

UCH-FC
Biotec
B431
c.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE NUTRICION Y
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
UNIDAD DE BIOLOGIA CELULAR

**CÉLULAS PRECURSORAS MESENQUIMÁTICAS: EXPRESIÓN DE FACTORES
ANGIOGÉNICOS Y SU CARACTERIZACIÓN**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

CLAUDIA ANDREA BENAVENTE ARIAS



**DIRECTOR DE TESIS
Dr. José Minguell Uribe
Unidad de Biología Celular
Instituto de Nutrición y
Tecnología de Alimentos
Universidad de Chile**

**CO-DIRECTOR DE TESIS
Dr. Walter Sierralta
Laboratorio de Ultraestructuras
Instituto de Nutrición y
Tecnología de Alimentos
Universidad de Chile**

**SANTIAGO DE CHILE
2002**

La Ciencia es una tentativa en el sentido de lograr que la caótica diversidad de nuestras experiencias sensoriales corresponda a un sistema de pensamiento lógicamente ordenado.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

En todo proceso hay un pasado, un presente y un futuro. Sin uno no existe el otro y por ello quisiera agradecer a todas aquellas personas que me permitieron llegar a este punto.

A mis padres, sin los cuales no existiría y que junto a mi hermano me han apoyado a lo largo de mi vida. Ellos me entregaron la mejor educación y ahora está en mi hacer algo útil de ella.

A todos los profesores y amigos que se presentaron a lo largo de este camino y que de una u otra manera influenciaron mi vocación profesional y personal.

Al Dr. José "Pepe" Minguell, por abrirme las puertas de su laboratorio y por compartir su conocimiento, pero por sobre todo, por su calidez y por ser un ejemplo de que la eficiencia, la cortesía y el buen trato son compatibles.

A los compañeros y socios de laboratorio, por su generosidad al compartir gratos momentos, insumos y conocimientos tanto científicos como gastronómicos y maternos.

A todas aquellas personas que creyeron en mi y a todas las personas que en el futuro están por hacerlo.

MESENCHYMAL!

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. HIPÓTESIS.....	19
III. OBJETIVO GENERAL.....	19
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
V. MATERIALES.....	20
VI. MÉTODOS	24
6.1. Obtención de cultivos expandidos de MPCs	24
6.1.1. Preparación de MPCs G_0	24
6.2. Cultivos celulares	25
6.2.1. Subcultivo de MPC expandidas y G_0	25
6.2.2. Recuento y viabilidad celular	26
6.2.3. Criopreservación	26
6.3. Inmunocitoquímica.....	27
6.3.1. Inmunocitoquímica mediante microscopía de fluorescencia	27

6.3.2. Inmunocitoquímica mediante citometría de flujo.....	28
6.4. Análisis de ciclo celular	29
6.5. Análisis de células en G ₀	30
6.6. Expresión de bFGF por Western Blot	32
6.6.1. Obtención de proteínas solubles.....	32
6.6.2. Obtención de proteínas nucleares	32
6.6.3. Condiciones del Western Blot.....	33
6.6.4. Marcaje de membranas electrotransferidas	34
6.6.5. Análisis de las bandas obtenidas.....	35
6.7. Cuantificación de bFGF en medios condicionados	35
6.7.1. Obtención de medios condicionados.....	35
6.7.2. Cuantificación de bFGF.....	36
VII. RESULTADOS.....	37
A. Estudios en MPC expandidas	
7.1. Efecto de la concentración de suero fetal en MPC expandidas	37
7.1.1. En proliferación	37
7.1.2. En ciclo celular	37
7.2. Producción de factores angiogénicos por MPC expandidas	39
7.2.1. Inmunocitoquímica para detección de bFGF, FGFR1 y VEGF	39
7.3. Estudio de estímulos que puedan modificar la distribución de bFGF y VEGF en MPC expandidas	45
7.3.1. Efecto de 17β-estradiol	45

7.3.1.1. En proliferación	45
7.3.1.2. En distribución de factores angiogénicos.....	47
7.3.2. Efecto de bFGF exógeno	47
7.3.2.1. En proliferación	50
7.3.2.2. En ciclo celular	50
7.3.2.3. En distribución celular del bFGF	51
7.3.3. Efecto de la temperatura	55
B. Estudios realizados con MPC G₀	
7.4. Producción de factores angiogénicos por MPC G ₀	57
7.4.1. Características de MPC G ₀	57
7.4.1.1. Morfología de las MPC G ₀	58
7.4.1.2. Estudio del potencial proliferativo de las MPC G ₀	58
7.4.1.3. Expresión de genes en MPC G ₀	60
7.4.2. Distribución de factores angiogénicos por MPC G ₀	60
7.4.2.1. Presencia y distribución de bFGF y su receptor	60
7.4.2.2. Presencia y distribución de VEGF y su receptor.....	64
7.5. Isoformas de bFGF producido por MPC.....	64
7.6. Producción de bFGF en MPCs y su salida al medio de cultivo.....	69
VIII. DISCUSIÓN.....	71
IX. CONCLUSIONES.....	78
X. REFERENCIAS.....	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Efecto de la concentración de suero en la proliferación de las MPC expandidas	38
Figura 2.- Distribución de bFGF en MPC expandidas según microscopía de fluorescencia doble	41
Figura 3.- Microscopía de fluorescencia para FGFR1 en MPC expandidas	42
Figura 4.- Microscopía de fluorescencia para VEGF en MPC expandidas	43
Figura Control.- Control negativo para microscopía de fluorescencia en MPCs	44
Figura 5.- Efecto de estradiol sobre la proliferación de las MPCs	46
Figura 6.- Efecto de bFGF exógeno sobre la proliferación de las MPCs	46
Figura 7.- Distribución de bFGF en MPC expandidas expuestas a estradiol según microscopía de fluorescencia	48
Figura 8.- Distribución de VEGF en MPC expandidas expuestas a estradiol según microscopía de fluorescencia	49
Figura 9.- Presencia de una población de células MPC expandidas que expresan eventos apoptóticos y su eventual desaparición por adición de bFGF exógeno	52
Figura 10.- Efecto protector del bFGF exógeno contra la inducción de apoptosis por disminución de suero fetal en el medio de cultivo	53
Figura 11.- Microscopía de fluorescencia de bFGF en MPC expandidas expuestas a bFGF exógeno	54
Figura 12.- Microscopía de fluorescencia para bFGF y FGFR1 en MPCs expandidas incubadas en 10% SF durante 2 horas a 4°C	56

Figura 13.- Morfología de las MPCs por microscopía de contraste de fases.	59
Figura 14.- Expresión de genes de diferenciación linaje-específico en MPCs	61
Figura 15.- Distribución de bFGF en MPC G₀ por microscopía de fluorescencia	62
Figura 16.- Distribución de FGFR1 en MPCs G₀ según microscopía de fluorescencia	63
Figura 17.- Distribución de VEGF en MPCs G₀ según microscopía de fluorescencia	65
Figura 18.- Distribución de VEGFR en MPCs G₀ según microscopía de fluorescencia	66
Figura 19.- Análisis por Western Blot de la expresión de bFGF en núcleos de MPC cultivadas bajo diferentes condiciones	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Efecto de la concentración de suero en la fase del ciclo celular en que se encuentran las MPC expandidas.....	38
Tabla 2.- Propiedades de MPC G_0	61
Tabla 3.- Isoformas de bFGF presentes en MPCs y su cuantificación	70
Tabla 4.- Liberación de bFGF en los medios condicionados.	70

ABREVIATURAS

- α -MEM : Minimum Essential Medium Alpha Medium.
- AcMo : Anticuerpo monoclonal.
- AcPo : Anticuerpo policlonal.
- AO : Anaranjado de acridina.
- bFGF : Factor básico de crecimiento de fibroblastos.
- FGF : Factor de crecimiento de fibroblastos.
- FGFR1 : Receptor del factor básico de crecimiento de fibroblastos.
- Ho : Trihidrocloruro de bisbenzamida H 33342.
- MPC : Células progenitoras mesenquimales.
- PBS : Tampón fosfato salino.
- SF : Suero fetal bovino.
- VEGF : Factor de crecimiento del epitelio vascular.
- VEGFR : Receptor del factor de crecimiento del epitelio vascular.

RESUMEN

Este es un estudio de la expresión de los factores angiogénicos por parte de la célula progenitora mesenquimática que posiblemente estén involucrados en la determinación de la presencia u ausencia de un estado de dormancia en la célula tumoral. Encontramos que la célula progenitora mesenquimática expresa el factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF), el que está localizado en el núcleo y presente en tres isoformas (18, 21 y 22,5 kDa). El bFGF presente en las células progenitoras mesenquimáticas es liberado al medio cuando ésta se encuentra en su condición de expandida. La expresión del factor de crecimiento del epitelio vascular (VEGF) es dependiente de la condición en la que se encuentran estas células; células seleccionadas en fase G_0 del ciclo celular no expresan VEGF. Nuestros resultados sugieren que de existir una interacción entre la célula tumoral con la célula progenitora mesenquimática en la médula ósea, ésta puede ocurrir de dos maneras: primero favoreciendo un estado de dormancia y luego favoreciendo un estado de proliferación activa, lo que implica salida del estado dormante.

bFGF \rightarrow Señal de destino nuclear
18 kD \rightarrow FGFR \rightarrow Núcleo?

Receptor FGF

Núcleo 93% \rightarrow CDH?
MPC expandida 100% \rightarrow Libera bFGF

VEGF

MPC expandidas \rightarrow células adherentes después de 3-4 subcultivos
MPC G_0 por adhesión \rightarrow Selección con FluorUracilo

SUMMARY

This is the study of the angiogenesis factors expression in the mesenchymal progenitor cell that are likely to be involved in determining or not a dormant state on the tumor cell. We found that the basic fibroblast growth factor (bFGF) is expressed by mesenchymal progenitor cells and has a nuclear localization in three different forms (18, 21 and 22.5 kDa). bFGF present in the mesenchymal progenitor cell can be released to the medium when the cell is expanded. The expression of vascular epithelial growth factor (VEGF) depends on the condition of the cells; cells selected on G₀ phase of the cell cycle do not express VEGF. These results suggest that if there is an interaction between the mesenchymal progenitor cell and the tumor cell in the bone marrow, this can happen in two different ways: first, inducing a dormant state and then, inducing an active proliferation which defines the end of the dormancy state.

I. INTRODUCCIÓN

Células precursoras mesenquimáticas

En la compleja población celular presente en la médula ósea *in vivo*, existe una serie de células quiescentes, no hematopoiéticas, referidas como células troncales mesenquimáticas, MSC o CFU-F (Friedenstein et al, 1976). Éstas, tras un compromiso, pueden diferenciarse en varios tipos de células conectivas, incluyendo adipocitos, osteoblastos, condrocitos, tenocitos y estroma de soporte hematopoiético (Pereira et al., 1995; Majumdar et al., 1998; Deans et al., 2000). Además, las células precursoras mesenquimáticas pueden producir otros linajes celulares como músculo y células neuronales (Ferrari et al., 1998; Kopen et al., 1999), lo que demuestra un alto grado de maleabilidad y plasticidad en éstas células. Bajo condiciones de estado estacionario, las células precursoras mesenquimáticas de la médula ósea llevan a la producción y mantenimiento de células maduras durante el lapso de la vida adulta (mesengénesis). Para realizar esta labor, las células precursoras mesenquimáticas deben exhibir una extensa capacidad de auto-renovación y amplio potencial de compromiso a diversos linajes (multipotencia).

In vitro, es posible crecer estas células mediante una estimulación adecuada. Dichas células en ciclo celular, crecidas y expandidas serán denominadas células progenitoras mesenquimáticas expandidas (MPC expandidas) a lo largo de esta tesis.

Las MPC expandidas presentan un fenotipo antigénico que no es único, poseyendo características tanto de células mesenquimáticas como de células endoteliales y epiteliales. Además, tienen la capacidad de producir numerosas citoquinas, así como también de elaborar moléculas de la matriz extracelular (Conget et al, 1999; Tavassoli et al., 1991; Chichester et al, 1993; Klein, 1995).

Estudios de ciclo celular de cultivos de MPC expandidas han revelado la presencia de una fracción de células (alrededor de 20%) que exhiben un patrón cuantitativo de RNA y DNA típico de células en reposo (G_0) (Conget et al., 1999). Estas células quiescentes, que las denominaremos como MPC G_0 , pueden ser aisladas mediante un procedimiento de selección negativa usando 5-fluorouracilo. El tratamiento con este agente origina una población conteniendo alrededor de un 90% de células en G_0 , las que expresan el gen de la antizima ornitina decarboxilasa, un marcador del estado celular no proliferativo. Esta condición de reposo, junto con un inmunofenotipo selectivo y la ausencia de expresión de marcadores de compromiso (diferenciación), sugiere que en los cultivos de MPC, subsiste una fracción de células mesenquimáticas en estado quiescente y que constituirían la contraparte *in vitro* de las células troncales mesenquimáticas (CFU-F o MSC). Estos hallazgos experimentales apoyan la hipótesis que una célula troncal mesenquimática, escasa en la médula ósea, posee la potencialidad de autorenovarse y diferenciarse a varios linajes mesenquimáticos (Prockop, 1997; Conget et al, 1999; Minguell, 2000).

Factor básico de crecimiento fibroblástico

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) constituyen una familia de al menos 20 proteínas homólogas (Koga et al., 1999; Coulier et al., 1997) que actúan en una variedad de células estimulando la mitogénesis o induciendo cambios morfológicos y diferenciación. Uno de ellos, el FGF-2 o FGF básico (bFGF), está involucrado en los procesos de desarrollo, reparación de heridas y angiogénesis, como también en tumorigénesis. Cinco isoformas de bFGF, con pesos moleculares 18, 21-22, 22,5, 24 y 34 kDa, son sintetizadas a través de procesos de iniciación traduccionales alternativos (Prats et al., 1989; Florkiewicz et al., 1989; Arnaud et al., 1999). Las isoformas difieren únicamente en su extremo amino terminal, el cual les confiere localización nuclear a las cuatro isoformas de alto peso molecular, en tanto que la proteína de 18 kDa posee únicamente una señal débil o críptica de destinación nuclear. Por esto, la isoforma de 18 kDa se encuentra localizada principalmente a nivel del citoplasma o en compartimentos extracelulares (Bugler et al., 1991; Quarto et al., 1991; Davis et al., 1997). Aparentemente, sólo la isoforma corta del bFGF (18kDa) puede ser liberada desde la célula, hecho que le permite interactuar con el receptor de bFGF (FGFR1) presente en la membrana plasmática. Se ha postulado que la producción y liberación de bFGF es modulada positivamente por 17 β -estradiol (Piotrowicz et al., 1997), en un proceso mediado por un tipo de las llamadas proteínas de estrés térmico (Devel et al., 1997; Piotrowicz et al., 1997).

Aunque los receptores de factores de crecimiento cumplen su función de transducción de señales fundamentalmente en la superficie de la célula, varias de estas proteínas de transmembrana son translocadas al núcleo luego de unir su(s) ligando(s). El receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR1) , al unirse a bFGF es translocado al núcleo y allí participa en la regulación de la proliferación celular (Reilly et al, 2001).

Factor de crecimiento de endotelio vascular

El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), también conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF) es una glicoproteína dimérica de 34 a 45 kDa. Como su nombre lo sugiere, el VEGF/VPF es un factor mitogénico en células endoteliales. Sin embargo, sus efectos no-mitogénicos son también importantes. Entre éstos se incluyen la quimiotaxis y la expresión de activadores de plasminógeno y colagenasas, los cuales facilitan la migración de nuevas células endoteliales. Otro efecto importante es la inducción de la permeabilidad vascular (Dvorak et al., 1995). VEGF también tiene efecto migratorio sobre otros tipos celulares como monocitos y osteoblastos fetales de bovino (Gabilovich et al., 1996).

