

Análisis funcional, molecular y de la capacidad de diferenciación de las MSC obtenidas del tejido adiposo (AD-MSC) de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática



Carlos Río, Andreas Jahn, Javier Verdú, Amanda Iglesias, Orlando Gigirey, Juan Antonio Torrecilla, Ángel Carvajal, Luis A. Ortiz y Ernest Sala.

Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa) & Hospital Universitario Son Espases

Introducción: Las células madre mesenquimales obtenidas del tejido adiposo (AD-MSC) han demostrado cierta capacidad reparadora / regenerativa en modelos experimentales de lesión pulmonar. Sin embargo, no existe evidencia de si las AD-MSC obtenidas de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FIB) tienen características diferenciales respecto a las AD-MSC de controles sanos (CC) que puedan influir en su potencial capacidad reparadora / regenerativa.

Material y Métodos: Las AD-MSC se obtuvieron de tejido adiposo de la pared torácica en individuos sometidos a cirugía torácica. La respuesta funcional a inhibidores receptores se evaluó mediante el sistema xCELLigence (ACEA Biosciences) en las placas E-Plate VIEW 96, que permite un análisis funcional en tiempo real proporcionando un valor de impedancia (Índice Celular [IC]), **figura 1**. La migración se evaluó en el mismo sistema con las placas CIM-Plate®, **figura 2**. La fosforilación de la tirosina fue evaluada por Western Blot y en placa (in cell western), y cuantificada con el Odyssey (Li-Cor), **figura 3**. Los experimentos de diferenciación se realizaron con protocolos ampliamente validados, **figura 4**.

