra parte para ser coloreada con azul de metileno.

Resultados y Discusión: Tanto en las tinciones con azul de metileno como en los cultivos celulares se han apreciado células con la morfología propia de una célula mesenquimal en forma de estrella y que fueron corroborados mediante citometría de flujo para los marcadores CD13, CD29, CD59 y CD105; igualmente hemos podido observar la efectividad del tratamiento enzimático.

Conclusiones: En la actualidad nos encontramos consolidando los cultivos primarios para posteriormente diferenciarlos en líneas celulares específicas que puedan ser utilizadas en estudios de patologías, tales como obesidad, diabetes y trastornos articulares.

Palabras clave: Células madre, grasa de Hoffa, células mandis, cultivo celular.

Fecha de recepción: 6 de mayo de 2009
Fecha de aceptación: 11 de junio de 2009

¹ Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Bogotá (Colombia). luis.celis@unisabana.edu.co

² Clínica Universitaria Teletón.

³ Fundación Santafé.

Correspondencia: Universidad de la Sabana, Facultad de Medicina. Autopista Norte, Km 21, Puente del Común, Chía (Cundinamarca), Colombia.

Abstract

Introduction: The infrapatellar fat pad (sometimes know Hoffa's pad) is a soft tissue that lies beneath the patella (kneecap) separating it from the femoral condyle. There is evidence suggesting the presence of stem cells on adipose tissue in the adult human.

Objective: The purpose of this work is to isolate and identify grown stem cells from Hoffa's fat samples obtained from patients undergoing surgeries exposing this tissue.

Materials and Methods: After obtaining informed consent, the biopsy of Hoffa's fat pad was obtained. The samples were incubated with collagenase and PBS a 37 °C and agitated, then it was inactivated with fetal bovine serum and centrifuged, washed twice with PBS, the pellet was resuspended and one part was cultivated on Mesencult medium the other part was used for flow cytometry and stained with methylene blue for morphologic analysis. Also before and after the enzyme digestion, the samples were added to 10% formaldehyde to evaluate the collagenase treatment.

Results and analysis: The results show the effectiveness of the enzymatic treatment, the architecture of the adipose tissue was lost. The star shape stem cells morphology was appreciated with methylene blue in the cultures, it was corroborated by flow cytometry with CD13, CD29, CD59 and CD 105 markers.

Conclusions: Primary cultures are consolidating, the next aim will be to obtain differentiated specific cell types that can be use in the study of obesity, diabetes and articular illnesses.

Keywords: Stem cells, infrapatellar fat pad, mandis cells, culture cellular.

INTRODUCCIÓN

La grasa infrapatelar de Hoffa es una inclusión infraarticular que separa la membrana sinovial antero inferior de las demás estructuras de unión de la rodilla; ésta, por lo tanto, es intraarticular pero extrasinovial. Esta estructura se halla compuesta de fibras empaquetadas con tejido adiposo; la grasa presente tiene capacidad de deformarse; de esta forma permite la adaptación y el cambio de contorno de las superficies articulares durante el movimiento de la rodilla (1).

Existen evidencias que sugieren que las células estromales multipotentes están presentes en tejido adiposo del humano adulto. Bajo ciertas condiciones, estas células muestran marcadores asociados a fenotipos de adipocitos y osteoblastos; también pueden expresar marcadores para condrocitos (2).

Las células multipotentes han sido utilizadas en la inducción de la adipogénesis (3,4), condrogénesis (5,6) y osteogénesis (7,8). Por otra parte, se han utilizado en el tratamiento de enfermedades degenerativas del sistema nervioso, la diabetes y enfermedad cardiovascular, que resaltan su gran potencial en la recuperación de los pacientes afectados por estas patologías (9, 10, 11, 12,13).

Distintas anormalidades han sido asociadas a alteraciones intrínsecas de la grasa de Hoffa, entre ellas: condroma intracapsular, sinovitis nodular, lesiones por ruptura y fibrosis postartróscopica y postquirúrgica (14).

Dada la importancia de la grasa infrapatelar de Hoffa, nos proponemos en la primera parte de nuestra investigación el cultivo y la identificación de las células multipotentes presentes en este tejido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras y cultivo celular

Pacientes

Previo consentimiento informado de aquellos pacientes que estaban sometidos a técnica quirúrgica que exponga la grasa de Hoffa, fueron parte del estudio un total de 12 pacientes, de los cuales 8 fueron hombres y 4 mujeres, con una media de edad 54 ± 5.6 años se obtuvieron muestras. Los pacientes fueron sometidos a artroscopia, meningoplastia, reemplazo de rodilla. La muestra extraída fue de 1.5 x 2.3 cm aproximadamente en cada caso.