Posible significado funcional de la producción de bFGF y VEGF en MPC

El desprendimiento y diseminación, en el organismo, de unas pocas células carcinogénicas desde el tejido primario de un tumor, es un evento que se conoce como micrometástasis. Este evento es considerado una prueba del potencial diseminativo de un tumor y, además, posee un valor diagnóstico independiente para identificar a pacientes con alto riesgo de recurrencia tumoral (Cote et al., 1991; Pantel, 1996).

La micrometástasis de células tumorales mamarias en la médula ósea es común en pacientes con cáncer de mama. En el momento del diagnóstico inicial, entre un 4 y un 48% de los pacientes con cáncer de mama presentan células tumorales en su médula ósea (Pantel et al., 1994; Pantel et al., 1996) y en presencia puede ser un factor de pronóstico de una recaída temprana, como también indicador del órgano o tejido que se verá potencialmente afectado por la recaída (Harbeck, 1994; Molino, 1997).

En la médula ósea, las células micrometastásicas están asociadas con células del estroma (Funke, 1996). Pareciera, por lo tanto, que elementos celulares del estroma o sus productos (citoquinas y matriz extracelular) constituyen un microambiente adecuado de destinación y anclaje de la célula micrometastásica. Esta suposición no es trivial, dada la abundancia de señales mitogénicas y reguladoras generadas por las células del estroma de la médula ósea (Fernández,

1996). Trabajos previos indican que la célula blanco de interacción con las células micrometastásicas sería la célula progenitora mesenquimática, un componente del estroma de médula ósea (Hombauer et al, 2000).

Se ha postulado que a consecuencia del anclaje de la célula micrometastásica en el microambiente de la médula ósea, la célula tumoral adquiere un estado de baja proliferación con cierta activación de eventos apoptóticos. Esta condición de "dormancia", descrita para otras células tumorales (Meltzer, 1990; Holmgren, 1995), permitiría la supervivencia de las células micrometastásicas en la médula ósea. Un cambio en el microambiente en el que se encuentra la célula micrometastásica, gatillaría la pérdida del estado de dormancia, generándose células en activa proliferación, con pérdida de las señales de control apoptótico. Esto llevaría al desarrollo de un tumor clínicamente detectable y progresivo (Folkman, 1995).

Sin embargo, no se conoce cuales serían los factores que modulan el cambio de dormancia a proliferación activa. Trabajos realizados en el laboratorio, junto a datos de la literatura, hacen suponer que la generación de factores de crecimiento tipo FGF y VEGF, podrían ser claves en el proceso. De allí la importancia de determinar si la célula precursora mesenquimática, célula con la cual interactúa la célula tumoral, produce los factores mencionados y bajo qué condiciones.

II. HIPOTESIS

La célula precursora mesenquimática puede expresar y/o localizar bFGF y VEGF, procesos que dependen del estado de crecimiento de ésta.

III. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión y localización de bFGF y VEGF en la célula progenitora mesenquimática, en su condición de célula expandida (en activo ciclo celular) o de célula en reposo (G_0).

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la expresión y/o localización de bFGF, VEGF y sus receptores en células precursoras mesenquimáticas.
2. Analizar cambios funcionales o proliferativos en las células precursoras mesenquimáticas, que signifiquen modificación en la producción o localización de los factores de crecimiento estudiados.

V. MATERIALES

5.1. Reactivos

5.1.1. Anticuerpos

- AcMo anti -bFGF (Ab-3), ratón IgG1 κ , Oncogene, Cat. GF22.
- AcPo anti -FGFR1, conejo, cortesía P. Maher, Scripps Institute, La Jolla, CA.
- AcPo anti -VEGF (Ab-4), conejo, Oncogene, Cat. PC315.
- Anti -conejo, conjugado a FITC, SIGMA, F-0511.
- Anti -ratón IgG, molécula completa, conjugado a FITC, SIGMA, F-3008.
- Anti -ratón conjugado a peroxidasa, Amersham Life Science.

5.1.2. Factores

- bFGF, human recombinant, SIGMA, No. F0291.
- 17 β -estradiol, SIGMA, No. E-8875.

5.1.3. Reactivos para cultivo celular

- Medio Minimum Essential Medium Alpha (α -MEM), Gibco BRL 12000-022.
- Gentamicina 80 mg/2ml, Laboratorios Astorga.
- Suero fetal bovino, Hyclone.

5.1.4. Enzimas

- Ribonucleasa A (EC 3.1.27.5), SIGMA, No. R-5503.
- Tripsina 1:250 de páncreas de porcino (EC 3.4.21.4), SIGMA, No. T-0646.

5.1.5. Proteínas

- Albúmina sérica de bovino (BSA) fracción V, SIGMA, No. A-2153.

5.1.6. Reactivos químicos

- Ácido clorhídrico fumante 37% p.a., Merck 317.
- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), SIGMA, No. H-9136
- Acrilamida, SIGMA, No. A-9099.
- Anaranjado de acridina, SIGMA, No A-6014.
- Azul de bromofenol, USB, US12370.
- Azul Tripán, tinción 0,4%, SIGMA, No. T-6154.
- β -Mercaptoetanol, Merck 15433.
- Bis-acrilamida, SIGMA, No. M-7279.
- Citocalasina B, SIGMA, No. C-6762.
- Cloruro de magnesio, Merck 5833.
- Cloruro de potasio, p.a., Merck 4336.

- Cloruro de sodio, p.a., Merck 6404.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), SIGMA, No. D-5879
- Dodecil sulfato de sodio (SDS), Calbiochem, Cat. 428023.
- DTT, USBiological, Cat. D8070.
- Etiléndiamino tetraacético disódico dihidratado (EDTA), SIGMA, No. E-4884.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), SIGMA, No. P-7626.
- Formaldehído 37%, Merck 4003.
- Fosfato dibásico de potasio, p.a., Merck
- Fosfato dibásico de sodio, p.a., Merck 6580.
- Fosfato monobásico de sodio, p.a., Merck 6343.
- Glicina, SIGMA, No. G-7126.
- Hidróxido de sodio, p.a., Merck 6498.
- Histopaque-1077, SIGMA, No. 1077-1.
- Inhibidor de tripsina, SIGMA, No. T-9777.
- Ioduro de propidio (PI), SIGMA, No. P-4170.
- Isobutanol, Merck 15433.
- Leupeptina, USBiological, Cat. L2050.
- Marcador de peso molecular, Amersham, RPN 800.
- Metanol, TCL.
- N-etilmaleimida (NEM), SIGMA, No. E-1271.
- Nonidet (NP-40), SIGMA, No. N-6507.
- Pepstatina A, USBiological, Cat. P3280.
- Sacarosa, Merck.

- TEMED, SIGMA, No. T-9281.
- Tris, p.a., Merck 8382.
- Trizma base, SIGMA, No. T-1503.

5.1.7. Otros

- BioMax Film MR, Kodak, Cat. 8701302.
- ECL, Amersham Life Science biotech, RPN 2108.
- Human bFGF Accucyte EIA, Oncogene, Cat. QIA67.
- Inmuno-Blot PDVF Membrane, BioRad, Cat. 162-0176.
- Rhodamine 123, Sigma, No. R-8004.
- Trihidrocloruro de bisbenzamida H 33342 (Ho), Calbiochem, Cat. 382065.

5.2. Soluciones

5.2.1. Tampones biológicos

- PBS: 15mM KH_2PO_4 , 81 mM Na_2HPO_4 , 1,4M NaCl, 27 mM KCl, pH 7,4.
- TBS: 0,14M NaCl, 2,68mM KCl, 25mM Tris base, pH 8,0.

VI. MÉTODOS

6.1. Obtención de cultivos expandidos de MPCs

A partir de remanentes de aspirados de médula ósea (donantes normales, trasplantes alogéneos, Lab. Criopreservación, Clínica Las Condes) se preparan MPC, según protocolo (Conget et al., 1999). Brevemente, células mononucleadas sembradas en medio de cultivo conteniendo 20% suero fetal, originan una monocapa adherente (post 3–4 subcultivos) formada por células homogéneas con características morfológicas, inmunofenotípicas y funcionales de células mesenquimáticas (MPC expandidas) (Minguell, 2001).

6.1.1. Preparación de MPCs G_0

A partir de cultivos expandidos de MPC se aísla, por selección negativa con 5-fluorouracilo (Conget et al., 2001), una subpoblación de células adherentes, en reposo proliferativo (G_0) y sin compromiso de diferenciación (uncommitted) (MPC G_0).

Experimentalmente, estas células seleccionadas son analizadas en dos situaciones:

a) aquellas que denominaremos MPC G_0 pre-adhesión, son las células adherentes al término del período de selección y que poseen las propiedades descritas por Conget et al (2001).

b) las células anteriores, luego de procesos de tripsinización, resuspensión y sembrado en placas o sobre cubreobjetos. Después de un período de adhesión de no más de 12 horas, estas son denominadas MPC G₀ post-adhesión.

6.2. Cultivos celulares

Las células se plaquean a una densidad de $1,8 - 3,5 \cdot 10^5$ cel./cm², en placas de cultivo de 100 mm con 8 ml de medio de cultivo completo (α -MEM suplementado con 10% SF).

Las células se cultivan en un incubador a 37° C con atmósfera controlada conteniendo 5% de CO₂. Después de dos días en cultivo, el medio junto con las células no adheridas es removido y es reemplazado por medio de cultivo completo fresco. Durante todo el proceso de incubación, el medio se cambia cada dos días.

6.2.1. Subcultivo de MPC expandidas y G₀

Para subcultivar las células una vez alcanzada la confluencia, es necesario la obtención de células en suspensión. Las células se liberan de la placa de cultivo mediante un tratamiento suave con una solución de tripsina 0,05% que contiene 0,02% EDTA, en PBS. Luego de incubar las células con esta solución por 5 a 10 minutos a 37°C (hasta que se desprendan del soporte), se bloquea el efecto de la tripsina-EDTA, por adición de dos volúmenes de medio de cultivo completo. Tras

centrifugar a 500x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, el pellet se resuspende en medio α -MEM suplementado con 10% SF y las células se vuelven a sembrar y cultivar.

6.2.2. Recuento y viabilidad celular

El número de células se determinó mediante el recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer). La suspensión de células a contar, se diluye en una solución de Azul Tripán, para determinar la viabilidad celular.

Para estudios por citometría de flujo, la determinación de viabilidad se realizó utilizando yoduro de propidio (PI).

6.2.3. Criopreservación

Las MPCs obtenidas en las condiciones descritas anteriormente, pueden ser criopreservadas con el objeto de mantener una reserva de muestras. Para esto, las MPCs se liberan de la placa de cultivo mediante un tratamiento suave con una solución de tripsina-EDTA por 5 minutos a 37°C. Se neutraliza el efecto de la tripsina-EDTA agregando medio de cultivo completo y se centrifuga a 500x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet se resuspende a una densidad de $1 \cdot 10^6$ cel./ml en la solución de criopreservación fría, que consiste en 80% suero fetal, 10% medio de cultivo completo y 10% dimetilsulfóxido (DMSO). Se distribuye 1 ml

de solución en cada tubo de criopreservación y se congela mediante el descenso gradual de la temperatura hasta alcanzar -196°C . Las células criopreservadas se almacenan en N_2 líquido.

6.3. Inmunocitoquímica

6.3.1. Inmunocitoquímica mediante microscopía de fluorescencia

Las células crecidas sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 2 cm^2 , se lavan dos veces con PBS y se fijan con formaldehído al 1% en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizan dos lavados de 10 minutos con PBS-2% SF. Para los antígenos de superficie, se incuba con el 1er. anticuerpo por 1 hora a 4°C . Se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS-2% SF y se incuba con el 2do. anticuerpo por otra hora a 4°C . Posteriormente, se lava una vez con PBS-2% SF, una vez con PBS y, finalmente, una vez con H_2O destilada.

Para estudiar la expresión de antígenos intracelulares (FGF, VEGF, vimentina), luego de la fijación con formaldehído se permeabiliza con etanol 70%, frío, manteniendo 10 minutos en hielo. Luego de dos lavados de 10 minutos con PBS-2% SF, se procede a incubar con el anticuerpo primario, continuando como se describiera para los antígenos de superficie.

En algunos experimentos, además de marcar los antígenos en estudio, se procedió a teñir los núcleos de las células con bisbenzimidida (Hoescht, Ho); este paso se realizó luego del lavado con PBS-2% SF posterior a la incubación del segundo anticuerpo. Se agregó la solución Ho (1µg/ml) y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Luego se procedió a lavar con PBS-2% SF, seguido por un lavado con PBS solo y otro con H₂O destilada.

En todos los casos, los cubreobjetos se colocaron – con las células dirigidas hacia el interior- sobre portaobjetos, utilizando para ello medio de montaje, y se los analizó por microscopía de fluorescencia.

6.3.2. Inmunocitoquímica mediante citometría de flujo

Para analizar la expresión de antígenos de superficie en células que fueron soltadas de la placa mediante tripsinización, se las deja una hora recuperándose a 37°C en medio de cultivo.

Se toma una alícuota que contiene aproximadamente 300.000 células y se centrifuga a 500x g por 10 minutos a 25°C. Para antígenos de superficie, se resuspende el pellet en 500 µl de PBS 2% SF, se centrifuga a 500x g durante 10 minutos a 25°C y se incuba con el 1^{er} anticuerpo 1 hora a 4°C. Luego se agrega 500 µl de PBS 2% SF y se centrifuga a 500x g durante 10 minutos. Se incuba con el 2^o anticuerpo 1 hora a 4°C y se lava con PBS 2% SF. Las células son fijadas en

formaldehído 0,5% en PBS. A la brevedad, son analizadas por citometría de flujo, con el programa Facscalibur.

Para estudiar antígenos intracelulares, se permeabilizan las células agregando etanol 70%, frío, gota a gota y con agitación constante para evitar la formación de agregados celulares. Se dejan las células en hielo por 10 minutos. Se centrifuga a 500x g durante 15 minutos y se resuspenden en PBS 2% SF. Se vuelve a centrifugar para eliminar el exceso de etanol. En este momento, las células son incubadas con los anticuerpos respectivos y procesadas para su análisis por citometría de flujo.

6.4. Análisis de ciclo celular

El análisis de ciclo celular se determinó por citometría de flujo, usando yoduro de propidio (PI), fluorocromo que se une a ácidos nucleicos. Previo a analizar el contenido de ADN de la población en estudio, se calibró el equipo (sensibilidad y capacidad de discriminar agregados) con suspensiones de eritrocitos de pollo y de carnero, previamente teñidos con PI.

Experimentalmente, las células son lavadas dos veces con PBS. Luego, se resuspenden en una solución PI (0,05 mg/ml) en citrato 0,1% a razón de 1 ml por millón de células. Al mismo tiempo, se agrega 20 µl de RNasa (Ribonucleasa A, de concentración 0,2 mg/ml en 10 mM Tris-HCl, pH 7,5). Se incuba por 30 minutos a

4°C, en oscuridad. De esta manera, la suspensión con los núcleos marcados con PI, es analizada por citometría de flujo.

Las células con una intensidad de fluorescencia de 1, corresponden a células en fase G₀-G₁ del ciclo celular, las células con una señal fluorescente de 2, corresponderán a aquellas que han duplicado su material genético, ubicándose en las fases G₂-M del ciclo, y aquellas células con intensidad intermedia, entre las anteriores, se encuentran en fase S.

6.5. Análisis de células en G₀

La tinción con anaranjado de acridina (Acridine Orange, AO), permite determinar simultáneamente el contenido de DNA y RNA en las células. Al ser excitado a 488nm, AO exhibe características espectrales de emisión distintas cuando se une a DNA o a RNA, produciendo una fluorescencia verde o roja, respectivamente. Una condición en la que el contenido de DNA es igual a 2n y con bajo contenido de RNA, indica presencia de células en estado quiescente.