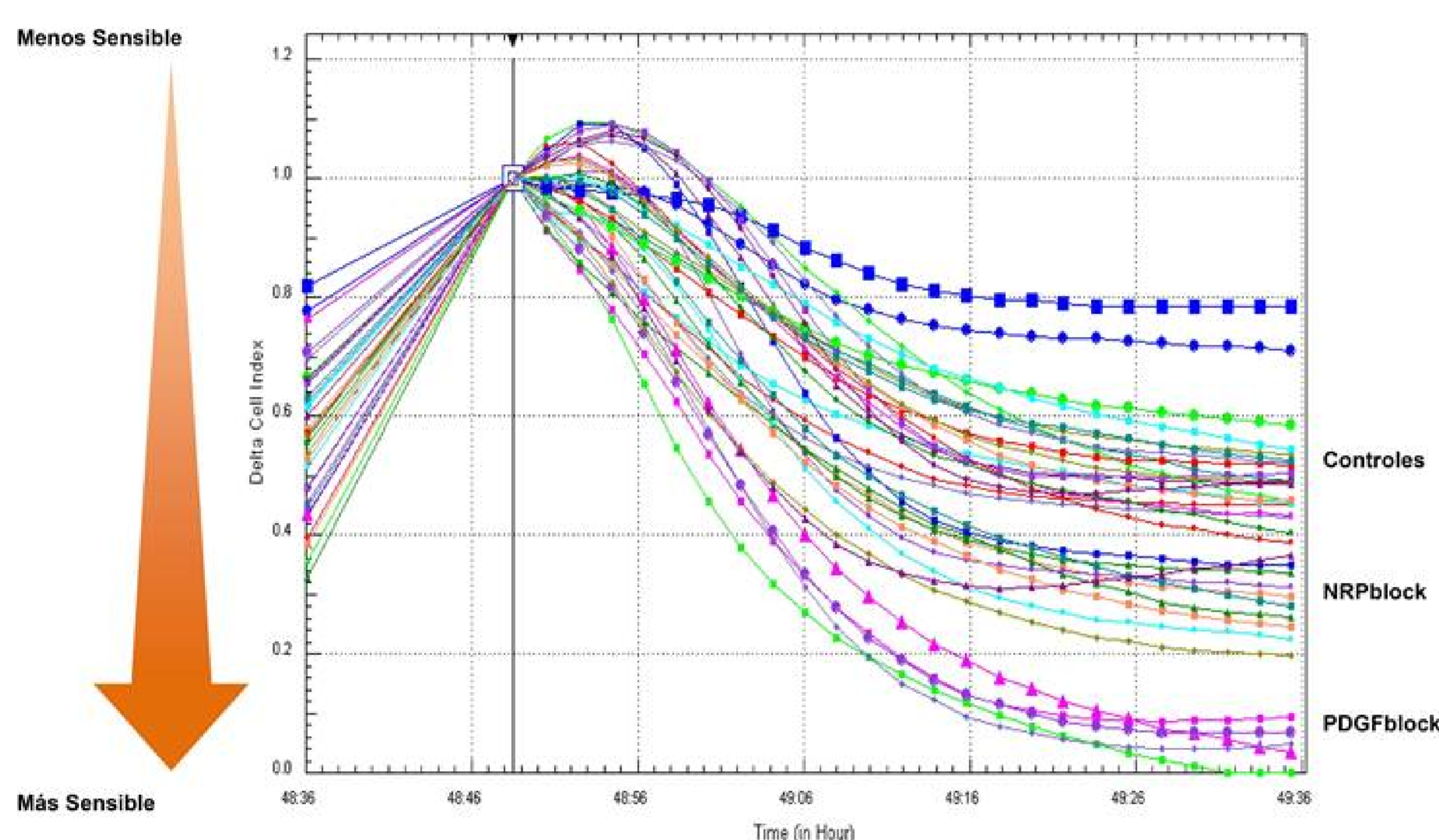


Fig. 1 Medición a la sensibilidad a varios bloqueantes de receptores de factores de crecimiento en MSC controles, en concreto Neupilin-1 (NRP-1) Antagonist (EG3287, Tebubio) & PDGFR tyrosine kinase inhibitor (521232, Millipore/Calbiochem). El efecto en la bajada del CI es mayor en las células que han sido tratadas con el bloqueante de PDGFR que con el bloqueante de NRP-1, sugiriendo una respuesta biológica más potente dependiente de la actividad del PDGF.