Las muestras fueron colocadas en solución salina fisiológica, suplementadas con penicilina/estreptomicina y lavadas varias veces con buffer fosfato salino (PBS) y digeridas con colagenasa al 0.5% en PBS a 37°C y con agitación a 165 rpm por 30 minutos, y se separaron los adipocitos maduros de las células multipotentes (15). Así mismo, antes y después de la digestión enzimática partes de la muestra son fijadas en formaldehído al 10% para su posterior coloración con H/E y Tricómico de Mallory, para evaluar la efectividad del tratamiento con la colagenasa. Después se neutraliza la colagenasa con suero bovino fetal (FBS) al 10% y se centrifuga a 250 rpm por 10 minutos, y se descarta el sobrenadante (fracción de adipocitos maduros) y resuspendiendo el pellet en PBS.

Posteriormente, el pellet resuspendido se separa en 3 fracciones: la primera será sembrada en cajas de cultivo previamente tratadas con matrigel (Gibco invitrogen, California, Estados Unidos), que contienen el medio Mesen Cult[®] MSC Basal Medium (StemCell Technologies, Vancouver, BC,

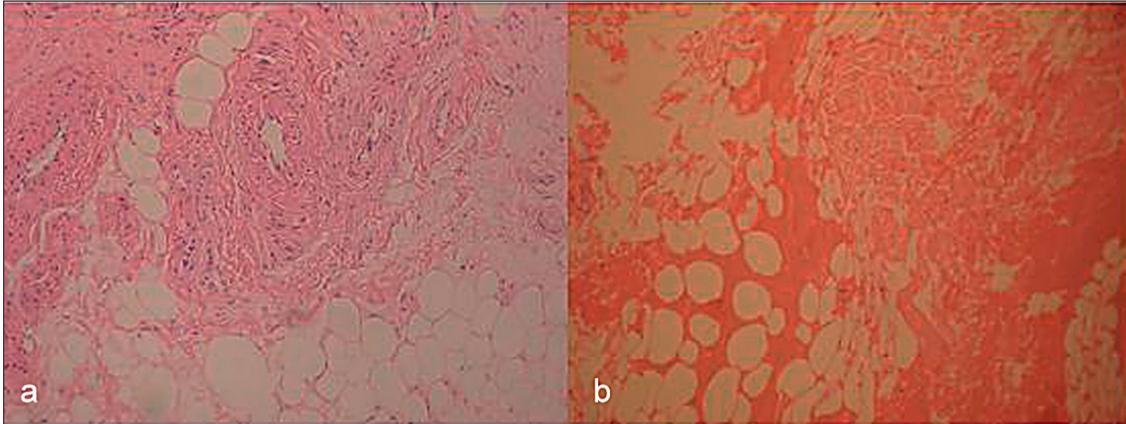
Canadá) para expansión de las células mesenquimales; la segunda será extendida en un portaobjeto para ser coloreada con azul de metileno (Cifar, Bogotá) para verificar su presencia por análisis morfológico, y la tercera para su análisis por citometría de flujo utilizando la solución fijadora de solución estabilizadora TransFix Cytomark (Buckingham, Inglaterra).

Citometría de flujo

La citometría de flujo se realiza tomando alícuotas de 100 ml del pellet que son marcadas con 10 μ l de anticuerpos anti-CD13 FITC (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA), anti-CD29 PE (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA), anti-CD59 FITC (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA) y anti-CD105 PE (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA). Una vez realizado el marcaje, las muestras son analizadas en el citómetro de flujo CyAn de Dako de 9 colores (Rochem Biocare).