Las células se tripsinizan y resuspenden en PBS-SF 2% a una concentración de 2·10⁶ células/ml. Luego, se incuban con una solución de permeabilización y denaturación de ácidos nucleicos (0,1% Triton X-100, 80 mM HCl, 0,15M NaCl; 2·10⁶ células/ml) por 15 segundos a 4 °C y con la solución de tinción (6 µg/ml anaranjado de acridina, 1 mM EDTA-Na, 0,15M NaCl, 0,2M NaPO₄, 0,1M buffer ácido cítrico, pH

6,0; 1 ml/10⁶ células) por 2 min a 4°C. Durante los siguientes 8 min, las células se analizan en citómetro de flujo (Traganos et al, 1977).

Las células quiescentes G₀ corresponden a aquellas normoploides (2n, 2c) con un bajo contenido de RNA. Las células en ciclo celular (fases activas) corresponden a células normoploides con contenido variable de DNA y RNA.

Para determinar el estado oxidativo de las mitocondrias, lo que nos da un indicio indirecto de su estado metabólico, utilizamos rodamina (Rhodamine 123) (Rho). Esta rodamina ha sido calificada como un colorante mitocondria-específico puesto que el colorante catiónico cianino es acumulado en compartimentos eléctricamente negativos tales como las mitocondrias en células saludables. Agentes desacoplantes e inhibidores reducen la fluorescencia mitocondrial. Por lo tanto, células en estado mitocondrial oxidativo darán una señal fuerte para rodamina, mientras que aquellas células con estado mitocondrial reductor darán una señal débil.

Las células se incuban durante 45 minutos a 37° C en una solución con rodamina (0,1 µg/ml) en buffer HBSS (20 mmol/l HEPES, 1g/l glucosa y 10% SF). Luego, se enfría a 4° C y se lava dos veces con buffer HBSS a 4°C. Finalmente, se resuspende el pellet en buffer HBSS y se mantiene a 4° C hasta su lectura por citometría de flujo.

6.6. Expresión de bFGF por Western Blot

6.6.1. Obtención de proteínas solubles

Las células adheridas a la placa de cultivo de 10mm, fueron lavadas una vez con PBS y se agregó 300 μ l de solución de lisis (0,05 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 1% NP40 y 1% Triton X-100, a pH 7,4). Al momento de realizar la lisis se agregan los inhibidores de proteasas: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y N-etilmaleimida (NEM). El material es mantenido en hielo con agitación, por 20 minutos, seguido por resuspensión y centrifugación a 1.500 g por 15 minutos. El sobrenadante es guardado a -20°C. Una alícuota de la fracción soluble se usó para cuantificar proteínas según el método de Lowry.

6.6.2. Obtención de proteínas nucleares:

Las células crecidas sobre placas de cultivo de 100 mm fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas durante 40 minutos a 37°C en α -MEM con citocalasina B (10 μ M). Luego, fueron lavadas nuevamente con PBS, resuspendiendo las células mediante raspado y repipeteado a través de una pipeta de 10 ml. Las células recolectaron por centrifugación a 800x g durante 5 minutos.

El pellet se lava con la solución 1x NB (10 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatina, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml inhibidor de tripsina), centrifugando a 800x g por 5 minutos. El pellet se coloca en hielo, se resuspende en NB con citocalasina (1x NB, 10 μ M citocalasina B) y se

incuba durante 20 minutos sobre hielo. Luego, las células se transfieren a un homogeneizador Weaton de vidrio de 1 ml, previamente enfriado, y sus membranas plasmáticas se rompen mediante 20 golpes suaves. La eficiencia de la ruptura celular se monitorea por microscopía de contraste de fase. El homogeneizado se transfiere a un tubo Eppendorf y se colocan 200 μ l de una solución colchón de sacarosa (10 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatina, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml inhibidor de tripsina, 40% sacarosa) en el fondo del tubo. Se centrifuga a 800 g por 15 minutos, se aspiran el sobrenadante y el colchón de sacarosa. El pellet, que consiste de núcleos intactos (observados por microscopía de contraste de fase y contaminados en menos de un 10% a juzgar por la actividad de LDH según el protocolo utilizado, Kihlmark et al, 1998), se lisa utilizando buffer RIPA (0,5% DOC, 1% SDS, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,0) con inhibidores de proteasas PMSF y NEM. Las muestras se guardan congeladas a $-20^{\circ}C$.

6.6.3. Condiciones del Western Blot

Los extractos proteicos fueron tratados bajo condiciones reductoras. Para esto se calentaron las muestras, 5 minutos a $100^{\circ}C$ en buffer de carga (240mM Tris-HCl, 8% SDS, 40% glicerol y 0,001% indicador azul de bromofenol), en presencia de un 5% (v/v) de β -mercaptoetanol.

Se prepararon geles de acrilamida al 8% o 12% y por carril (cuando fue posible cuantificar la cantidad de proteína) 30µg de proteínas, o bien 60µl cuando la proteína presente representaba sólo una pequeña fracción comparada con los inhibidores de proteasas. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente a 100V durante aproximadamente 4,hrs., hasta poco antes que el frente salga del gel.

A continuación de la electroforesis, se realizó la transferencia desde los geles a membranas PDVF. El buffer de transferencia contenía 50 mM Tris, 190 mM Glicina, 20% Metanol y 0,1% SDS. La transferencia se realizó a 90V, por 90 minutos a 4°C.

Los sitios de unión inespecífica en las membranas fueron bloqueados con una solución de saturación (blocking reagent ECL o TBS-1% BSA) por 1 hora a temperatura ambiente.

6.6.4. Marcaje de membranas electrotransferidas

Las membranas fueron ensayadas para la identificación de bFGF. Se incubó con el 1er. anticuerpo 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se realizó tres lavados con TBS-Tween (0,05% Tween 20) de 10 minutos cada uno.

Luego, se incubó con el 2do. anticuerpo (anti-ratón conjugado a peroxidasa) por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego de realizar 3 lavados con TBS-Tween, se revela la membrana usando un kit de quimioluminiscencia (ECL) exponiendo posteriormente a un film fotográfico por 1 a 5 minutos.

6.6.5. Análisis de las bandas obtenidas

La determinación del peso molecular y la estimación cuantitativa de la cantidad de proteína presente en las bandas obtenidas por Western Blot, fue realizada por densitometría, utilizando el programa de Kodak Digital Science, 1D Image Analysis Software versión 3.0.

En el caso del peso molecular, se utilizó como estándar la migración de un marcador de pesos moleculares de amplio rango (15 a 250 kDa) y el de proteína bFGF recombinante de 16,4 kDa. La estimación de la cantidad de proteína presente en cada una de las isoformas de bFGF se realizó teniendo en cuenta que la carga de proteína estándar fue de 10 ng.

6.7. Cuantificación de bFGF en medios condicionados

6.7.1 Obtención de medios condicionados

Los medios condicionados de MPC expandidas se obtuvieron de placas de cultivo con 20 000 células/cm² cultivadas en 10% SF o 0,5% SF, los cuales fueron reemplazados por los respectivos medios frescos 24 horas antes de la obtención del medio condicionado. Para el estudio de la condición MPC expandida en 10% SF a 4°C, las células fueron incubadas durante 2 horas a 4°C previo a la recolección de

medios. Los medios fueron recolectados y almacenados a -20°C en presencia de PMSF y NEM, para inhibir la acción de proteasas, hasta su utilización.

En los casos de las MPC G_0 pre-adhesión y post-adhesión, las placas de cultivo tenían 9 000 células/ cm^2 y 6 000 células/ cm^2 , respectivamente; y las células se cultivaron en medio con 10% SF.

6.7.2. Cuantificación de bFGF

Los medios condicionados recolectados fueron cuantificados utilizando un kit de detección de bFGF humano, Accucyte EIA. Se siguieron las especificaciones del kit para muestras biológicas provenientes de cultivos de tejidos y sobrenadantes. Los resultados obtenidos tras la lectura a 490 nm fueron trazados en un gráfico semilogarítmico para su posterior análisis.

VII. RESULTADOS

A. Estudios con MPC expandidas

7.1. Efecto de la concentración de suero fetal sobre las MPC expandidas

7.1.1. En proliferación

Con el fin de determinar el efecto de la concentración de suero fetal en la proliferación de las MPC expandidas, se cultivaron células en presencia de 10, 1 y 0,5% SF durante 4 días. En la figura 1 se observa la diferencia en el crecimiento a distintas concentraciones de suero.

Observamos que la proliferación de las células es dependiente de la concentración de suero fetal, ya que al cabo de cuatro días, las células crecidas en presencia de 10% SF han aumentado su número en casi 9 veces, mientras que las células crecidas en 1% SF lo han hecho 2,5 veces y aquellas en 0,5%, prácticamente no proliferaron.

7.1.2. En ciclo celular

A células cultivadas en presencia de distintas concentraciones de suero fetal se les realizó un análisis de ciclo celular, para determinar el efecto del suero fetal en la distribución de las fases del ciclo.

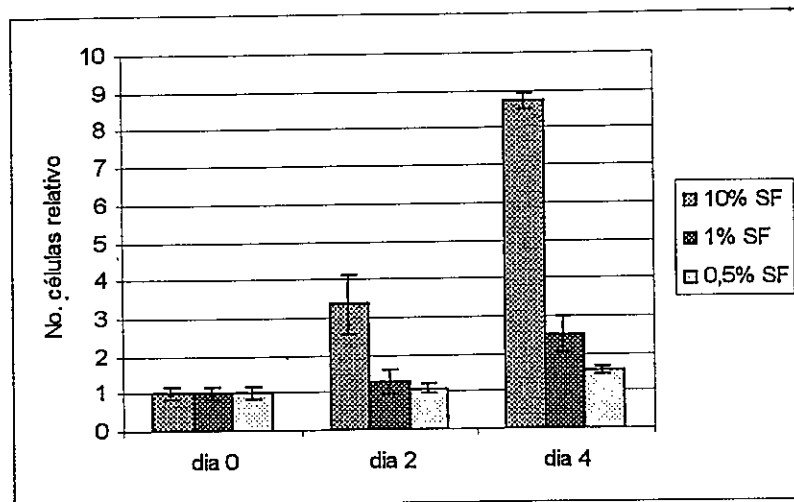


Figura 1: Efecto de la concentración de suero en la proliferación de las MPC expandidas. La figura muestra las cantidades de células obtenidas luego de cultivarlas en presencia de diferentes concentraciones de suero fetal, por los tiempos señalados. Los resultados se expresan relativos al número de células presentes el día 0, valor que se considera igual a 1. Las barras muestran la desviación estándar (n=3).

Ciclo celular (%)	DIA 0			DIA 2				DIA 4		
	10% SF	10% SF	10% SF	10% SF	1% SF	0,5% SF	10% SF	1% SF	0,5% SF	
Go/G1	39,48	49,67	86,37	86,24	79,32	89,44	89,98			
S	60,34	45,17	6,74	13,21	16,06	6,32	6,04			
G2/M	0,18	5,16	6,89	0,55	4,62	4,24	3,98			

Tabla 1: Efecto de la concentración de suero en la fase del ciclo celular en que se encuentran las MPC expandidas. Los valores muestran el porcentaje de células que se encuentran en la fase del ciclo indicada según análisis de citometría de flujo.

La distribución de células en cada fase del ciclo celular varía de acuerdo con la concentración de suero, como se observa en la tabla 1. A menor concentración de suero, mayor la tendencia de las células a establecerse en las fases G₀/ G₁. Observamos que en el caso de las células crecidas en 10% SF al día 4 el porcentaje de células en G₀/ G₁ aumenta aun 79%. Esto se debe a que las células han alcanzado un estado de confluencia, en el cual presentan inhibición por contacto, lo que no ocurre en el caso de las células en condiciones de 1 y 0,5% SF al tiempo de cultivo equivalente.

Este resultado, sumado a las observaciones de la proliferación, nos permite establecer una MPC expandida en condición de crecimiento en medio suplementado con 10% SF y otra en condición de no-crecimiento: MPC expandidas crecidas en medio de cultivo suplementado con 1 o 0,5% SF.

7.2. Producción de factores angiogénicos por MPC expandidas

7.2.1. Inmunocitoquímica para detección de bFGF, FGFR1 y VEGF.

Con el fin de determinar la presencia de factores angiogénicos en MPC expandidas en proliferación y reposo proliferativo, se analizó la expresión de superficie e intracelular de bFGF, VEGF y FGFR1. Los estudios se realizaron luego de 2 días de cultivo de las MPC expandidas en condiciones de proliferación (10% SF) y no-proliferación (0,5% SF).

En la figura 2 se observa la localización de bFGF en las MPC expandidas en 10% SF (figura 2A (antígeno) y 2C (Ho)), en la cual se puede apreciar un patrón de marcación intenso en el núcleo y tenue en el citoplasma. Las MPC expandidas en 0,5% SF (figura 2B (antígeno) y 2D (Ho)), carecen de bFGF nuclear y a nivel de citoplasma la presencia de bFGF es prácticamente nula.

Esta variación en el patrón de expresión de bFGF también se presenta en el caso de su receptor, FGFR1 (figura 3). En las MPC expandidas en 10% SF (figura 3A (antígeno) y 3C (Ho)), se observa la presencia de FGFR1 de manera homogénea en la célula, con marcación tanto en la membrana como en el núcleo. Esta homogeneidad varía tan solo en aquellas células que se encuentran en proceso de mitosis, donde la intensidad de fluorescencia es mayor. Las MPC expandidas en 0,5% SF (figura 3B (antígeno) y 3D (Ho)) presentan una marcación tenue a nivel citoplasmático y casi nula a nivel nuclear.

En el caso de VEGF (figura 4), este factor está presente en MPC expandidas mantenidas bajo ambas condiciones de cultivo, se puede observar que en el caso de las células crecidas en presencia de 10% SF, la marca del factor aparece distribuido algo más heterogéneo en el citoplasma.

MPC exp 10% SF

MPC exp 0,5% SF

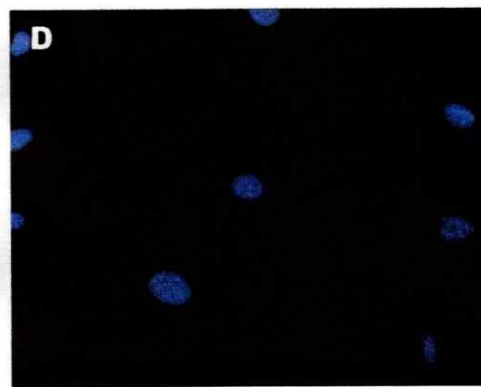
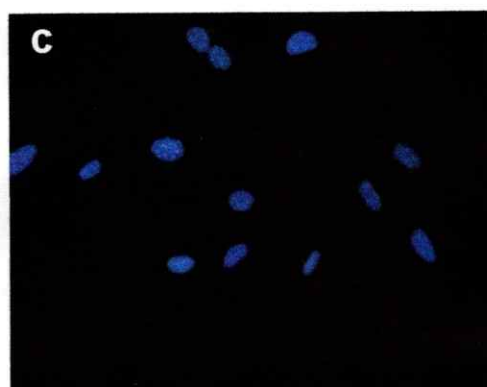
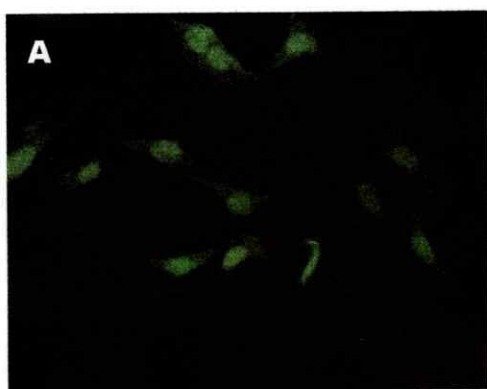


Figura 2: Distribución de bFGF en MPC expandidas según microscopía de fluorescencia doble. MPCs cultivadas en medio de cultivo completo (10% SF) (A y C) o en medio de cultivo 0,5% SF (B y D). Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia indirecta para bFGF (A y B) y sus núcleos contrateñidos con Ho (C y D) (400x).

