

Optimización de la metodología de cultivo de condrocitos de discos procedentes de hernias discales y comprobación de la presencia del *Toll-like receptor 4* (TLR 4)

Optimization of methods of chondrocyte cell culture from human disc hernia subjects and testing the presence of Toll-like receptor 4 (TLR 4)

Krzyzanowska A¹, Cabrerizo M¹, Alemany S², Munarriz PM³, Lagares A³

¹ Centro de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, España. ² Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. ³ Servicio de Neurocirugía, Hospital 12 de Octubre, Universidad Complutense de Madrid.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Optimizar la técnica de cultivo de células del disco intervertebral en humanos y confirmar la expresión del *Toll-like receptor 4* (TLR4).

Material y método: Se cultivaron muestras de núcleo pulposo obtenidas durante la cirugía de hernia discal. Las células cultivadas de los nueve pacientes (todos con degeneración del disco moderada-grave en la escala de Pfirrmann) fueron observadas para determinar su capacidad de crecimiento. Las células cultivadas obtenidas se estudiaron con el fin de determinar su fenotipo mediante inmunotinción y rtPCR. La presencia de TLR4 fue comprobada por los mismos métodos.

Resultados: Las células aisladas se sembraron a diferentes concentraciones. La concentración ideal se obtuvo para las condiciones óptimas del cultivo. Se confirmó que el fenotipo de las células fue condrocitario y se confirmó la presencia del receptor TLR4 en las células cultivadas.

Conclusión: Se confirma la presencia tanto de ARNm como de la proteína del receptor TLR4 en los condrocitos del disco intervertebral. Este hallazgo allana el camino para la caracterización de las funciones de este receptor en los procesos inflamatorios de la hernia de disco.

Palabras clave:

Hernia discal, TLR4, cultivo de condrocitos.

Abstract

Objective: To optimize the technique of culturing human intervertebral disc cells, and to confirm the expression of toll-like receptor 4 (TLR4) in these cells.

Material and method: Samples of nucleus pulposus obtained during disc hernia surgery were cultured. Cells from nine patients (all with moderate-severe disc degeneration scores, based on the Pfirrmann scale) were followed up to determine their growing capacity. The obtained cultured cells were tested for the chondrocyte phenotype by immunostaining and rt-PCR and the presence of TLR4 was tested by the same methods.

Results: The cells were isolated and seeded at different concentrations. The ideal concentration was obtained for optimal culture conditions. The cells were confirmed to have the chondrocyte phenotype and TLR4 was confirmed to be present in the cultured cells.

Conclusion: This study confirms the presence of both mRNA and TLR4 protein in intervertebral disc chondrocytes. This paves the way for elucidating of the roles of this receptor in the inflammatory processes of disc hernia.

Key words:

Disc hernia, TLR4, chondrocyte culture.

Correspondencia

A Lagares
Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario 12 de Octubre,
Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
E-mail: algadoc@yahoo.com

Introducción

La hernia discal es el resultado de la degeneración del disco lumbar y de la presencia de una ruptura del *annulus* fibroso que permite su protrusión. Este tipo de lesión frecuentemente resulta en dolor radicular, un tipo de dolor neuropático. La hernia discal es una causa común de discapacidad en pacientes en edad laboral. Se calcula que en torno a un 1% de los adultos se ven afectados por dicha condición.

El disco intervertebral está compuesto por una gran cantidad de matriz extracelular en la que se encuentran un pequeño número de células [1]. En el *annulus* fibroso estas son más parecidas morfológicamente a fibroblastos, mientras que en el núcleo pulposo son ovales y similares a los condrocitos [2]. Es un tejido metabólicamente activo, ya que está sometido a fenómenos de degradación y regeneración de forma constante. En los procesos de degradación, aparte de cambios histológicos se observan cambios moleculares. Aparecen citoquinas procedentes de células inflamatorias y de las propias células discales que determinan cambios en la síntesis de enzimas que intervienen en la degeneración de la matriz extracelular, tales como colagenasas/metaloproteasas. Dentro de los múltiples factores implicados en las vías inflamatorias, los *Toll-like receptors 4* (TLR4) han generado mucho interés por su papel en el desarrollo y mantenimiento de estados dolorosos [4][5], pero su papel en el dolor de la hernia discal no ha sido descrito hasta ahora. Se ha demostrado que los condrocitos de los cartílagos articulares expresan la familia de receptores TLR [6]. Pero no hay información sobre la expresión de TLR4 en condrocitos del disco en humano, aunque sí se ha confirmado la presencia del receptor en rata.