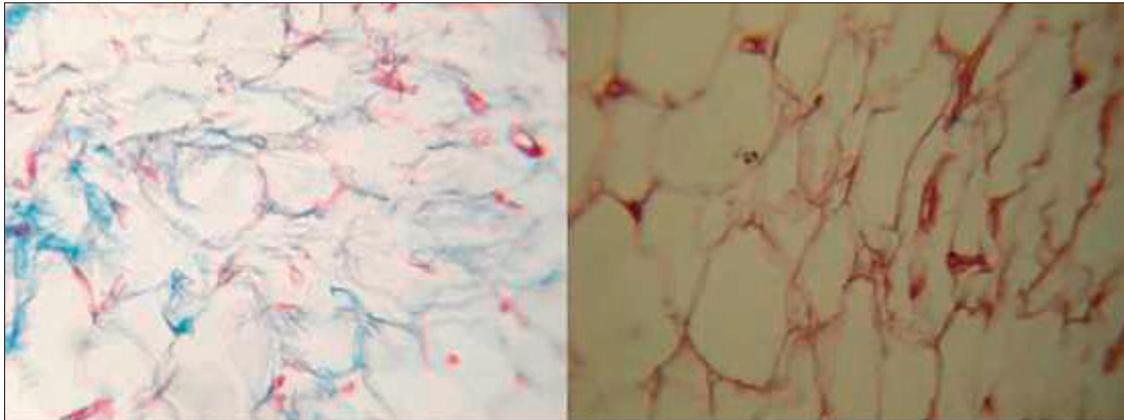
RESULTADOS

Los resultados obtenidos nos han permitido observar la efectividad del tratamiento enzimático en la pérdida de la arquitectura del tejido graso, y se apreció la separación de los adipocitos (figura 1) y no se observaron fibras de colágeno resaltadas con la histología descrita (figura 2). Tanto en las tinciones con azul de metileno como en los cultivos celulares se han apreciado células con la morfología propia de una célula mesenquimal (figuras 3, 4a y 4b) con la característica forma de estrella (las células obtenidas por este protocolo las hemos denominado células mandis). Estos fenotipos pueden ser explicados, entre otras cosas, por la intensidad de la interacción de las células mesenquimales de origen adiposo y el soporte utilizado



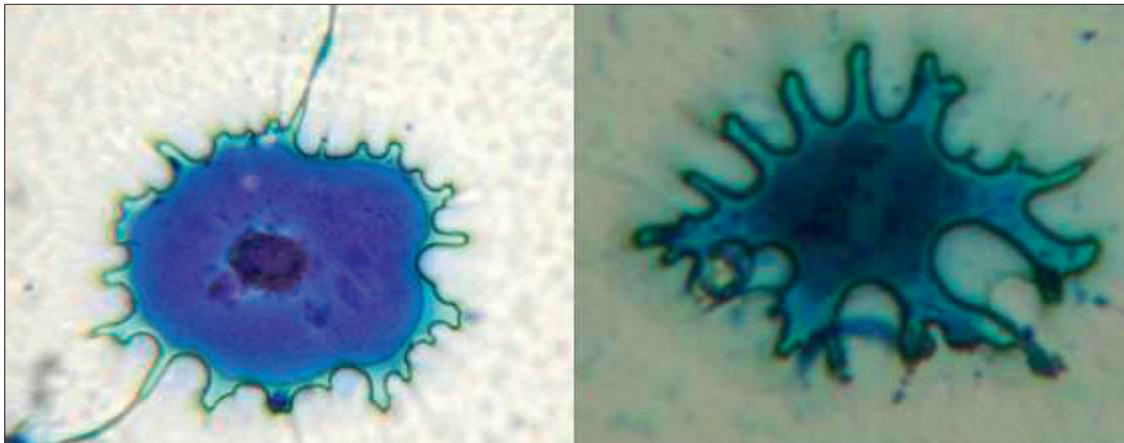
Fuente: Datos de los autores.

Figura 1. Arquitectura de la Grasa intrapatelar de Hoffa coloreada con H/E antes (a) y después (b) de la digestión con la colagenasa. Nótese la separación de los adipocitos. Aumento: 10x.



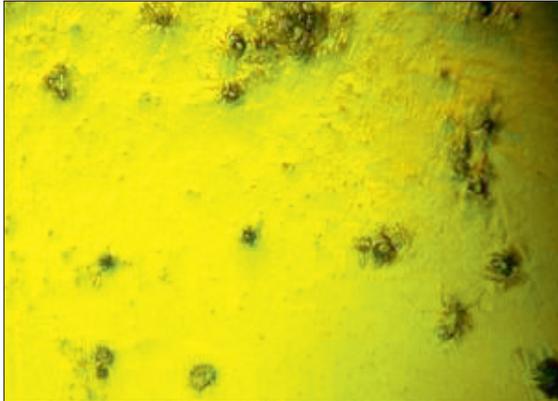
Fuente: Datos de los autores.