MPC exp 10% SF

MPC exp 0,5% SF

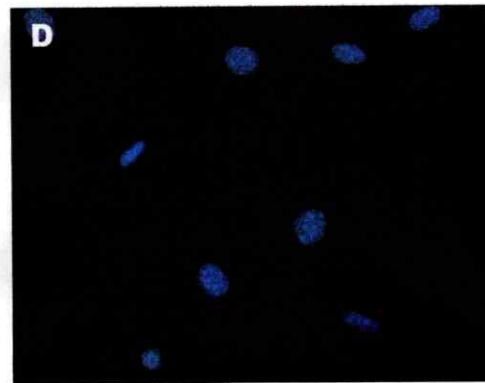
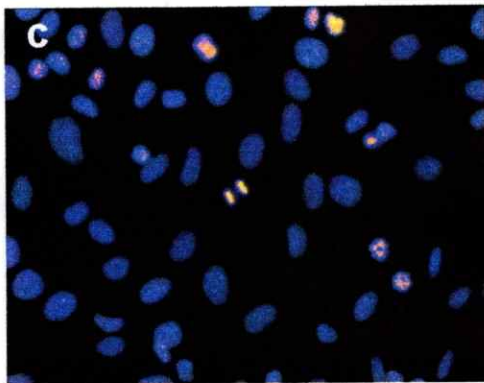
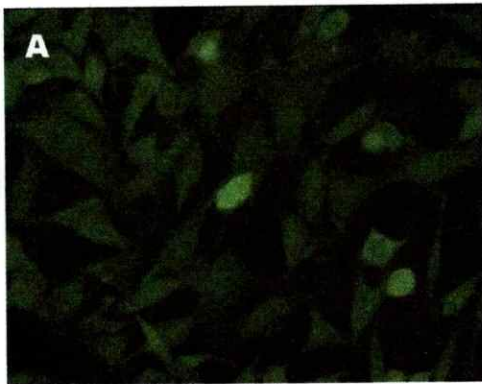


Figura 3: Microscopía de fluorescencia para FGFR1 en MPC expandidas. MPCs cultivadas en medio de cultivo completo (10% SF) (A y C) o en medio de cultivo 0,5% SF (B y D). Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia indirecta para FGFR1 (A y B) y sus núcleos contrateñidos con Ho (C y D) (400x).

MPC exp 10% SF

MPC exp 1% SF

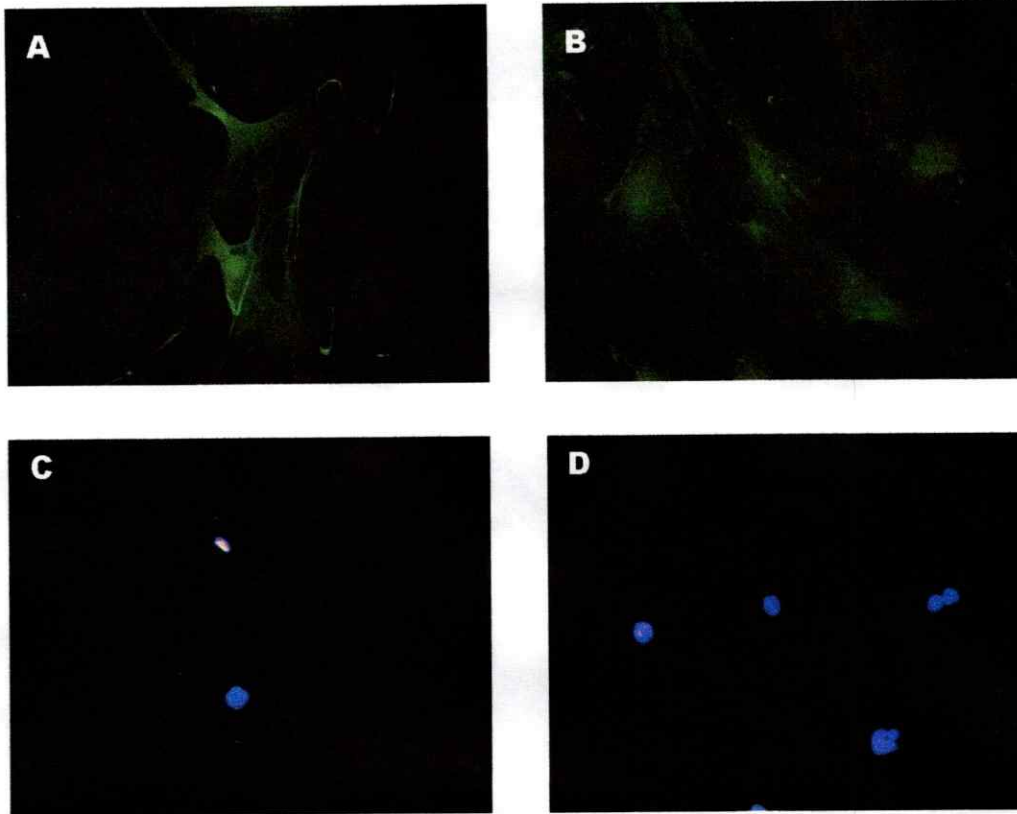
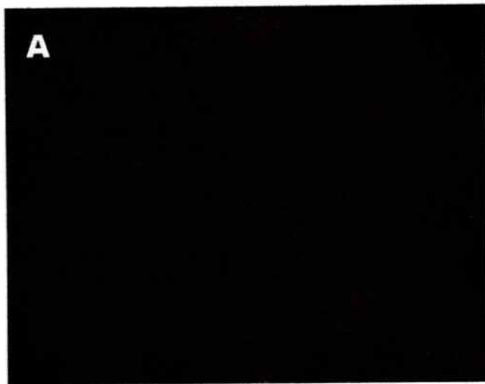


Figura 4: Microscopía de fluorescencia para VEGF en MPC expandidas. MPCs cultivadas en medio de cultivo completo (10% SF) (A y C) o en medio de cultivo 1% conteniendo SF (B y D). Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia indirecta para VEGF (A y B) y sus núcleos contrateñidos con Ho (C y D) (400x).

MPC control anti-mouse



MPC control anti-rabbit

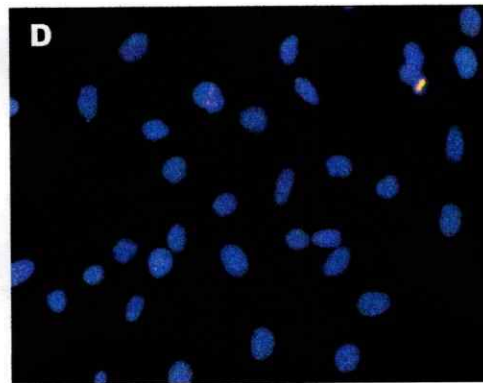
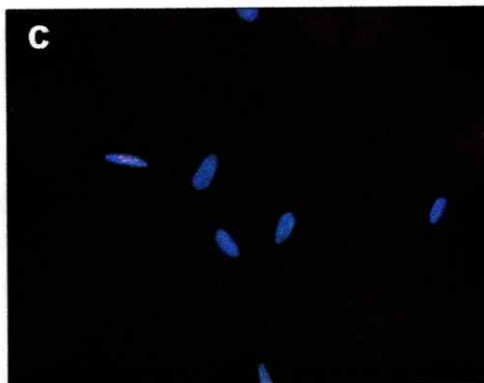


Figura Control: Control negativo para microscopía de fluorescencia en MPCs. MPCs incubadas con el anticuerpo secundario anti-mouse (A) y anti-rabbit (B) en ausencia de anticuerpos primarios. Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia indirecta para FITC (A y B) y sus núcleos contrateñidos con Ho (C y D) (400x).

7.3. Estudio de estímulos que puedan modificar la distribución de bFGF y VEGF en MPC expandidas

7.3.1. Efecto de 17 β -estradiol

Para determinar si 17 β -estradiol es capaz de modificar la distribución intracelular de bFGF en MPCs, tal como ha sido descrito para otros tipos celulares, se realizó un estudio con células cultivadas durante 5 días con 1% SF en presencia de 17 β -estradiol (100 nM), concentración descrita anteriormente en la bibliografía. Tras 5 días de cultivo de las células en medio 1% SF, las células deberían estar sobre 90% en fase G₀/G₁ del ciclo celular; vale decir; la fracción de células proliferantes (S + G₂/M) debería ser menor al 10%.

7.3.1.1. En proliferación

Primero se determinó si el estradiol produce algún efecto a nivel de la proliferación de las MPC, afectando el tránsito de MPC de G₀/G₁ a S + G₂/M. Luego de 5 días de cultivo, se observó que el número de MPCs que se encontraban bajo el estímulo de 17 β -estradiol, no varía con respecto a MPC cultivadas en ausencia de estradiol (1% SF) (Figura 5), lo que sugiere que el esteroide no afecta la proliferación de las MPCs. Aunque nos fue imposible encontrar la concentración de estradiol presente en el suero fetal utilizado, otras fuentes indican que la concentración máxima es alrededor de 25 pg/ml, concentración que no debiera ser suficiente para saturar los receptores.

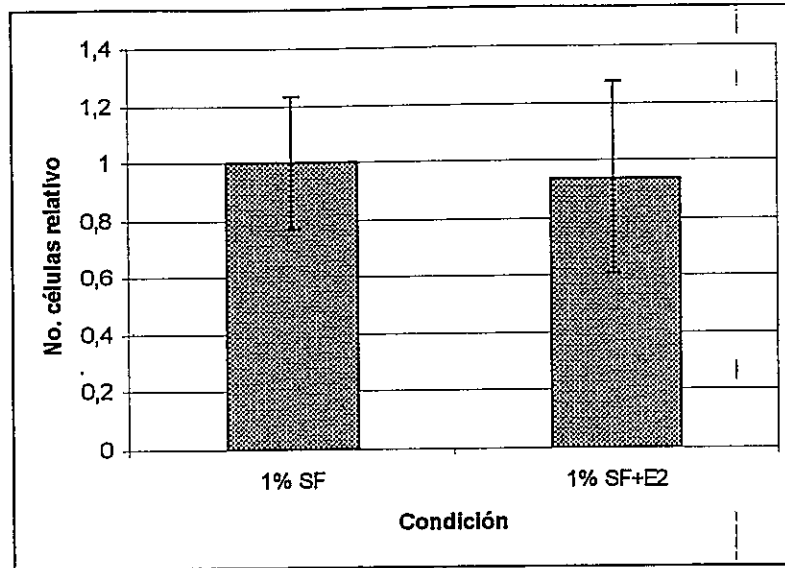


Figura 5: Efecto de estradiol sobre la proliferación de las MPCs. Las células fueron cultivadas en las condiciones indicadas durante 5 días, al cabo de los cuales se realizó el recuento de células. Los resultados se presentan en relación al número de células presentes para la condición 1% SF, valor que se considera igual a 1. Las barras muestran la desviación estándar (n=4).

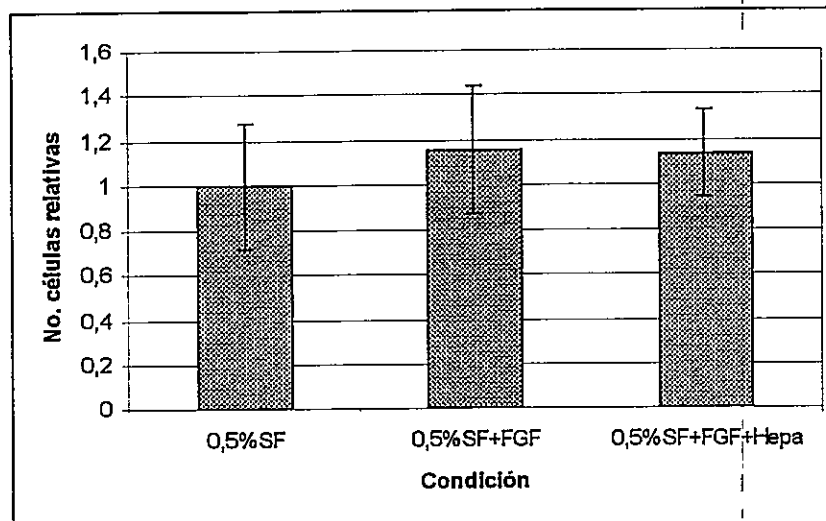


Figura 6: Efecto de bFGF exógeno sobre la proliferación de las MPCs. Las células fueron cultivadas en las condiciones indicadas durante 4 días, al cabo del cual se efectuó recuento celular. Los datos se presentan en relación al número de células presentes en la condición 0,5% SF, valor que se hace igual a 1. Las barras muestran la desviación estándar (n=3).

7.3.1.2. En distribución de factores angiogénicos

Con el fin de determinar si la presencia de estradiol produce un efecto movilizador de los factores de crecimiento de nuestro interés en las MPCs, se realizó inmunocitoquímica para microscopía de fluorescencia.

Encontramos que estradiol no altera la distribución de bFGF ni de VEGF (Figura 7 y 8), lo que es diferente a lo indicado en la literatura para otros tipos celulares. La presencia de bFGF continua siendo intensa a nivel nuclear y la intensidad de VEGF se mantiene a nivel citoplasmático.

7.3.2. Efecto de bFGF exógeno

Con el fin de determinar si la presencia de bFGF exógeno en el medio de cultivo de las MPC altera las características de crecimiento de la célula y a la vez la distribución intracelular de bFGF, se cultivaron células en presencia de éste factor. En algunos experimentos se estudió una condición en la cual además de la incorporación de bFGF exógeno, se colocó heparina, con el fin de alterar la biodisponibilidad de bFGF.

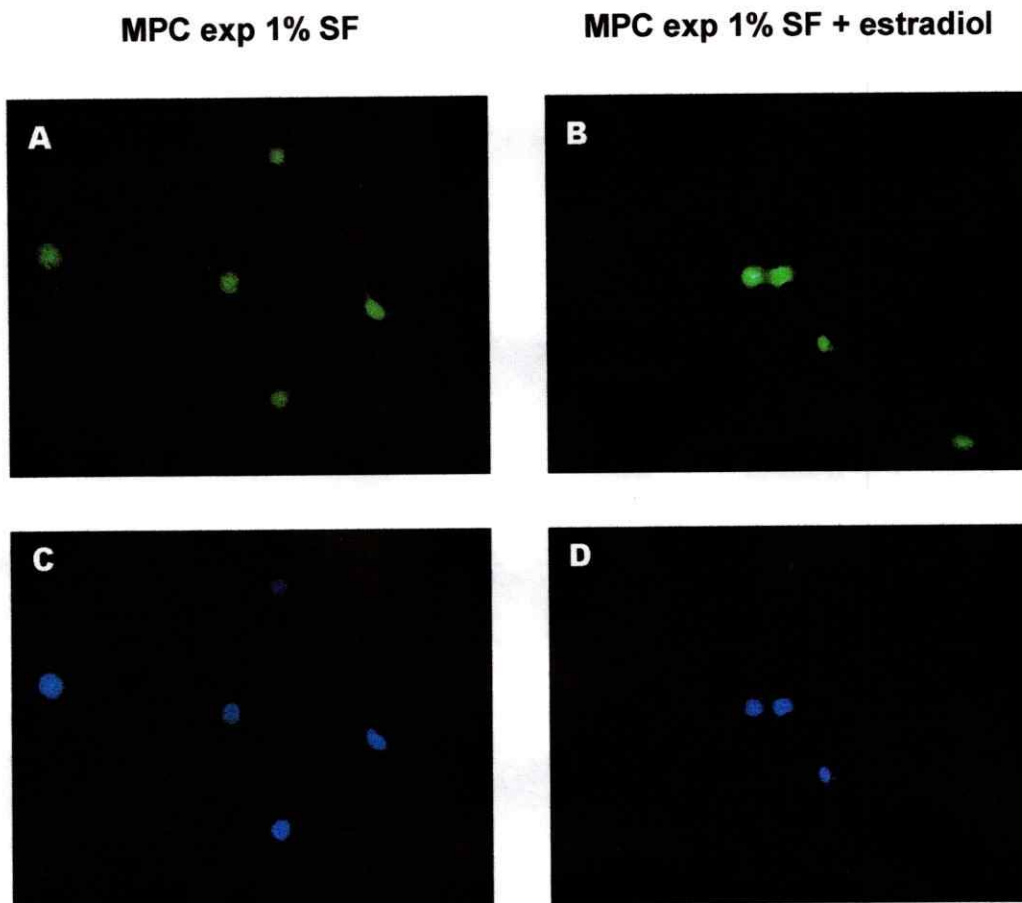


Figura 7: Distribución de bFGF en MPC expandidas expuestas a estradiol según microscopía de fluorescencia. MPCs cultivadas durante 5 días en medio de cultivo con 1% SF sin (A y C) y con adición de estradiol (100nM)(B y D). Las células fueron analizadas para bFGF (A y B) y sus núcleos contrateñidos con Ho (C y D) (400x).