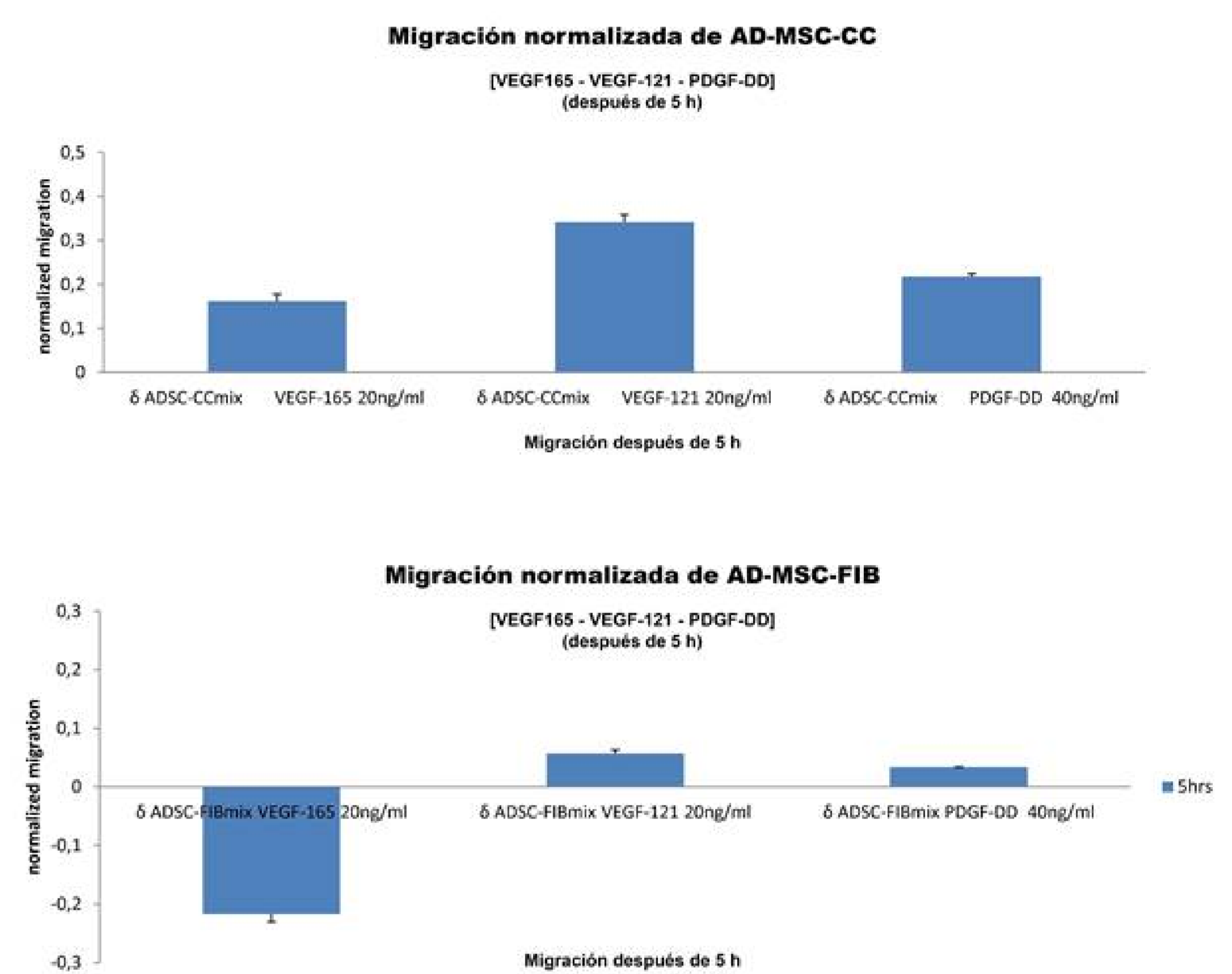


Fig. 2 Cuantificación de la migración de las AD-MSC de células control (CC) y de células de pacientes con Fibrosis Pulmonar (FIB). Tanto el VEGF-165, VEGF-121 como PDGF-DD estimulan la migración de las células CC. El efecto es mucho menor en las células FIB, incluso el VEGF-165 parece bloquear la migración en estas mismas células FIB.