Figura 2. Grasa intrapatelar de Hoffa coloreada con Tricómico de Mallory antes (a) y después (b) de la digestión con la colagenasa. Nótese la pérdida de las fibras de colágeno (coloreadas de azul) por acción del tratamiento con la colagenasa. Aumento: 40x.



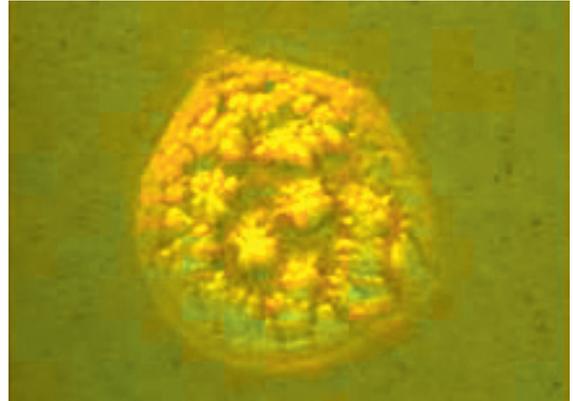
Fuente: Datos de los autores.

Figura 3. Células Mesenquimales teñidas con azul de metileno. Aumento: 100x.



Fuente: Datos de los autores.

Figura 4a. Células Mesenquimales teñidas con azul de metileno. Aumento: 10x

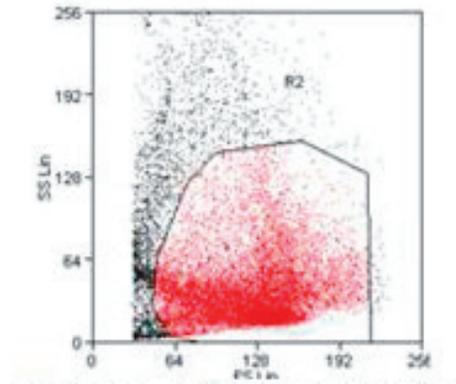


Fuente: Datos de los autores.

Figura 4b. Células Mesenquimales teñidas con azul de metileno. Aumento: 100x

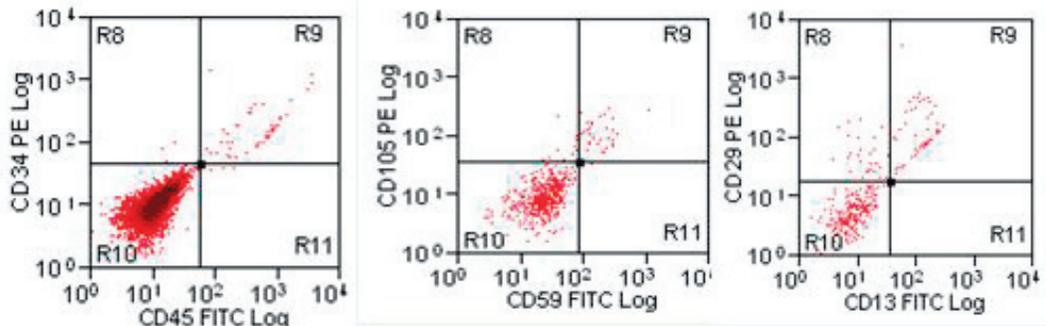
(entre más fuerte es la interacción más estrellado es el fenotipo), aspecto éste bien descrito en la literatura (16).

La totalidad de las muestras de grasa de Hoffa obtenidas de los pacientes estudiados fueron procesadas y analizadas por citometría de flujo, con el fin de determinar el fenotipo celular. Durante el análisis se seleccionó la población de tamaño y granularidad característica de la población en estudio (figura 5a). Además se observó la expresión de CD13(+) en un 49%, CD29(+) en un 42%, CD59(+) en un 60% y CD105 (+) en un 53% (figura 5b).



Fuente: Datos de los autores.

Figura 5a. Dot plot FS y SSC. R2 corresponde a la población que presenta el tamaño y granularidad característica de las células en estudio.



Fuente: Datos de los autores.

Figura 5b. Expresión de CD13, CD 29, CD59 y CD105 en las células madres aisladas de grasa de Hoffa, se observó la expresión de CD13(+) 48,6%, CD29(+) 42%, CD59 + 60% y CD105 (+) 53%.

Estas expresiones sugieren que las células estromales multipotentes están presentes en tejido adiposo de los pacientes analizados. Según Wickham y cols. (2), la expresión de los marcadores CD13+, CD29+, CD59+ y CD105+ es característica de células multipotentes en grasa de Hoffa. Además, en este estudio el autor sostiene que bajo ciertas condiciones estas células muestran marcadores asociados a fenotipos de adipocitos y osteoblastos (2).