MPC exp 1% SF

MPC exp 1% SF + estradiol

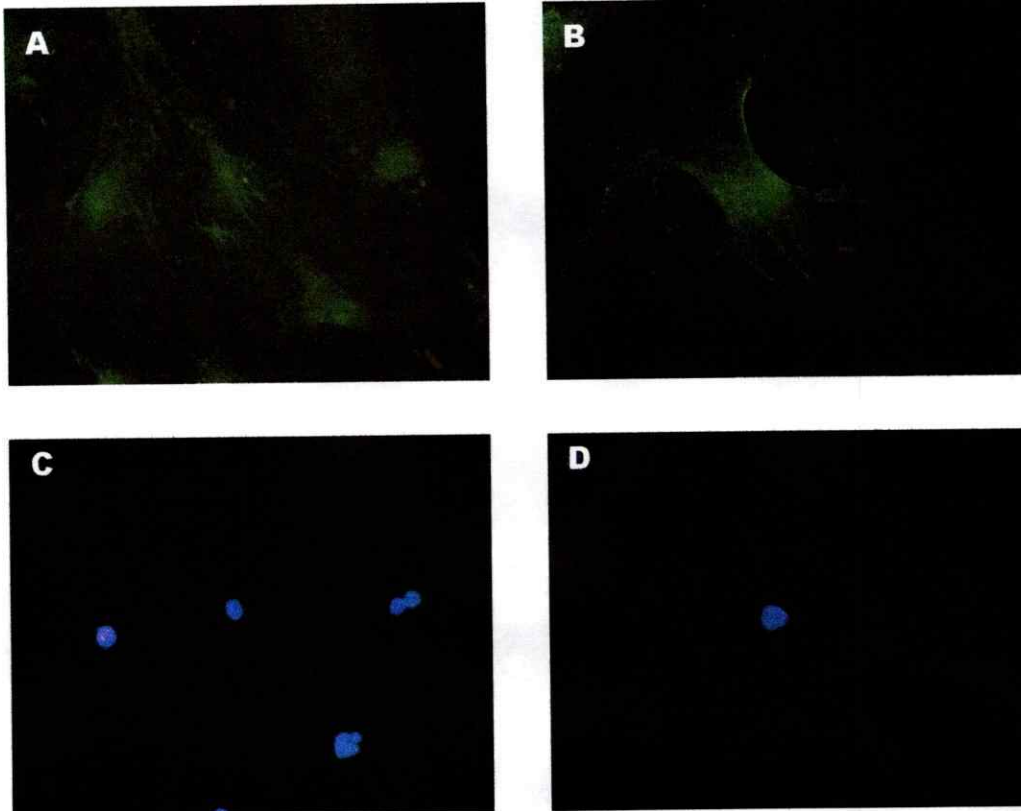


Figura 8: Distribución de VEGF en MPC expandidas expuestas a estradiol según microscopía de fluorescencia. MPCs cultivadas durante 5 días en medio de cultivo 1% SF sin (A y C) y con adición de estradiol (100nM)(B y D). Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia para VEGF (A y B) y sus núcleos contrateñidos con Ho (C y D) (400x).

7.3.2.1. En proliferación

Tras 4 días de cultivo de MPCs en presencia de bFGF, se observa que bFGF exógeno produce una pequeña variación en la proliferación, con respecto a la situación control que contiene 0,5% SF (figura 6), al igual que la condición que contiene heparina. Este aumento de proliferación (10%), no es significativo considerando el margen de error (indicado en las respectivas barras de la figura 6), lo que sugiere que el bFGF exógeno no afecta la proliferación de las MPCs.

7.3.2.2. En ciclo celular

A células cultivadas en medio 0,5% SF en presencia y ausencia de bFGF se les realizó un análisis de ciclo celular, para determinar si el contacto con el factor exógeno produce cambios en la distribución de las fases del ciclo celular. Encontramos que la presencia de bFGF exógeno no produce ningún efecto en la distribución del ciclo celular. El resultado para esta condición es igual al descrito en la Tabla 1 para MPC expandidas en 0,5% SF a los 4 días de cultivo.

Sin embargo, observamos que las células crecidas en la condición control (0,5% SF), presentan un subpeak G_0/G_1 que estaría indicando un posible estado apoptótico de las células. Interesantemente, encontramos que en presencia de bFGF exógeno, este subpeak no aparece, lo que sugiere que bFGF tiene un efecto protector en la expresión del proceso apoptótico (figura 9).

Dado que la presencia de éste subpeak y su eventual desaparición por bFGF ocurre a partir de los 2 días de cultivo, para profundizar un poco más esta observación, realizamos un estudio relacionando el tiempo de exposición a bFGF con la aparición del subpeak G_0/G_1 . Como se observa en la figura 10, el bFGF exógeno protege a la célula de los efectos apoptóticos producidos por la falta de suero fetal. Este efecto protector no es indefinido, dado que se produce solamente durante los primeros 6 días. A tiempos mayores, el bFGF no tiene efecto alguno sobre los eventos apoptóticos producidos por la carencia de suero fetal.

7.3.2.3. En distribución celular del bFGF

Se estudió el efecto de la exposición de MPC expandidas en 0,5% SF a bFGF exógeno en períodos de tiempo corto (hasta 2 horas). Se observó que a partir de una hora de exposición de las células a bFGF, se comienza a observar la unión de éste al receptor. Este hecho se hace más evidente a las 2 horas de exposición (figura 11). Resulta bastante interesante que la incorporación de bFGF a las células parece realizarse de preferencia en una región de éstas (flecha figura 11) y no homogéneamente en toda la extensión de sus membranas. Esto indica una posible acumulación polarizada del receptor de bFGF (FGFR1) inducida por el ligante, previo a la internalización del complejo por las células.

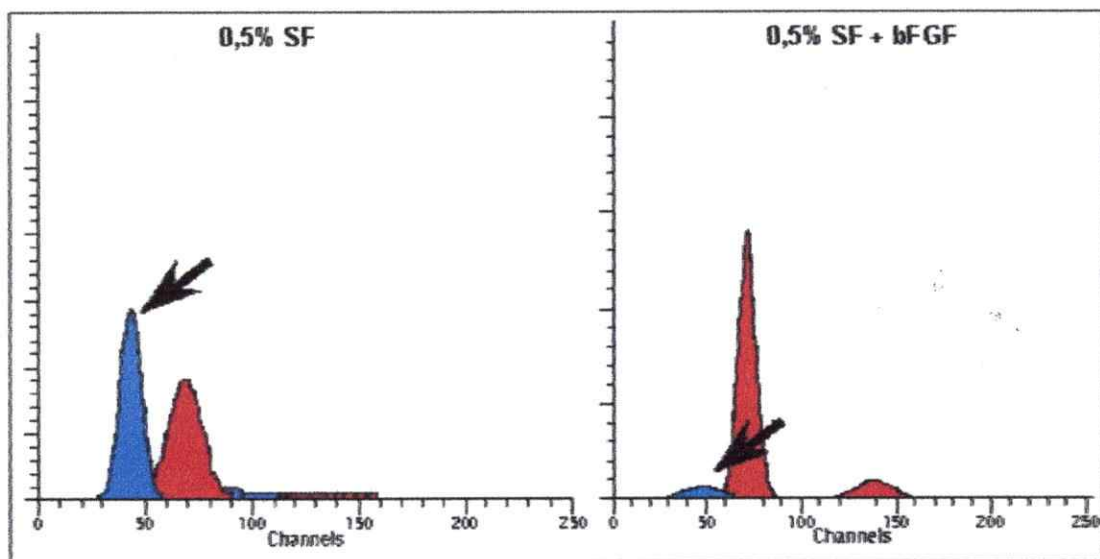


Figura 9: Presencia de una población de células MPC expandidas que expresan eventos apoptóticos y su eventual desaparición por adición de bFGF exógeno. MPC expandidas crecidas durante 2 días en medio con 0,5% SF (panel izquierdo) o en medio con 0,5% SF suplementado con bFGF 20ng/ml (panel derecho), fueron analizadas para determinar su ciclo celular. En la figura se muestra la ubicación del peak G_0/G_1 en la posición cerca de del canal 70 (peak en rojo). La flecha apunta al peak azul que muestra una población de células con material genético menor que $2n$, subpeak G_0/G_1 (células apoptóticas).

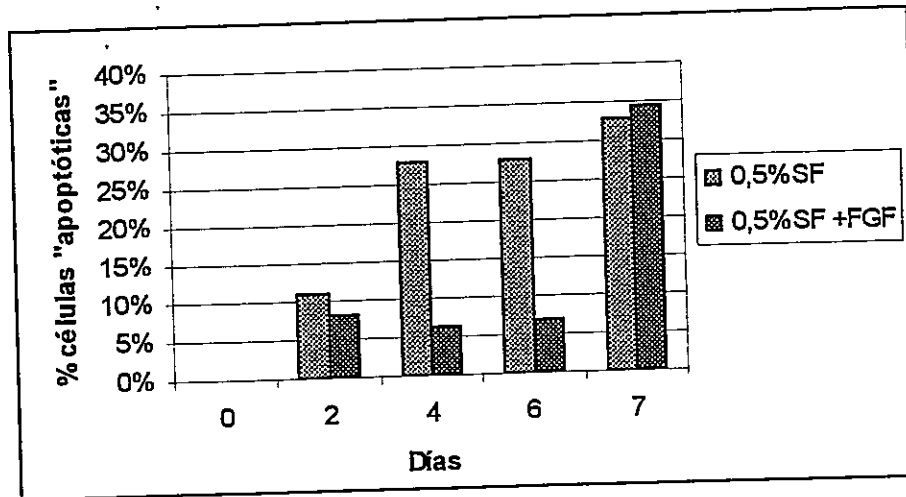


Figura 10: Efecto protector del bFGF exógeno contra la inducción de apoptosis por disminución de suero fetal en el medio de cultivo. El porcentaje de células apoptóticas fue determinado a partir de la proporción de células con contenido de DNA menor a 2n.

MPC exp 0,5% SF

MPC exp 0,5% SF + bFGF

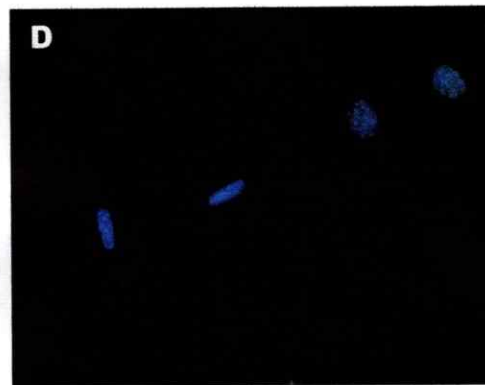
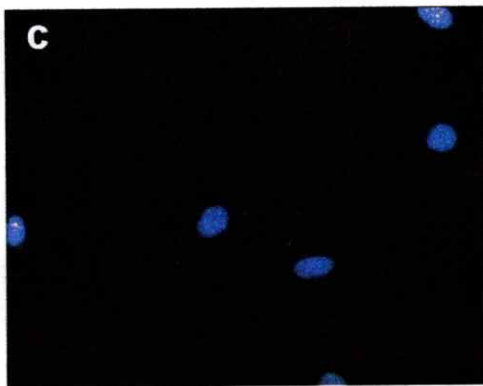


Figura 11: Microscopía de fluorescencia de bFGF en MPC expandidas expuestas a bFGF exógeno. Células crecidas en presencia de 0,5% SF fueron incubadas durante 2 horas sin (A y C) y con adición de bFGF (20 ng/ml) (B y D). Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia indirecta para bFGF (A y B) y sus núcleos contrateñidos con Ho (C y D) (400x).

7.3.3. Efecto de la temperatura

La variación en la distribución y densidad de marca de bFGF entre las MPC expandidas crecidas a 10% y 0,5% SF sugiere que la traslocación de éste desde el citoplasma al núcleo sea un proceso relacionado con el estado proliferativo de la célula. Sin embargo, es posible que la distribución y densidad de marca del bFGF fuesen también dependientes del metabolismo celular. Debido a esto, decidimos someter a las células MPC expandidas en 10% SF durante un período corto (2 horas) a baja temperatura (4°C), con el fin de reducir su nivel metabólico y estudiar los cambios en el patrón de distribución de bFGF y su receptor.

Tal como se esperaba, tras incubar a 4°C las MPC expandidas durante 2 horas en medio con 10% SF, se observó la desaparición de la marca nuclear típica de bFGF (figura 12A), al comparar con células en las mismas condiciones pero incubadas a 37°C (ver figura 2A). Observamos además, que no se presenta variación en la inmunoreactividad de FGFR1, lo que era de esperar, ya que el tiempo de exposición no es lo suficientemente largo como para afectar la presencia de éste (figura 12B, comparar con la condición a 37° C: figura 3A).

MPC exp 4°C bFGF

MPC exp 4°C FGFR1

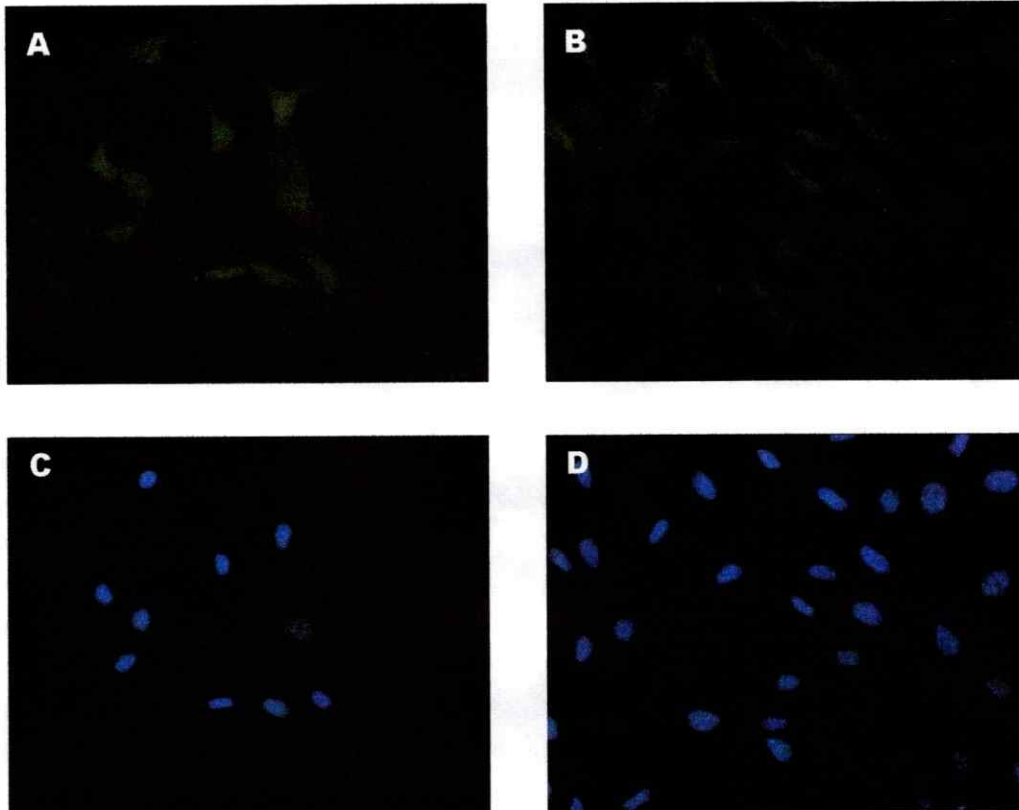


Figura 12: Microscopía de fluorescencia para bFGF y FGFR1 en MPCs expandidas incubadas en 10% SF durante 2 horas a 4°C. La expresión de bFGF (A y C) y FGFR1 (B y D) analizadas por inmunofluorescencia indirecta. Los núcleos respectivos fueron contrateñidos con Ho (C y D) (400x).