La caracterización de la respuesta inflamatoria *in vitro* en condrocitos humanos se ha llevado a cabo fundamentalmente en modelos de lesión articular, aunque también de forma limitada a nivel de la degeneración discal [7][8].

Para poder estudiar la respuesta inflamatoria *in vitro*, es necesario optimizar el protocolo de cultivo de las células humanas. Los discos intervertebrales son considerados estructuras en las que la densidad celular es muy baja, lo que podría determinar importantes dificultades a la hora de cultivar dichas escasas células [9]. Estudios detallados de morfología de los condrocitos procedentes de tejido bovino cultivados con variaciones en metodología han enseñado que diferentes regiones del disco contienen diversos tipos celulares y necesitan distintas condiciones [10]. Hasta ahora se ha utilizado el cultivo de células del disco de forma mucho menos frecuente que en el caso de las células provenientes de otras articulaciones y la información sobre la metodolo-

gía usada para conseguir la viabilidad de dichos cultivos es escasa y muy variada en relación a los diferentes autores [9][11-13].

El objetivo de este estudio es optimizar la técnica de cultivo de las células humanas de disco intervertebral, en particular las del núcleo pulposo, comprobar su fenotipo condrocitario y a su vez confirmar la presencia del receptor TLR4 en dichas células.

Material y métodos

Las muestras de disco se obtuvieron a partir de muestras quirúrgicas obtenidas en cirugías por hernia discal lumbar en el Servicio de Neurocirugía del Hospital 12 de Octubre. Todas las muestras se han obtenido con consentimiento de los pacientes. Las muestras se extraen a un bote estéril con suero fisiológico y luego se procesan en la campana de flujo en condiciones de esterilidad. La mayoría de las muestras se procesa inmediatamente tras la cirugía, aunque algunas se han dejado hasta 24 horas en suero fisiológico a 4° C.

En la campana de flujo, se separó el cartílago del tejido del núcleo pulposo en una placa Petri con DMEM estéril. Se cortó con un bisturí en trozos pequeños. A los trozos cortados se les añadió pronasa (Sigma P-8811 1mg/ml, volumen doble de la muestra) y se incubó 45 minutos, a 37°C. Después de cuatro centrifugaciones (200g, 20° C) y lavados con PBS, se incubó con colagenasa (Sigma C0130-500 MG 1mg/ml, volumen 3x de la muestra). Se dejó 24 horas en el agitador a 60 rpm y 37° C. El disco, ya digerido, se filtró con un filtro de 40 a un nuevo tubo y se centrifugó 10 minutos a 200 g, 20° C. Se lavó con PBS, resuspendiendo el pellet, y se centrifugó de nuevo. El pellet se resuspendió en el medio completo (DMEM F-12, glutamina 1%, antibiótico-antimicótico -1%, 10% FBS, todo de Life Technologies) para conteo y sembrado en placas p-12 a densidad de 100.000 cels/mL (Thermo Scientific cat No 150628). La incubación se realizó bajo condiciones de humedad 95% y CO₂ 5%. El medio completo no se cambió hasta que las células primarias se adherieron a la placa, lo que tarda alrededor de una semana. Posteriormente se cambia dos veces por semana. Las células confluyeron sobre las cuatro semanas. Para la disociación de las células confluyentes, se usó tripsina (5%, Life Technologies) y se separó 1:2 para subcultivos.

Inmunohistoquímica

Para estudios inmunohistoquímicos, tras el primer pase, las células se sembraron en cubreobjetos de cristal redondos, dentro de placas p-24 a densidad de 50.000 cels/pocillo. Se dejó a las células una semana para adherirse y otra semana de crecimiento, cambiando el medio cada tres días. Transcu-

rrido este tiempo, los pocillos se lavaron con PBS 0.1M estéril y las células se fijaron con paraformaldehído (4% en PBS, 10 min). Después de lavar, se bloqueó durante dos horas con suero de burro (10% en PBS), seguido por una incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche. Los anticuerpos primarios fueron de conejo anti condroitin sulfato (1:150, Sigma) y anti TLR4 (1:500, Abcam) de ratón. Los anticuerpos secundarios, incubados durante dos horas, fueron *donkey* anti ratón y anti conejo Alexa 488, 1:1000, Molecular Probes. Después de lavar, se pegaron los cubres a un porta y se visualizaron las células bajo un microscopio de fluorescencia (Leica) con objetivo de 10x y 20x. Como control negativo, se hizo el mismo procedimiento en otro pocillo, pero sin incubar con el anticuerpo primario.