Adicionalmente, en los resultados de las muestras procesadas se observó que las células carecían de la expresión de los marcadores CD34 y CD45 (figura 6). La expresión negativa de estos últimos marcadores confirma que las células madre encontradas no corresponden a células multipotentes hematopoyéticas (cuadro 1).

Cuadro 1

Porcentaje de células marcadas positivamente para cada uno de los anticuerpos utilizados en la citometría de flujo

Proteína Antígeno de Superficie	Antígeno	Promedio células marcadas positivamente
Aminopeptidasa N	CD13	48,56
Integrina b1	CD29	42,04
Protectina del Complemento	CD59	60,33
Endoglina	CD105	53,40

Fuente: Datos de los autores.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los organismos adultos, la mayoría de las células están en estado de diferenciación terminal y no pueden dar lugar a otras células

diferentes de ellas. Sin embargo, se conoce que en algunos tejidos existen células que podrían dar lugar a varios linajes celulares. Estas células, que se denominan células troncales, existen, por ejemplo, en la médula ósea, no obstante, también se han aislado a partir del cordón umbilical, la grasa visceral, los vasos sanguíneos, el músculo esquelético, la córnea, la pulpa dental, el hígado, la piel, el tracto gastrointestinal y el páncreas (17, 18, 19). El hallazgo de estas células con bastante plasticidad para desarrollarse en otro tipo celular en adulto da una esperanza en la reparación de los tejidos afectados por enfermedades crónicas o degenerativas.

De esta forma, la medicina regenerativa se ha constituido en un énfasis de la investigación en medicina debido a su potencial ayuda en solucionar las patologías crónicas tanto transmisibles como no transmisibles. Los datos presentados en este estudio demuestran la presencia de células multipotentes en la grasa retropatelar de Hoffa tanto por análisis morfológico como por citometría de flujo, y se resalta la importancia que tiene la misma como fuente de células madre adultas.

Potencialmente estas células pueden ser diferenciadas en otros tipos celulares, sin que existan inconvenientes éticos en los cuales se pueda incurrir cuando se trabaja con células madre de origen embrionario. Una prueba de ello es que se ha logrado la inducción de las mismas a linajes condrogénicos y osteogénicos con miras a su potencial uso en ingeniería de tejidos para la reparación de tejido cartilaginoso (20, 21, 22).

Por otra parte, nuestra experiencia al trabajar con el tejido graso nos ha permitido observar que las células presentan gran resistencia y poca labilidad con respecto a

otros líneas celulares como linfocitos; de hecho se ha observado que éstas mantienen la expresión de los epítopes característicos de las células mesenquimales en forma estable e inclusive con la edad, dado que al trabajar con poblaciones de células provenientes de grupos de pacientes con diferentes edades éstas mantenían sus epítopes (22).

En la actualidad nos encontramos consolidando los cultivos primarios, y una vez concluida esta parte los diferenciaremos en líneas celulares específicas, tales como adipocitos. La comprensión de los mecanismos de la adipogénesis y, en particular, del papel del receptor nuclear PPAR γ permitirá entender la fisiopatología de los adipositos y, por lo tanto, realizar intervenciones en enfermedades como la arterioesclerosis, la diabetes tipo 2 y la obesidad, al igual que el diseño de nuevas estrategias de tratamiento, inclusive en trastornos articulares (23, 24).

Conflicto de interés: Ninguno.

Financiación: Universidad de la Sabana.