B. Estudios realizados con MPC G₀

7.4. Producción de factores angiogénicos por MPC G₀

Como ya hemos descrito, las MPC no comprometidas (G₀) son células que presentan características diferentes a aquellas de las MPC expandidas. Puesto que nuestra hipótesis plantea la posibilidad que sea éste el tipo de célula que se encuentra interaccionando con la célula micrometastásica, es de importancia determinar sus características en cuanto a la expresión de los factores ya estudiados para las MPC expandidas.

7.4.1. Caracterización de MPC G₀

Cabe mencionar que en el transcurso de este estudio nos encontramos con diferencias significativas en las MPC G₀, dependiendo del tipo de manipulación que se realizaba a éstas. Por este hecho, hemos definido dos estados para la MPC G₀. Las MPC G₀ pre-adhesión y post-adhesión, que tal como su nombre indica, varían en si una vez terminada la selección con 5-fluorouracilo, las células obtenidas fueron o no resuspendidas mediante tripsinización y sembradas (re-adheridas a placas), previo a su estudio (ver Métodos).

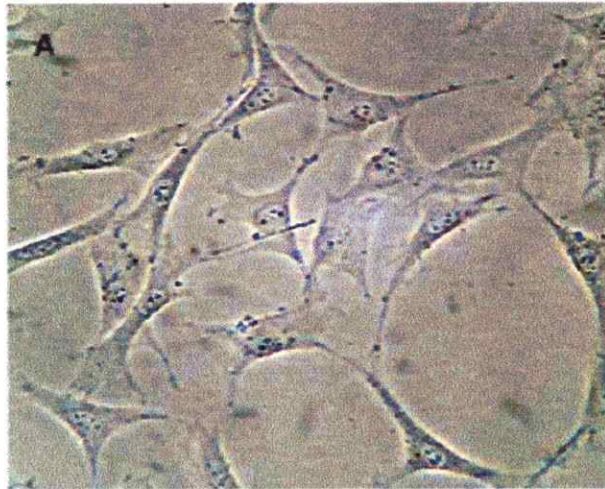
7.4.1.1. Morfología de las MPC G₀

Primero, estudiamos las características morfológicas de la MPC G₀ pre y post-adhesión comparada con la MPC expandida por microscopía de contraste de fase (figura 13). Encontramos que las MPC pre-adhesión se encuentran menos extendidas que las MPC expandidas, poseen menor cantidad de citoplasma y núcleos de igual diámetro. En cambio, la MPC post-adhesión se presenta como una célula alargada, con núcleos más pequeños y con una reducida cantidad de citoplasma.

7.4.1.2. Estudio del potencial proliferativo de las MPC G₀

El estudio comparativo del potencial proliferativo se detalla en Tabla 2. Observamos que tanto las MPC G₀ pre y post-adhesión se encuentran en la fase G₀/G₁ del ciclo celular; sin embargo, cuando se analiza el contenido de células en estado quiescente G₀, de la actividad de la célula, tanto por contenido de RNA como por estado oxidativo mitocondrial de la célula (por rodamina), encontramos que entre un 60 y un 80% (dependiendo si se consideran los resultados por rodamina o contenido de RNA) de las células MPC G₀ pre-adhesión se encuentran realmente en fase G₀. En cambio, en el caso de las MPC G₀ post-adhesión, la proporción de células en G₀ cambia a un 20-56%.

MPC exp



MPC G₀ pre



MPC G₀ post



Figura 13: Morfología de las MPCs por microscopía de contraste de fases. MPC expandidas (A), G₀ pre-adhesión (B) y G₀ post-adhesión (C) crecidas en 10% SF (200x).

7.4.1.3. Expresión de genes en MPC G₀

La expresión o no-expresión de genes de diferenciación linaje-específico, PPAR γ 2 (gen de diferenciación del linaje adipo), osteocalcina (gen de diferenciación del linaje osteo) y p27Kip1(marcador de G₁), en MPC G₀, según estudios de PCR realizado en el laboratorio, se muestra en la figura 14. Observamos que las MPC G₀ no expresan ninguno de los genes de diferenciación estudiados, en comparación a las MPC expandidas, las cuales expresan todos los genes estudiados. La expresión del gen constitutivo GAPDH se realizó como control positivo de las reacciones.

7.4.2. Distribución de factores angiogénicos por MPC G₀

7.4.2.1. Presencia y distribución de bFGF y su receptor

Las características encontradas tanto para las MPC G₀ pre-adhesión y post-adhesión se muestran en las figuras 15 y 16. En éstas observamos que la distribución de bFGF en las dos condiciones es igual, localizado fundamentalmente en el núcleo.

Como era de esperar, puesto que se ha descrito que la internalización de FGFR1 al núcleo estimula la mitogénesis y éstas células se caracterizan por encontrarse en reposo proliferativo, se observó la localización de FGFR1 únicamente en la membrana de las células pre-adhesión; sin embargo, en el caso de las células post-adhesión, se observa la presencia del receptor tanto en la membrana como en el núcleo.

Ciclo celular (%)	MPC Go pre	MPC Go post
Go/G1	98	98
S	1.4	1.5
G2/M	0.6	0.5
Rhodamine ^{low}	64 (11)	20 (9)
Rhodamine ^{high}	30 (57)	72 (41)
AO RNA ^{low} /DNA ²ⁿ	80	56

Tabla 2: Propiedades de MPC G₀. Los datos en paréntesis para rodamina indican la intensidad media de fluorescencia, cuyo valor promedio para Rho^{low} es 10 y para Rho^{high} es 49. AO, acridine orange.

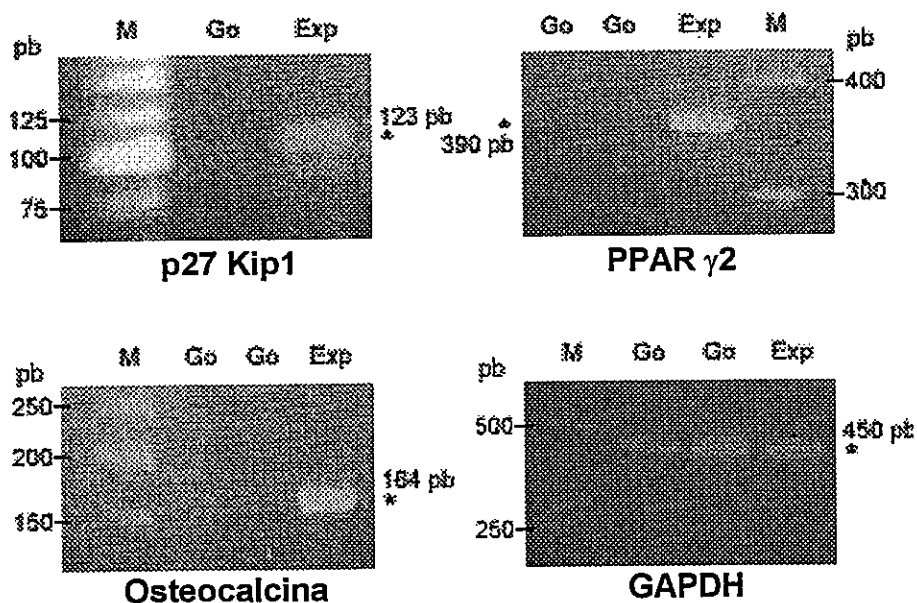


Figura 14: Expresión de genes de diferenciación linaje-especifico en MPCs. Se muestra la expresión de: p27 Kip1, gen expresado en células en fase G₁; PPAR γ2, gen de diferenciación a linaje adipo; Osteocalcina, gen de diferenciación a linaje osteo y GAPDH, gen constitutivo, con fines de comparación (control positivo). Las bandas muestran los perfiles de expresión en MPC expandidas (Exp) y MPC G₀ (G₀); marcador de pares de base (M).

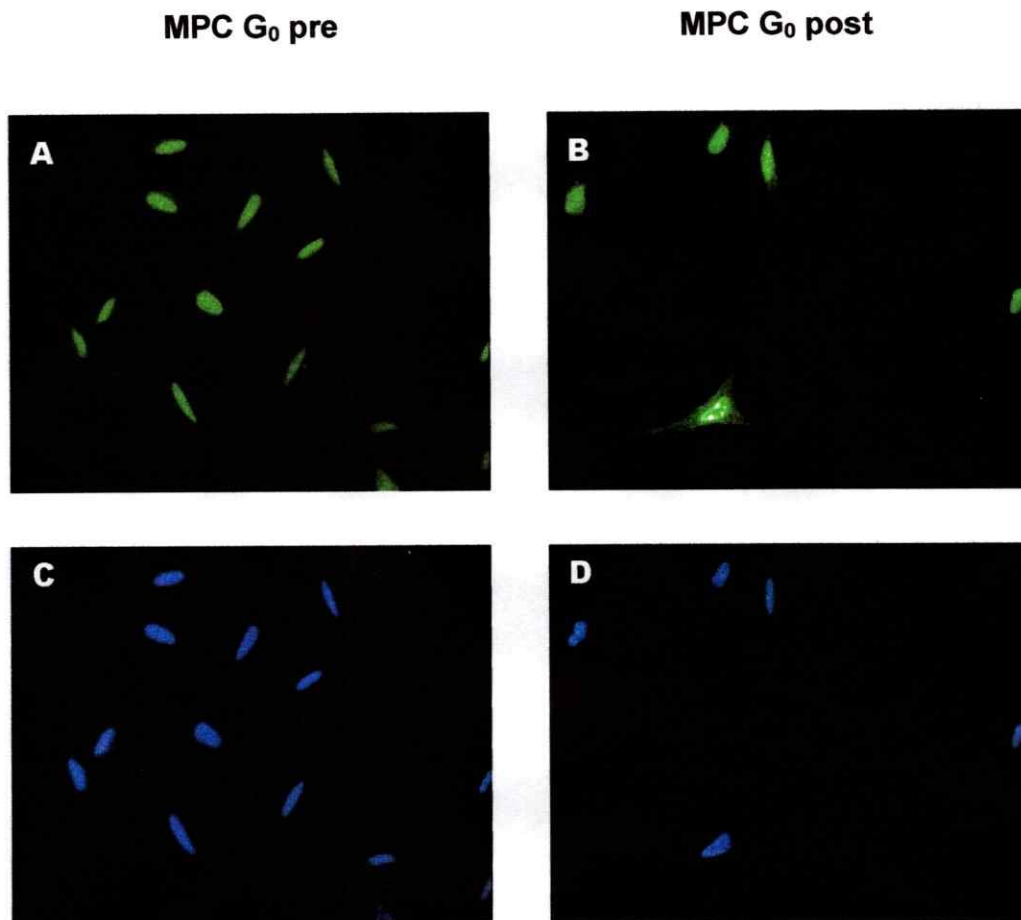


Figura 15: Distribución de bFGF en MPC G₀ por microscopía de fluorescencia. MPCs G₀ pre-adhesión y MPCs G₀ post-adhesión analizadas por inmunofluorescencia indirecta para bFGF (A y B, respectivamente). Contratación nuclear con Ho (C y D) (400x).

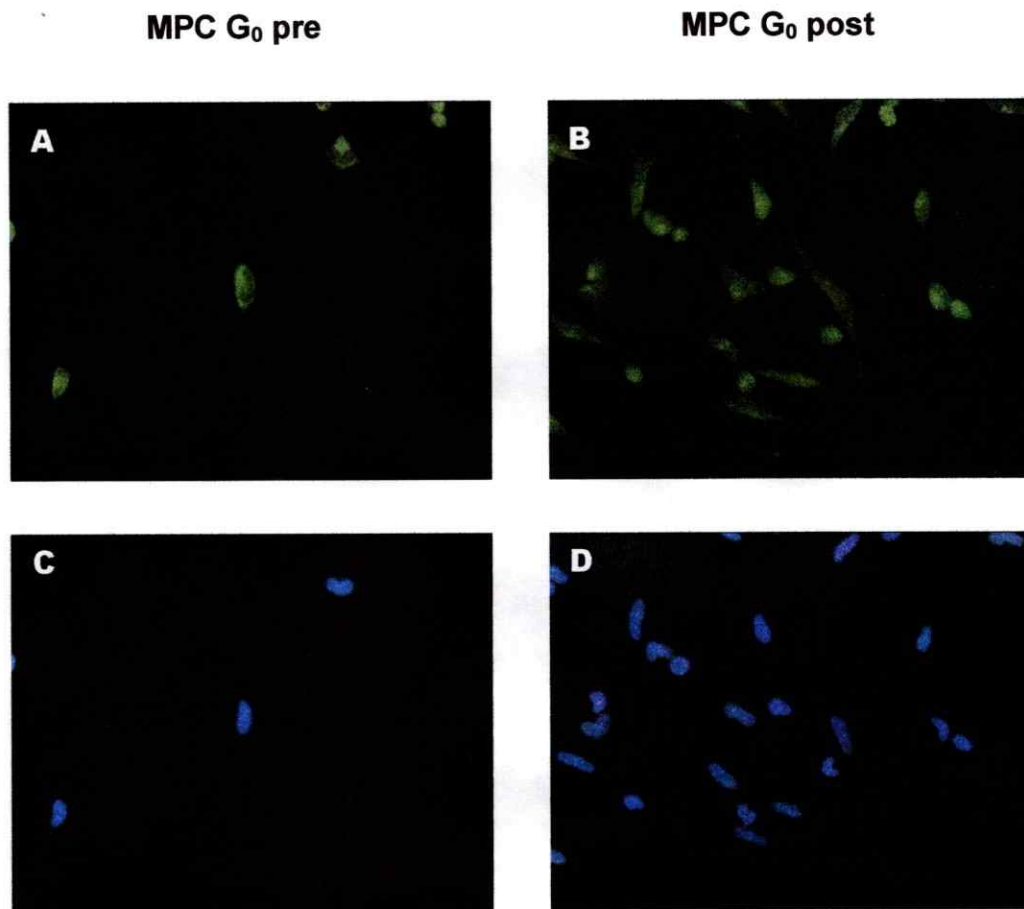


Figura 16: Distribución de FGFR1 en MPCs G₀ según microscopía de fluorescencia. MPCs G₀ pre-adhesión (A y C) MPCs G₀ post adhesión (B y D) analizadas por inmunofluorescencia indirecta para FGFR1 (A y B); contratinción nuclear con Ho (C y D) (400x).

7.4.2.2. Presencia y distribución de VEGF y su receptor

Las características encontradas tanto para las MPC G₀ pre-adhesión y post-adhesión se muestran en las figuras 17 y 18.

Resultan particularmente interesantes estos resultados de la inmunomarcación de VEGF y VEGFR puesto que mientras las MPC G₀ pre-adhesión parecen carecer de ambos antígenos, las MPC G₀ post-adhesión muestran la presencia de ambos. Esto indica que por causa del procedimiento de preparación de MPC G₀ postadheridas a partir de preadheridas, que involucra desadhesión y re-adhesión y un concomitante tránsito de G₀ a G₁, se gatilló la expresión de genes, entre ellos el de VEGFR y VEGF.

7.5. Isoformas de bFGF producido por MPCs

Se utilizó análisis por Western Blot con el fin de determinar cuáles son las isoformas de bFGF presentes en las MPCs, según sea su estado proliferativo y de diferenciación (MPC expandida y MPC G₀). Puesto que las observaciones por inmunocitoquímica nos muestran una localización preferencial de bFGF en el núcleo, los estudios fueron realizados utilizando núcleos aislados de cada tipo celular, como se menciona en Métodos.