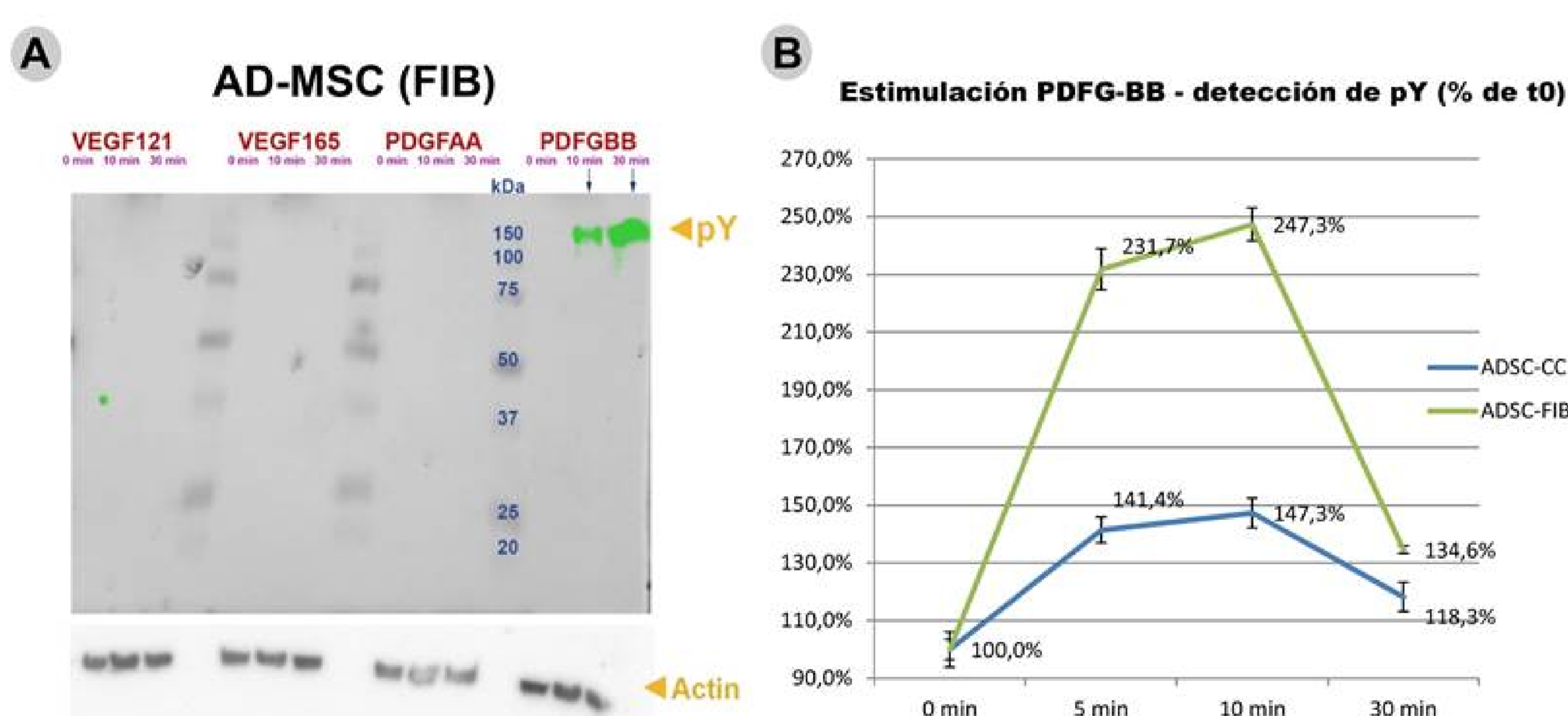


Fig. 3 Cuantificación de la fosforilación en tirosinas (pY) de las AD-MSC de células control (CC) y de células de pacientes con Fibrosis Pulmonar (FIB) estimuladas con diferentes factores que se unen a receptores con actividad tirosina quinasa: VEGF-121, VEGF-165, PDGF-AA y PDGF-BB, mediante Odyssey (Li-Cor). **A-** El único factor con el que detectamos fosforilación en tirosinas, utilizando el anticuerpo Anti-Phosphotyrosine Antibody, 4G10® Platinum (Millipore), en una banda de un peso molecular superior a 150 kDa es el PDGF-BB. **B-** Curiosamente, la cuantificación de dicha fosforilación mediante In-Cell Western muestra que esta mucho más pronunciada en las células FIB que en las CC.