REFERENCIAS

1. Swan A, Mercer S. Anatomy of Infrapatellar Fat Pad NZ. *J of Physiotherapy* 2005; 33(1):19-22.
2. Wickham MQ, Ericsson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent Stromal Cells derived from the infrapatellar Fat Pad of the Knee. *Clin Orthop* 2003; 1 (412):196-212.
3. Martin J, Helm K, Ruegg P, Varella-Garcia M, Burnham E, Majka S. Adult lung side population cell have mesenchymal stem cell potential. *Cytotherapy* 2008; 10(2):140-151.
4. Liao YJ, Gao JH, Jiang P, Lu F. Effect of hypoxia on dedifferentiation of mature adipocytes: an experimental study. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2008; 28(3):339-342.
5. Choi Y, Im M, Kim C, Lee M, Noh S, Lim S, Kim S, Cho C, Kim D. Chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells in atelocollagen. *Cytotherapy* 2008; 10(2):165-173.
6. Kanichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, Campbell VA. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: A role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *J Cell Physiol* 2008; 216(3):708-715.
7. Müller P, Bulnheim U, Diener A, Lüthen F, Teller M, Klinkenberg ED, Neumann HG, Nebe B, Liebold A, Steinhoff G, Rychly J. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 2008; 12(1):281-291.
8. Dudas JR, Losee JE, Penascino VM, Smith DM, Cooper GM, Mooney MP, Jiang S, Rubin JP, Marra KG. Leporine-derived adipose precursor cells exhibit in vitro osteogenic potential. *J Craniofac Surg* 2008; 19(2):360-368.
9. Hou L, Hong T. Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci China C Life Sci* 2008; 51(4):287-294.
10. Liu M, Han ZC. Mesenchymal stem cells: Biology and clinical potential in Type 1 Diabetes Therapy. *J Cell Mol Med* 2008; 12(4):1155-1168.
11. Seissler J, Schott, M. Generation of Insulin producing Beta Cells from Stem Cells - Perspectives for Cell Therapy in Type 1 Diabetes. *Horm Metab Res* 2008; 40(2):155-161.
12. Lee DD, Grossman E, Chong AS. Cellular therapies for type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 2008; 40(2):147-154.
13. Zhang N, Li J, Luo R, Jiang J, Wang JA. Bone marrow mesenchymal stem cells induce angiogenesis and attenuate the remodeling of diabetic cardiomyopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116(2):104-111.
14. Stevenson K, Schweitzer M y Hamarneh G. Multi-Angle Deformation Analysis of Hoffa's Fat Pad. Recuperado el 21 de marzo de 2006 de la dirección: <http://www.cs.sfu.ca/~hamrneh/ecopy/spiemi2006c.pdf>.
15. Drago JL. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. Recuperado el 4 de abril de 2006 de la dirección: *Journal of Bone and Joint Surgery*

- http://www.findarticles.com/p/articles/mi_qa3767/is_200307/ai_n9299996.
16. Sharpa JA, Canea KN, Mailera SL, Oosthuizenb WH, Arnouldc JPY, Nicholasa KR. Species-specific cell-matrix interactions are Essentials for differentiation of alveoli like structures and milk gene expresión primary mammary cells of the Cape fur seal (*Arctocephalus pusillus pusillus*). *Matrix Biology* 200; 25(7): 430-442.
 17. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JL, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, BenhaimP, HedrickMH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13:4279-4295.
 18. Niemeyer N, Kornacker M, Mehlhorn AT, Seckinger A, Vohrer J, Schmal H, Kasten P, Eckstein V, Südkamp NP, Krause U. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Engineering* 2007; 13:111-121.
 19. Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Tissue Engineering of Cartilage and Bone: Novartis Foundation Symposium*. UK: John Wiley & Sons; 2005. p. 243.
 20. Lee SY, Nakagawa T, Reddi AH. Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein (szp)/lubricin by mesenchymal progenitors in the infrapatellar fat pad of the knee Joint treated with TGF- β 1 and BMP-7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 376:148-153.
 21. Khan WS, Tew SR, Adesida AB, Hardingham TE. Human infrapatellar fat pad-derived stem cells express the pericyte marker 3G5 and show enhanced chondrogenesis after expansion in fibroblast growth factor 2 Recuperado el 9 de julio de la dirección: *Arthritis Research & Therapy* 10(4): R74. Published online 2008 July 3. doi: 10.1186/ar2448 <http://arthritis-research.com/content/10/4/R74>
 22. Khan WS, Adesida AB, Tew SR, Andrew, Hardingham, TE. The epitope characterisation and the osteogenic differentiation potential of human fat pad-derived stem cells is maintained with ageing in the later life Injury, *Int J Care Injured* 2009; 40:150 -157.
 23. Lizcano F y Martínez I. Diabetes: Bases moleculares. Fisiología y fisiopatología. En: *Fundamentos moleculares en medicina* (Cap. 11). Fernando Lizcano Losada, editor Bogotá: El Manual Moderno y Universidad de La Sabana; 2005.p. 251-273.
 24. Semole RK, Chatterjee VK y O' Rahilly SO. PPAR γ and human metabolic disease. *The Journal Clinical Investigation* 2006; 116(3): 581-589.