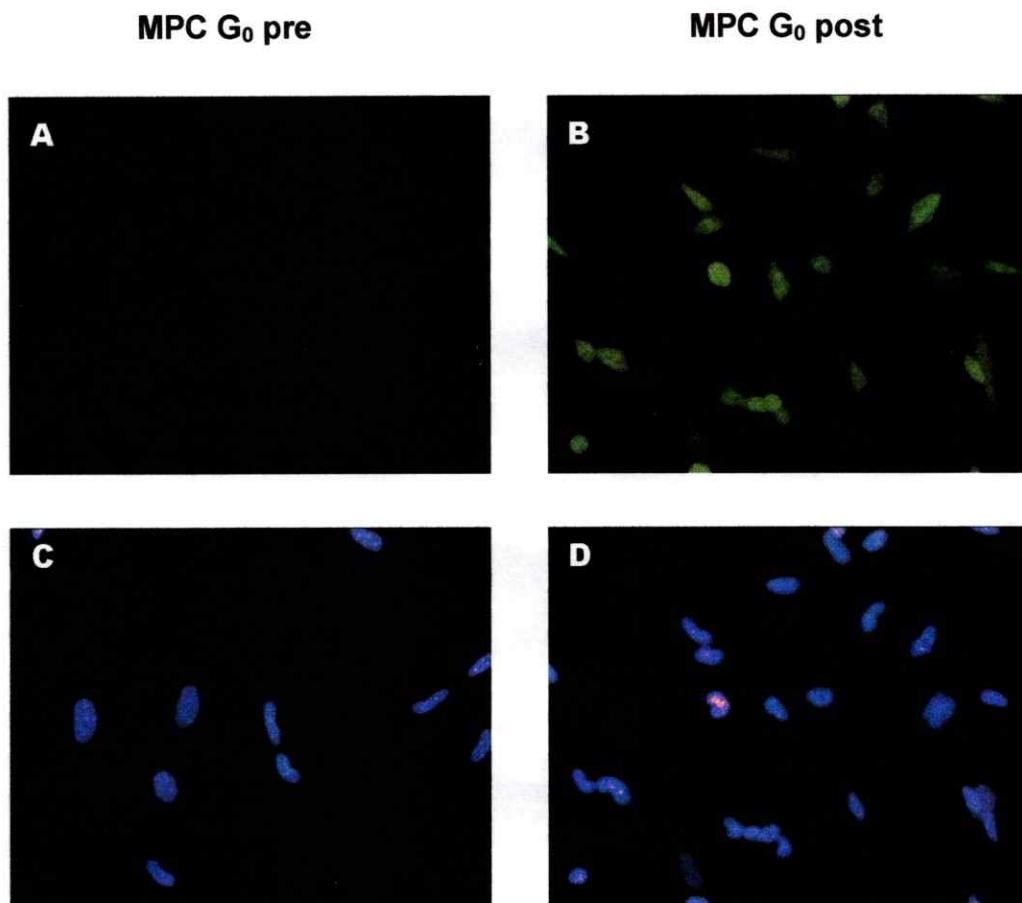


Figura 17: Distribución de VEGF en MPCs G₀ según microscopía de fluorescencia. MPCs G₀ pre-adhesión (A), MPCs G₀ post-adhesión (B), analizadas por inmunofluorescencia indirecta para VEGF; contratinción nuclear con Ho (C y D) (400x).

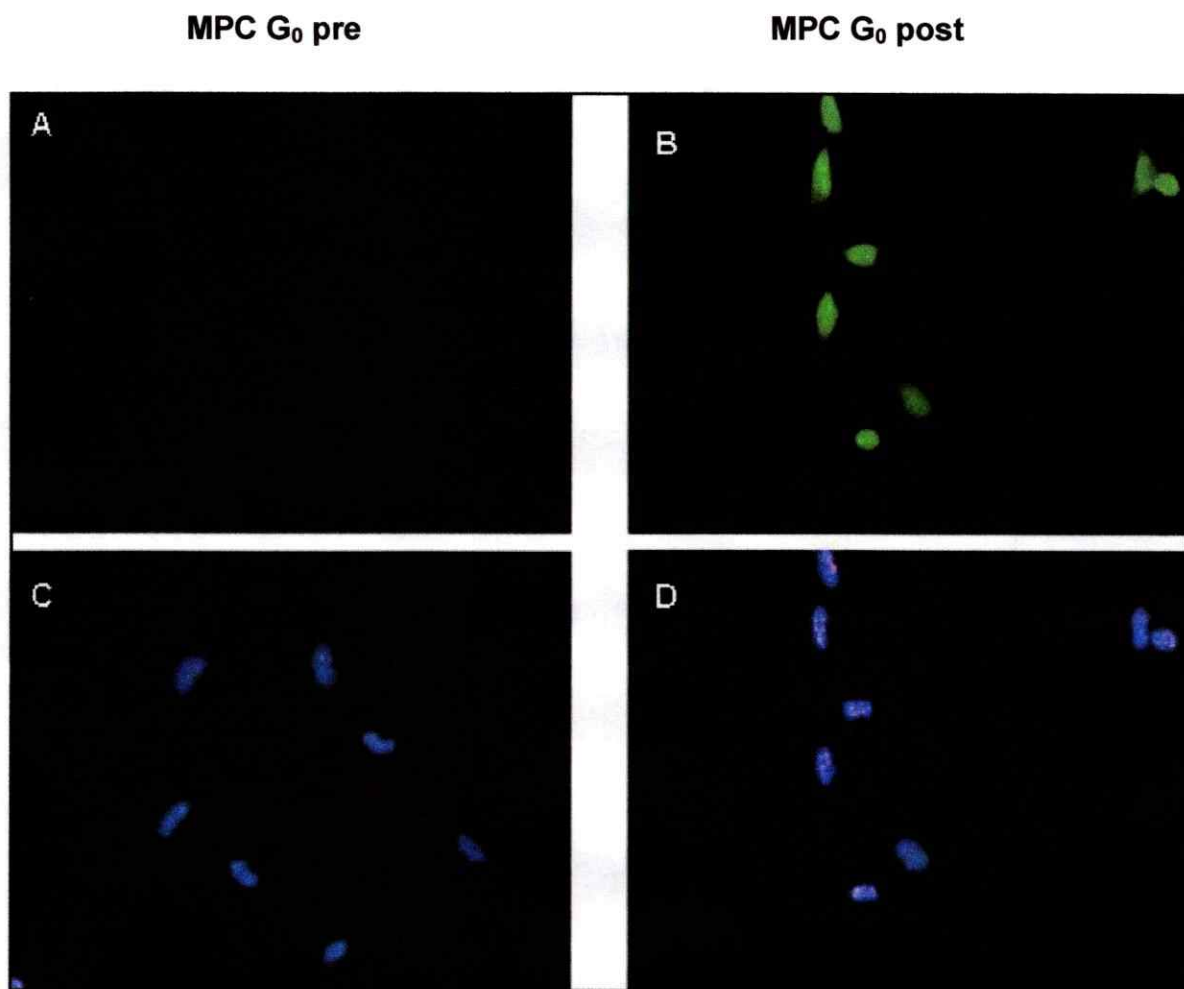


Figura 18: Distribución de VEGFR en MPCs G₀ según microscopía de fluorescencia. MPCs G₀ pre-adhesión (A) MPCs G₀ post adhesión (B) analizadas por inmunofluorescencia indirecta para VEGFR; contratinción nuclear con Ho (C y D) (400x).

En la figura 19 se muestra el resultado de estudios representativos realizados por análisis de Western Blot. Observamos para el caso de las MPCs expandidas, que todas las condiciones experimentales en las cuales las células fueron incubadas, excepto en 0,5% SF, presentan tres isoformas del factor de crecimiento, una de 18 kDa y dos de alto peso molecular (21 kDa y 22,5 kDa). Observamos también que las MPC G₀ tanto pre como post-adhesión, expresan las tres isoformas de bFGF. Al cuantificar la contribución relativa de cada isoforma se observó que las MPC G₀ presentan una mayor cantidad de las isoformas de alto peso molecular en relación con las MPC expandidas (tabla 3). En comparación con las MPC expandidas, las MPC G₀ contienen 7 veces más bFGF en su isoforma de 21 kDa y más de 20 veces en su isoforma de 22,5 kDa. Tal como esperábamos, en las MPC expandidas incubadas durante 2 horas a 4°C se observa una disminución de la concentración de bFGF. A su vez, en las MPC expandidas crecidas en medio de cultivo suplementado con 0,5% SF se observa la no presencia de bFGF en ninguna de sus isoformas. Estos resultados apoyan los datos obtenidos por inmunocitoquímica.

En todas las condiciones, encontramos una concentración bastante baja de bFGF de 18 kDa, lo que tiene sentido considerando que, como ya hemos mencionado anteriormente, esta isoforma no presenta una señal de destinación nuclear y es ésta especie la que es capaz de ser exportada fuera de la célula.

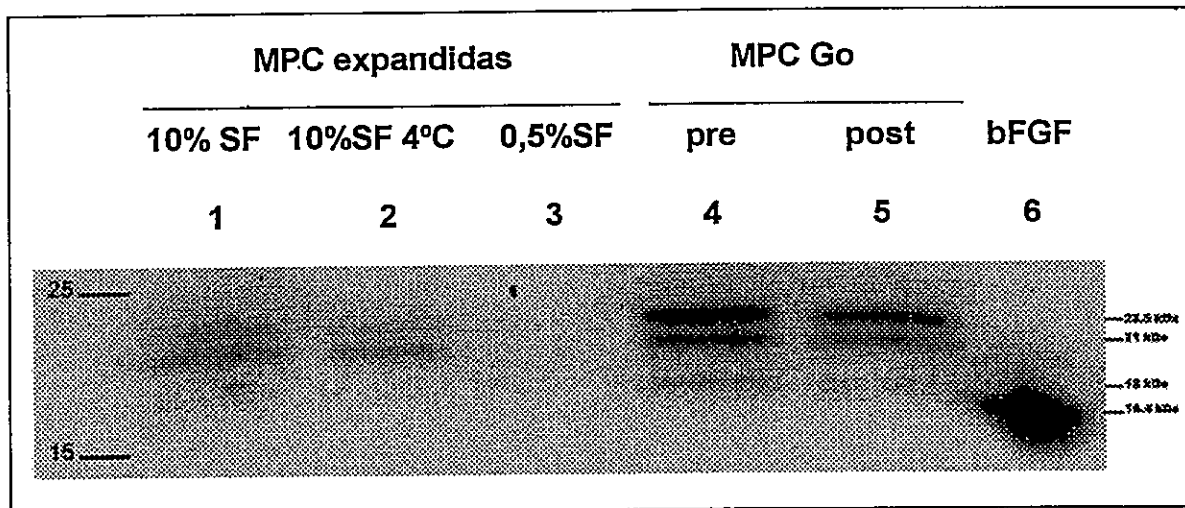


Figura 19: Análisis por Western Blot de la expresión de bFGF en núcleos de MPC cultivadas bajo diferentes condiciones. Lisados de proteínas obtenidos de: MPC cultivadas en medio de cultivo completo (carril 1), MPC incubadas 2h a 4°C (carril 2), MPC cultivadas en medio de cultivo con 0,5% SF (carril 3), MPC Go pre-adhesión (carril 4) y MPC Go post-adhesión (carril 5). El control positivo constituido por 10 ng de bFGF recombinante con PM de 16,4 kDa (carril 6).

7.6. Producción de bFGF en MPCs y su salida al medio de cultivo

Debido a las observaciones a nivel de inmunocitoquímica y Western Blot, en las cuales observamos que los niveles de bFGF presentes en las células MPC varían según su condición de crecimiento, decidimos cuantificar la cantidad de bFGF presente en el medio de cultivo, después de incubar las células durante 24 horas (medios condicionados).

Observamos que las MPC G_0 tanto pre como post-adhesión no exportan bFGF al medio; sin embargo, las MPC expandidas sí lo liberan al medio. Es interesante que la cantidad de bFGF en el medio no varía si las células son sometidas por 2 horas a bajas temperaturas, pese a que la inmunoreactividad nuclear para bFGF disminuye en estas condiciones (tabla 4).

Condición	MW (kDa)	Masa por $1 \cdot 10^6$ cels (ng)
MPC G ₀ pre (10% SF)	22,5	4,63
	21	2,74
	18	0,19
MPC G ₀ post (10% SF)	22,5	3,86
	21	2,77
	18	< 0,001
MPC exp (10% SF)	22,5	0,18
	21	0,375
	18	< 0,001
MPC exp 4° C (10% SF)	22,5	< 0,001
	21	0,19
	18	< 0,001
MPC exp (0,5% SF)	NC	

NC: no cuantificable en las condiciones utilizadas.

Tabla 3: Isoformas de bFGF presentes en MPCs y su cuantificación. MPCs incubadas en las condiciones indicadas a 37° C, excepto cuando se indica. Después del período de incubación, los núcleos fueron aislados, sus proteínas extraídas y analizadas por Western Blot. Las diferentes isoformas fueron cuantificadas utilizando el programa 1D Image Analysis.

Condición	Producción FGF (ng/10 ⁶ cels)
MPC G ₀ pre 10% SF	0
MPC G ₀ post 10% SF	0
MPC exp 10% SF	10,5
MPC exp 4°C 10% SF	10,5
MPC exp 0,5% SF	0

Tabla 4: Liberación de bFGF en los medios condicionados.

VIII. DISCUSIÓN

Las células progenitoras mesenquimáticas (MPC), corresponden a un tipo celular no-hematopoiético, presente en el estroma de la médula ósea y que se caracterizan por poseer propiedades definidas de autorenovación y proliferación, y además por ser multipotentes al diferenciarse a células precursoras de hueso, cartílago, tejidos conectivo y muscular. La expresión de varias citoquinas ya ha sido determinada para las MPC, pero aún se desconoce si las MPC presentan bFGF y VEGF, su localización y si estos patrones varían dependiendo de las condiciones de crecimiento en las que se encuentran éstas células.

Los estudios realizados en esta tesis buscaron encontrar condiciones adecuadas de proliferación o no-proliferación de MPC para estudiar la expresión y distribución de distintos factores y el efecto de estímulos externos. Las células MPC expandidas dependen de la presencia de suero fetal para mantener un crecimiento constante, siendo su nivel de proliferación proporcional a la concentración del suero presente en el medio de cultivo (figura 6). Los resultados del análisis de ciclo celular apoyan aquellos de proliferación puesto que las células mantenidas con 1% SF y 0,5% SF se encuentran mayoritariamente en G_0/G_1 y por lo tanto, tienen un menor crecimiento que las células mantenidas en 10% SF (figura 3).

De esta manera, definimos dos condiciones para realizar nuestros estudios: una condición de proliferación para MPC expandidas crecidas en medio suplementado con 10% SF y otra de no-proliferación, para MPC expandidas incubadas en medio suplementado con 1% ó 0,5% SF.

Cabe destacar que el aumento de G_0/G_1 que se observa en la condición 10% SF a los 4 días, se debe a un efecto, como es esperable, de la confluencia de las células. La mayor presencia de suero fetal en el medio de cultivo, además de ejercer un efecto a nivel de proliferación y de la distribución de células en cada fase del ciclo celular, posee un efecto protector evitando procesos apoptóticos.

La selección de una población de células a partir de MPC expandidas, con 5-fluorouracilo, generó una población en la cual alrededor de un 98% de las células se encuentran en una condición quiescente, G_0 . Las células obtenidas tras esta selección han sido denominadas como MPC G_0 . A lo largo de este estudio encontramos dos estados de MPC G_0 : MPC G_0 pre-adhesión y MPC G_0 post-adhesión. Estudios mediante rodamina y anaranjado de acridina, que dan referencia del estado de actividad de la célula, mostraron características distintas entre estas dos poblaciones. Alrededor de un 70% de la población de células MPC G_0 pre-adhesión se encuentran efectivamente en una condición que corresponde a un estado G_0 . Solo un 28% de ellas están en ciclo celular, en fase G_1 . En el caso de las MPC G_0 post-adhesión, alrededor de un 35% de las células se encuentra en G_0 y el resto en G_1 .