Para extraer el RNA de las células se usó Trizol (Life Technologies), 50µl por pocillo, tras quitar el medio y lavar los pocillos con PBS.

Los niveles de expresión génica se determinaron cuantitativamente mediante la transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El ARN total se aisló usando el *kit* RNeasy (QIAGEN Inc, Valencia, CA). Los cebadores para SOX-9 humano, colágeno tipo II y TLR4, fueron diseñados con la sonda Biblioteca Universal (Roche Ciencias Aplicadas, Indianapolis, IN, EEUU). Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando la transcriptasa inversa qPCR MasterMix (Eurogentec, Fremont, CA, EE.UU.) y 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.). Como tejido control se usaron fibroblastos primarios procedentes de membrana sinovial humana.

Resultados

Inicialmente se usó el tejido de disco intervertebral de tres pacientes para pruebas metodológicas, ajustando la dosis de enzimas y optimizando el tipo de procesamiento. Para estudios definitivos se usaron discos de nueve pacientes. De estos, dos se sembraron en otro tipo de placas (Falcon *tissue culture plate*) y se observó que las células no se adherían, lo que resalta la importancia de usar el material adecuado. El promedio de edad de los siete pacientes usados para el estudio es 41 (± 11) y todas las muestras, excepto una, provienen de la región lumbar (una de L3-L4, dos de L4-L5 y cuatro de L5-S1). La muestra cervical proviene de los espacios C4 a C6; y tanto el crecimiento de las células como su morfología se parecen a los de la zona lumbar.

Las células extraídas del núcleo pulposo humano, obtenido de las cirugías de hernia lumbar (y de una hernia cervical), tardan en adherirse a la placa una semana después de sembrarlas. El tipo de placa es importante, ya que en placas

de otras características no se adhieren bien. Inicialmente, el número de células sembradas se eligió dependiendo del rendimiento del tejido digerido. Se sembraron entre 50.000 y 190.000 células/pocillo en placas p-12 y se siguió su crecimiento hasta llegar a confluir (Figura 1). Dependiendo del número de células sembradas, las células llegaban a confluir entre dos y cuatro semanas después de sembrarlas (Figura 2). El número de células sembradas se correlacionó inversamente con el tiempo necesario para llegar a confluencia y el primer pase ($r^2=0.73$). El número óptimo para sembrar se concluyó en 100.000 células/pocillo, ya

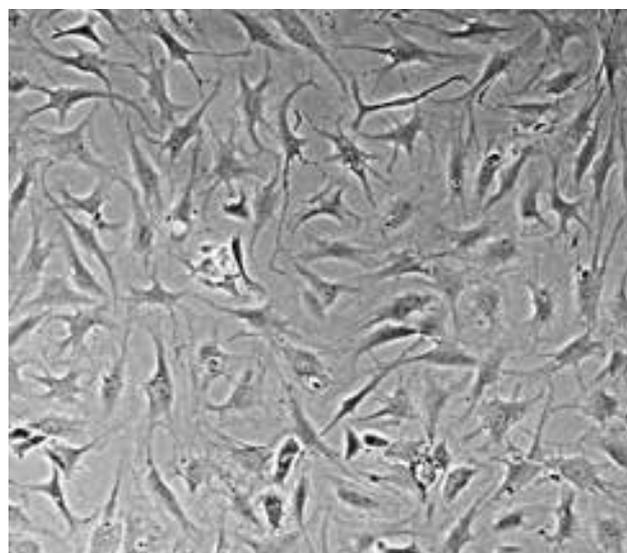


Fig. 1. Células de núcleo pulposo en cultivo. 4 semanas después de sembrar.