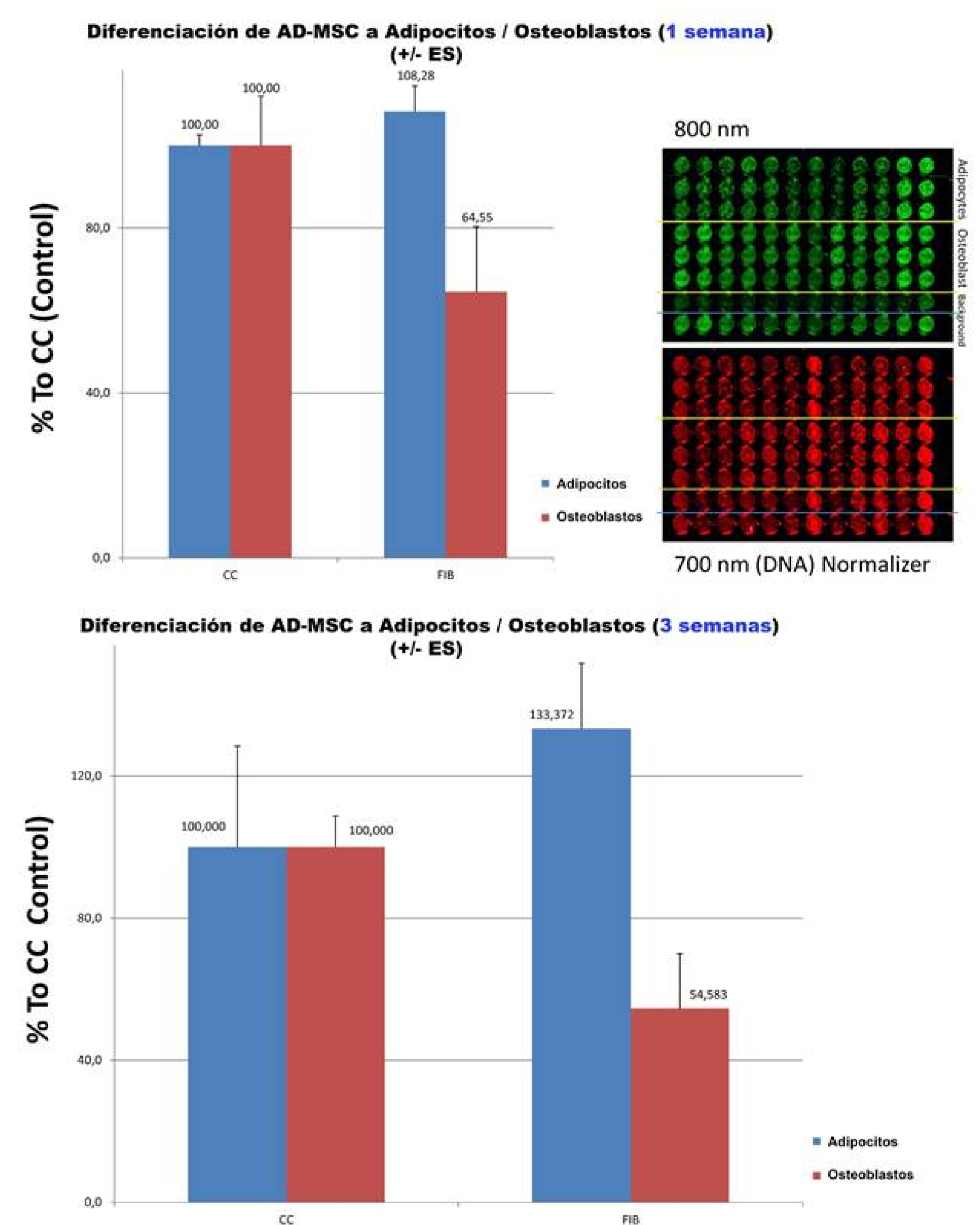


Fig. 4 Diferenciación de las AD-MSC de células control (CC) y de células de pacientes con Fibrosis Pulmonar (FIB) a adipocitos y osteoblastos cuantificada con Odyssey (Li-Cor). Al final de cada proceso de diferenciación las células se fijaron y marcaron con anticuerpos específicos para FABP4 (adipocitos) y Osteocalcina (osteoblastos) (Biorbyt). Las MSC-FIB se diferencian más a adipocitos y menos a osteoblastos que las MSC-CC (100% como valor de referencia). El efecto se observa ya a la semana de diferenciación, pero es más evidente a las 3 semanas.

Resultados: 1) Las AD-MSC son más sensibles a bloqueantes de receptores tirosina quinasa, singularmente a los de la familia del PDGF; 2) La respuesta a algunos de estos factores medida en ensayos de migración celular muestra diferencias importantes en la respuesta de las células controles (AD-MSC-CC) y las procedentes de pacientes con FPI (AD-MSC-FIB); 3) La estimulación con PDGF-BB evidencia fosforilación en tirosinas del PDGFR y ésta es más pronunciada en las AD-MSC-FIB; y, 4) Las AD-MSC-FIB muestran mayor diferenciación a adipocitos y menor diferenciación a osteoblastos que las AD-MSC-CC tanto a los 7 como a los 21 días.

Conclusiones: Estos resultados muestran que existen diferencias funcionales, moleculares y en capacidad de diferenciación entre las AD-MSC-CC y las AD-MSC-FIB que permiten especular que las AD-MSC-FIB pueden tener alterada su capacidad reparadora / regenerativa. *Subvencionado, en parte, por SEPAR 2013.*