Al estudiar la expresión de bFGF, VEGF y sus receptores en MPC expandidas y MPC G_0 , se encontraron los resultados que se resumen en la tabla adjunta:

Condición	MPC exp. 10% SF	MPC G ₀ pre-adh	MPC G ₀ post-adh	MPC exp. 0,5% SF	MPC exp. 10% SF 4°C
bFGF nuclear	✓	✓	✓	×	✓±
bFGF citoplasma	✓±	×	✓±	✓±	✓±
FGFR1 memb.	✓	✓	✓	✓	✓
FGFR1 nuclear	✓	×	✓	×	✓
VEGF	✓	×	✓	✓	ND
VEGFR	ND	×	✓	ND	ND

✓ = positivo; × = negativo; ± = expresión leve

Así, se encontró que las MPC expandidas en condiciones de crecimiento (10% SF) y las MPC G₀ (tanto pre como post-adhesión, 10% SF), presentan una distribución de bFGF caracterizado por una marcación intensa en el núcleo. Sin embargo, las células MPC expandidas en 10% SF (células en ciclo) presentan marca citoplasmática, la cual no se observa en las MPC G₀ pre-adhesión (células quiescentes, G₀). Así, la expresión y distribución subcelular del factor básico de crecimiento fibroblástico varía dependiendo del estado de quiescencia (G₀) o de ciclo celular, en el que se encuentra la MPC.

Lo anterior se ve apoyado por la observación de las MPC G₀ post-adhesión (mayoritariamente, células que van a ciclo, G₁), en las cuales se observa que gran parte de su población, el factor de crecimiento también está localizado en el citoplasma. Aunque algunas células en esta condición carecen de esta marcación citoplasmática, éstas posiblemente corresponden a las células que aún se encuentran en la fase G₀ del ciclo (35%).

Al estudiar la secreción de bFGF, se observó que en las MPC expandidas, el bFGF se libera hacia el exterior de la célula, lo que no ocurre en las MPC G₀, a juzgar por la cuantificación de bFGF en los medios condicionados, donde se encontró que únicamente la célula MPC expandida en 10% SF secreta bFGF al medio.

Los resultados obtenidos son de especial interés puesto que demuestran una segunda diferencia entre las células MPC G₀ y las células MPC expandidas, cual es la capacidad de las últimas de exportar bFGF al medio que las rodea.

Al estudiar la importación de bFGF al núcleo, se observó que las MPC expandidas en su condición de no-crecimiento (0,5% SF) tienen una distribución de bFGF fundamentalmente citoplasmática. Los datos anteriores, provienen tanto de observaciones por inmunocitoquímica como de análisis por Western Blot, donde se demuestra la ausencia de bFGF nuclear. Según esto, la importación al núcleo, sería dependiente del estado proliferativo de la célula o del metabolismo celular. Sin embargo, el estudio del efecto de la baja temperatura (4°C) realizado en MPC expandidas crecidas en 10% SF, descarta el efecto eventual del estado proliferativo sobre la importación y apoya el aporte del metabolismo celular. Así, el transporte de bFGF hacia el interior del núcleo parece ser un proceso metabólicamente activo, contrario a lo encontrado en otro tipo celular donde la importación nuclear de bFGF es producto de una reducción del metabolismo en la célula (Reilly et.al., 2001). Los mecanismos que controlan tanto importación y exportación de bFGF en las MPCs no fueron mayormente analizados en esta tesis.

La observación que la presencia de bFGF en el citoplasma no aumenta en condiciones en las que la importación de bFGF al núcleo ha sido interrumpida (MPC

expandida 10% SF-4°C y MPC expandida 0,5% SF), permite especular acerca de la posibilidad que el bFGF sea liberado al medio. Sin embargo, tal como se observa en los resultados de cuantificación de bFGF en los medios condicionados, esto no ocurre. Esto tiene sentido considerando que son las isoformas de alto peso molecular las que están presentes mayoritariamente en el núcleo y, como se ha descrito, éstas no son exportadas fuera de la célula. Posiblemente, al interrumpir el transporte al núcleo de las isoformas de alto peso molecular, bFGF es degradado o secuestrado en el citoplasma, pasando a ser no detectables por inmunocitoquímica.

El análisis de la distribución subcelular de FGFR1 demostró que las MPC, tanto expandidas como G₀, expresan FGFR1 en la membrana celular, lo que apoya datos de otros autores. Demostramos que las MPC expandidas crecidas en medio conteniendo 10% SF y que se encuentran mayoritariamente en las fases S, G₂ o M del ciclo celular, presentan FGFR1 en el núcleo, mientras que las MPC G₀ pre-adhesión (G₀) carecen de FGFR1 nuclear. Lo anterior sugiere que la presencia nuclear del receptor es dependiente de si las células están o no en ciclo, lo que fue corroborado por:

- a) La ausencia o disminución de FGFR1 en los núcleos de las MPC expandidas crecidas en medio con 0,5% SF, donde las células están una condición de no-crecimiento.
- b) La presencia de FGFR1 en los núcleos de las MPC G₀ post-adhesión, las cuales se encuentran mayoritariamente en estado G₁.

Así, parece ser que las células progenitoras mesenquimáticas que se encuentran en reposo proliferativo (G_0 o G_1) no tienen FGFR1 en el núcleo, mientras que las que están en activa proliferación (S, G_2 , M) poseen receptor nuclear. A su vez, estos resultados sugieren que la presencia de receptor en el núcleo, define la condición proliferativa o no de estas células.

Los estudios de expresión y distribución de VEGF y VEGFR señalan que células MPC expandidas tienen una distribución citoplasmática de este factor. En el caso de las MPC G_0 , observamos que las MPC G_0 pre-adhesión no expresan VEGF, en tanto que las MPC G_0 post-adhesión muestran una señal citoplasmática de gran intensidad.

Los estudios para el receptor de VEGF (VEGFR) en la membrana señalan que las MPC G_0 pre-adhesión no expresan el receptor, mientras que las MPC G_0 post-adhesión si lo expresan.

Conclusiones y significado de los resultados de esta tesis

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis propuesta como también el cumplimiento de los objetivos. Sin embargo, es importante comentar los resultados en función de la relevancia que puedan tener, tanto a nivel de la MPC como su eventual rol como contraparte de la célula tumoral durante la micrometástasis.

Los resultados apoyan fuertemente la idea que la MPC G_0 post-adhesión sería una célula intermedia en el paso de la MPC G_0 a MPC expandida. A pesar que aún se desconoce la contraparte *in vivo* de las células MPC, en esta tesis se postula que G_0 pre y post-adhesión representarían dos estados celulares asociados al

potencial de auto-renovación de la MPC. De este modo, la MPC G_0 (en su entorno *in vivo*) estaría adherida a la matriz o interaccionaría con otras células de estroma. En algún momento, recibe una señal que la "afloja" o la desprende y se genera así su migración hacia otro ambiente o entorno donde se adhiere. Postulamos que esto sería una señal para dejar G_0 y entrar en ciclo. La contraparte *in vitro*, estaría dada por la tripsinización (pérdida de adhesión) de la célula MPC G_0 y su readhesión (siembra en placa de cultivo), lo que sería equivalente a ubicarse en un nuevo entorno. Así, este ciclo de des-adhesión y re-adhesión es aparentemente suficiente para que la célula salga de G_0 y entre al ciclo celular, para generar una nueva G_0 (auto-renovación) o comprometerse.

Estos estudios también permitirían explicar algunos eventos propios de la interacción en la médula ósea, de las MPC con células tumorales que hacen micrometastásis. La célula micrometastásica, al llegar a la médula ósea puede encontrar e interactuar con la MPC G_0 que al ser ésta no exportadora de bFGF, mantiene un estado de no-proliferación y no-inhibición de procesos apoptóticos en la célula micrometastásica, lo que determina en ella un estado de dormancia. Si ésta MPC G_0 , por acción de factores no conocidos aún, entrara en el proceso de autorenovación, generando una MPC expandida, lo que implica liberación de bFGF, induciría la proliferación e inhibición de procesos apoptóticos en la célula tumoral, estimulando así su salida de un estado de dormancia y activando su proliferación. Además, la célula MPC expandida al liberar bFGF y VEGF, sería capaz de inducir la angiogénesis, lo que permitiría que la célula micrometastásica proliferante se disemine activamente.

IX. CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos y la discusión generada se puede concluir:

- Las MPC, tanto expandidas como G_0 , presentan bFGF nuclear en tres de sus isoformas; dos de alto peso molecular (21 kDa y 22,5 kDa) y la isoforma pequeña de 18 kDa.
- Las MPC expandidas, en su condición de crecimiento, poseen la capacidad de liberar bFGF al medio; sin embargo, esta característica no se observa en las MPC G_0 .
- Los estudios de la distribución de bFGF en las MPC expandidas, sugieren que el transporte de bFGF hacia el interior del núcleo es un proceso metabólicamente activo.
- Las MPC G_0 pre-adhesión no expresan VEGF, como tampoco el receptor de VEGF; sin embargo, las MPC G_0 post-adhesión expresan ambos, al igual que la MPC expandida.
- La expresión y distribución subcelular de factores angiogénicos varía dependiendo del estado proliferativo en el que se encuentran las MPC.

X. REFERENCIAS

Arnaud E., Touriols C., Boutonnet C., Gensac M. C., Vagner S., Prats H., Prats A. C. (1999). A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non- AUG start codon and behaves as survival factor. *Mol. Cell Biol.* 19: 505-514.

Bugler B., Amalric F., Prats H. (1991). Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol. Cell Biol.* 11: 573-577.

Cao Y., O'Reilly M. S., Marshall B., Flynn E., Ji R. W., Folkman J. (1998) Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J. Clin. Invest.* 101: 1055-1063.

Conget P. A., Allers C., Minguell J. J. (2001). Identification of a discrete population of human bone marrow-derived mesenchymal cells exhibiting properties of uncommitted progenitors. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10: 749-758.

Conget P. A., Minguell J. J. (1998). Adenoviral-mediated gene transfer into human bone marrow stromal cells. *Am. Soc. Gene Therapy, 1st Annual Meeting, Seattle, WA, USA, Abstract 367.*

Conget P. A., Minguell J. J. (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 181: 67-73.

Coulier F., Pontarotti P., Roubin R., Hartung H., Goldfarb M., Bimbaum D. (1997). Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families. *J. Mol. Evol.* 44: 43-56.

Cross, M. and Dexter T. M. (1991). Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 64: 271-280.

Chichester C. O., Fernández M., Minguell J. J. (1993). Extracellular matrix gene expression by human bone marrow and by marrow fibroblasts. *Cell. Adh. Comm.* 1: 93-99.

Choi J., Ko M. K., Kay E. P. (2000). Subcellular localization of the expressed 18 kDa FGF-2 isoform in corneal endothelial cells. *Mol. Vision* 6: 222-231.

Davis, M. G., Zhou M., Ali S., Coffin D., Doetchman T., Dorn G. W. (1997). Intracrine and autocrine effects of basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cardiol.* 29: 1061-1072.

Deans R. J., Moseley A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* 28: 875-884.

Dvorak, H. F., Brown L. F., Detmar M., Dvorak A. M.(1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 146: 1029-1039.

Fearon, E. R., Hamilton S. R., Vogelstein B. (1987). Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 238: 193-197.

Ferrari G., Cusella de Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530.

Fialkow, P. J. (1976). Clonal origin of human tumors. *Biochim. Biophys. Acta* 458: 283-321.

Florkiewicz R. Z., Sommer A. (1989). Human basic fibroblast growth factor encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3978-3981.

Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 4-6.

Folkman, J., Klagsburn, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447.

Folkman, J., Watson K., Ingber D., Hanahan D. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61.

Friedestein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hemat.* 4: 267-274.

Gabrilovich D. I., Chen H. L., Girgis K. R., Cunningham H. T., Meny G. M., Nadaf S., Kavanaugh D., Carbone D. P. (1996), Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* 2: 1096-1103.

Gospodarowicz, D., Ferrara, N. Schweigerer, L., Neufeld, G. (1987) Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.* 8: 95-114.

Heldin, C. and Westermark B. (1984). Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* 37: 9-20.

Hombauer H., Minguell J. J. (2000). Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Cancer.* 82(7): 1290-1296.

Jain, R. K. (1988). Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res.* 48: 2641-2658.

Kandel, J. R. Bossy-Wetzel E., Radvanyi F., Klagsbrun M., Folkman J., Hanahan D. (1991). Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66: 1095-1104.

Kilhmark M., Hallberg E. (1998). Preparation of nuclei and nuclear envelopes. En Celis J. E. (eds.), *Cell Biology, A Laboratory Handbook*. Volumen dos pp 155-157. Academic Press, San Diego.

Klein G. (1995). The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 51: 914-925.

Klohs W. D., Hamby J. M. (1999). Antiangiogenic agents. *Current Opinion Biotechnology* 10: 544-549.

Koga C., Adati N., Nakata K., Mikoshiba K., Furuhata Y., Sato S., Tei H., Sakaki Y., Kurokawa T., Shiokawa K., Yokoyama K. K. (1990). Characterization of a novel member of the FGF family, XFGF-20, in *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 756-765.

Kopen G. C., Prockop D. J., Phinney D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10711-10716.

Majumdar M. K., Thiede M. A., Mosca J. D., Moorman M., Gerson S. L. (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell Physiol.* 176: 57-66.

Minguell J. J., Erices A., Conget P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* 226: 507-520.

O'Reilly, M. S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W. S. Flynn E., Birkhead J. R., Olsen B. R., Folkman J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285.

Pereira R. F., Halford K. W., O'Hara M. D., Leeper D. B., Sokolov B. P., Pollard M. D., Bagasra O., Prockop D. J. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4857-4861.

Piotrowicz, R. S., Martin, J. L., Dillman W. H., and Levin, E. G. (1997). The 27-kDa heat shock protein facilitates basic fibroblast growth factor release from endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272: 7042-7047.

Prats H., Kaghad M., Prats A. C., Klagsbrun M., Lelias J. M., Liauzun P., Chalon P., Tauber J. P., Amalric F., Smith J.A., Caput D. (1989). High molecular mass forms of

basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1836-1840.

Quarto N., Finger F. P., Rifkin D. B. (1991). The NH₂-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal. J. Cell Physiol. 147: 311-318.

Reilly J. F., Maher P. A. (2001). Importin β -mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. J. Cell Biol. 156: 1307-1312.

Roberts R.A., Spooner E., Parkinson E.K., Lord B.I., Allen T.D., Dexter T.M. (1987). Metabolically inactive 3T3 cells can substitute for marrow stromal cells to promote the proliferation and development of multipotent haemopoietic stem cells. J. Cell. Physiol. 132: 203-214.

Satomura K., Derubeis A. R., Fedarko N. S., Ibaraki-O'Connor K., Kuznetsov S. A., Rowe D. W., Young M. F., Gehronroby P. (1998). Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. J. Cell. Physiol. 177: 426-438.

Sporn, M. B. and Roberts A. T. (1985). Autocrine growth factors and cancer. Nature 313: 745-747.

Stewart, A. J., Johnson, M. D., May, F. E. B., and Westley, B. R. (1990). Role of insulin-like growth factors and the type I insulin-like growth factor receptor in the

estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 265: 21172-21178.

Stewart, A. J., Westley, B. R., and May, F. E. B. (1992). Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen. *Br. J. Cancer* 66: 640-648.

Tavassoli M., Minguell J. J. (1991). Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196: 367-373.

Traganos F., Darzynkiewicz Z., Sharpless T. (1977). Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. *J. Histochem. Cytochem.*, 25: 46-56.

Valverius, E.M., Ciardiello F., Heldin N. E., Blondel B., Merlo G., Smith G., Stampfer M. R., Lippman M. E., Dickson R. B., Salomon D. S.(1990) Stromal influences on transformation of human mammary epithelial cells overexpressing c-myc and SV40T. *J. Cell. Physiol.* 145: 207-216.

Weidner, N., Semple J. P., Welch W. R., Folkman J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis- Correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 324: 1-8.