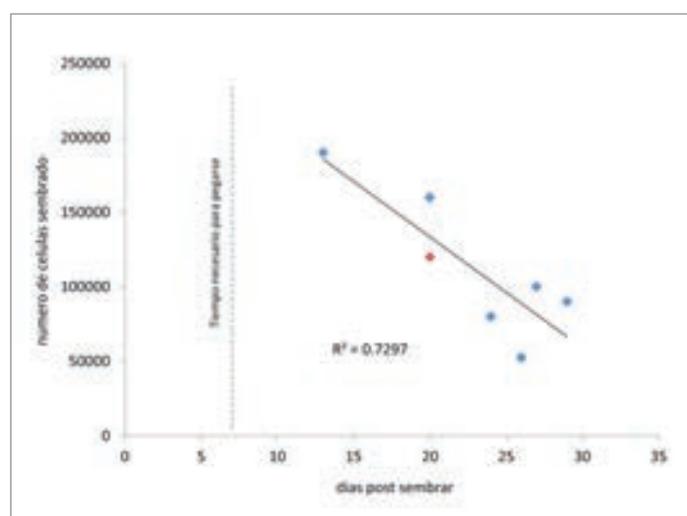


Fig. 2. Correlación inversa entre número de células sembradas y el tiempo hasta llegar a confluir. Cada punto representa un paciente. El punto rojo señala el paciente con hernia cervical (C4-C6).

que este número parece proporcionar condiciones de crecimiento óptimas en tres-cuatro semanas, obteniendo células con la morfología deseada. También, contando con que el tamaño de la muestra varía en cada caso, el número de 100.000 células/pocillo garantiza un suficiente número de pocillos para posteriores experimentos (entre 6-12 pocillos, dependiendo del rendimiento de la muestra).

No encontramos correlación entre la edad del paciente y el tiempo que necesitan las células cultivadas para llegar a confluir. Los casos que se procesaron un día después de la cirugía parecen tardar más en llegar a confluencia, pero no hay diferencias significativas entre estos y los que se procesaron el mismo día (datos no mostrados). Se puede concluir que las células permanecen perfectamente viables hasta 24 horas después de la extracción.

Las células cultivadas fueron procesadas para inmunohistoquímica. Con el anticuerpo contra condroitin sulfato, un marcador específico de condrocitos, se detectó que esta proteína es expresada en las células cultivadas (Figura 3). Para el control negativo se realizó el mismo procedimiento de inmunohistoquímica eliminando el anticuerpo primario, confirmando así la reacción específica.

La expresión del mRNA de SOX-9 y colágeno tipo II se confirmó en las células cultivadas de dos pacientes separados por RT-PCR. Como control, se utilizaron fibroblastos humanos cultivados que se sabe que expresan niveles mínimos de mRNA de estas proteínas. Los valores de expresión se normalizaron a los valores de fibroblastos que se asignan como 1.

La expresión del mRNA de TLR4 y MMP9 en el cultivo celular de dos pacientes se confirmó por rtPCR. Cultivos de fibroblastos humanos, que se sabe que expresan TLR4, se utilizaron como un control positivo. Los valores de expresión se normalizaron a los valores de fibroblastos que se asignaron como 1.

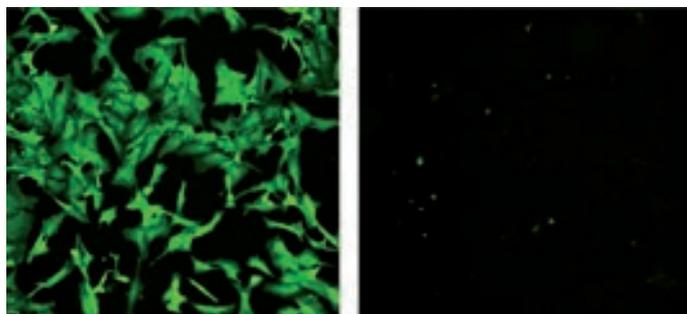


Fig. 3. Expresión de condroitin sulfato – un marcador de condrocitos (10x). A) Células cultivadas se tiñeron positivamente con el anticuerpo Condroitin sulfato. B) Eliminando el anticuerpo primario dio lugar a una tinción.

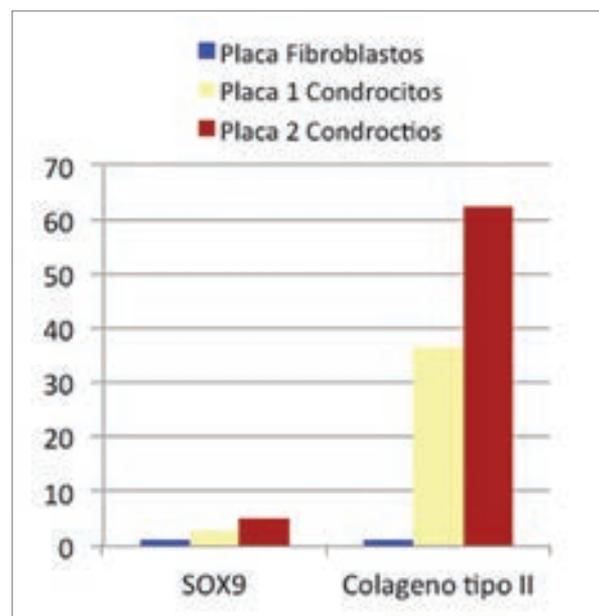


Fig. 4. Expresión de mRNA de SOX-9 y colágeno II – genes expresados en condrocitos. PCR. Relativo a fibroblastos.

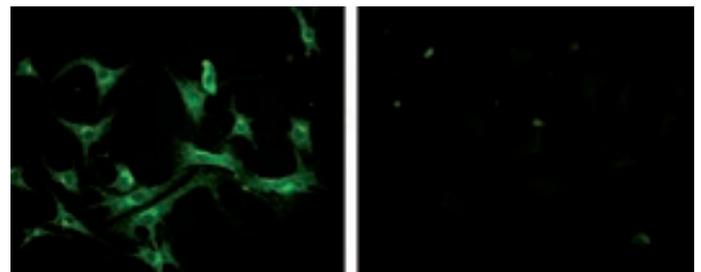


Fig. 5. Expresión de receptor TLR4 detectado por inmunohistoquímica (20x). A) Se detectó la expresión de TLR4 en las células cultivadas. B) Eliminando de anticuerpo primario dio lugar a una señal negativa.

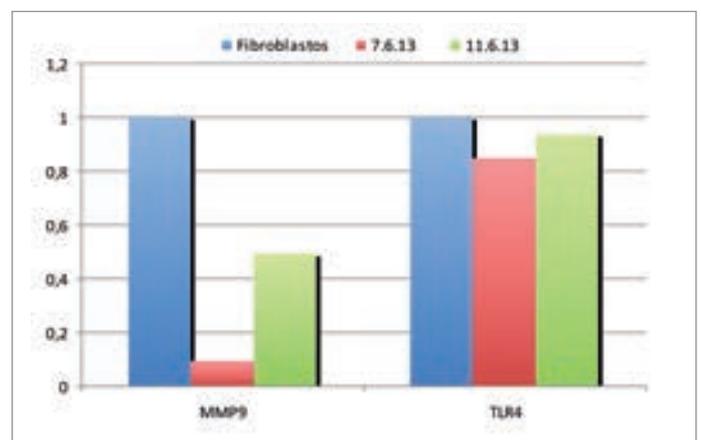


Fig. 6. Expresión de mRNA del receptor TLR4 y MMP9 por PCR.

I Discusión

En este estudio se ha pretendido optimizar el protocolo de cultivo de condrocitos humanos procedentes de hernias discales. Dichas células, específicas de núcleo pulposo, tardaron hasta una semana en adherirse a la placa de cultivos y entre tres-cuatro semanas hasta llegar a confluir, en concordancia con lo que han reportado otros grupos de trabajo [9]. Horner *et al.*, [10] en sus estudios de tejido bovino, han observado que este comportamiento es muy típico de las células del núcleo pulposo, ya que las de anillo fibroso se adhieren más rápido, aproximadamente en el periodo de un día. Pruebas iniciales con pocillos de diferentes tamaños indicaron que las placas p-12 proporcionan los mejores condiciones con respecto al tiempo hasta que se pegan las células. También, como se ha mencionado en la sección de resultados, placas de diferentes casas comerciales, aunque ambas indicadas para cultivos celulares, presentaron diferentes resultados con respecto a la adhesión de las células a las placas. El rendimiento de las muestras obtenidas en la cirugía en cuanto al número de células que obtuvimos para poder sembrar fue de entre 5×10^5 y 8×10^6 células/paciente, dependiendo del tamaño de muestra. Eso nos permite sembrar entre 50.000-200.000 células por pocillo, aunque el número óptimo de células a sembrar por placa se ha estimado en 100.000, basándose en el comportamiento de las células y proporcionando suficiente número de pocillos para experimentos consecutivos. Para experimentos sucesivos se recomendaría usar células a partir del pase 1. Se recomendaría también filtrar las células al sembrar después de pasar, ya que en el cultivo primario se observaron detritus de otros tipos de células y fragmentos celulares que pueden interferir en los experimentos subsecuentes. Wang *et al.* [9] sugieren que estas células que contaminan el cultivo primario pueden ser células sanguíneas, aunque en nuestro protocolo la muestra se lava bien antes del proceso de digestión.

Se recomienda no dejar las células creciendo demasiado tiempo (más de cuatro semanas después de sembrar por primera vez y después de pasar), ni dejarlas sin cambiar el medio por tiempos prolongados, ya que los condrocitos en monocapa tienden a desarrollar un fenotipo más elongado y parecido a fibroblastos (observaciones propias y Heidari *et al.*, 2011). Tampoco se recomiendan múltiples pases. En nuestra experiencia, las células están listas para tratamientos después del pase 1. Varios estudios han demostrado que tras múltiples pases de cultivo se produce una disminución de la capacidad proliferativa de las células, así como un descenso en la expresión de proteínas de matriz como colágeno y agregano [13][14].

Numerosos estudios afirman que los condrocitos pierden su capacidad de crecimiento con la edad del paciente [15-17]. Por ejemplo, condrocitos de cartílago articular bovino pierden su capacidad proliferativa debido probablemente a una disminución en la producción de colágeno y proteoglicanos [16]. En nuestro estudio no hemos observado ninguna correlación entre la edad de los pacientes y la capacidad proliferativa de las células. Las razones para estas diferencias pueden ser varias: los condrocitos articulares se comportan de otra manera que los discales, el tejido bovino es diferente del humano o también el rango de edades estudiado es diferente. Tran-Khanh *et al.* [16] han comparado tejido de animales «adolescentes» con tejido de animales adultos. Nuestros pacientes se encuentran todos en la edad adulta, y solo uno puede ser considerado como anciano (rango de edades de entre 24 y 69 años). Por otro lado, hay que tener en cuenta que nuestra muestra es poco numerosa para formular conclusiones definitivas respecto a la correlación entre edad y el crecimiento de las células en cultivo.

También se ha descrito que las células de los discos más degenerados exhiben senescencia acelerada y suelen tener déficits de crecimiento y proliferación [17]. En nuestro estudio no hemos podido comparar entre grupos con o sin degeneración discal, ya que todas las muestras provienen de pacientes con degeneración moderada-grave (3-5 en la escala Pfirrmann).

Las células de núcleo pulposo se consideran como condrocitos [1] y expresan colágeno tipo II, proteoglicanos como el condroitin sulfato y el factor de transcripción sox9 [9][13][18]. De hecho, la expresión de colágeno varía entre núcleo pulposo y el *annulus* fibroso que está compuesto mayormente de colágeno tipo I [19]. En este estudio hemos confirmado el fenotipo condrocitario de las células cultivadas mediante estudios inmunohistoquímicos (condroitin sulfato) y rtPCR (colágeno II y SOX-9). El nivel de colágeno disminuye con la edad y con la gravedad de enfermedad [1]. Un estudio comparando células procedentes de pacientes de escoliosis y degeneración discal ha enseñado que los pacientes con degeneración discal tienen menos mRNA para colágeno tipo II. Como todos los pacientes en nuestro estudio tenían degeneración discal moderada-grave, no se pudo comparar.

Mediante histoquímica y rtPCR pudimos confirmar la presencia del receptor TLR4 en las células cultivadas. Hasta ahora se ha confirmado la presencia de ese receptor en la rata [20]. Burke *et al.* [8] han descrito que las células del núcleo pulposo responden al estímulo con lipopolisacárido (LPS), que es el agonista del receptor TLR4, así

que la presencia del receptor en este tipo de células era esperado. En ese estudio, la respuesta inflamatoria de las células a LPS fue diferente y más pronunciada en los pacientes con enfermedad degenerativa comparado con pacientes con escoliosis. Queda por confirmar si los niveles del receptor TLR4 varían en diferentes estadios de la hernia discal y si tienen correlación con el empeoramiento de las síntomas. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg (Am)* 2006; 88(Suppl 2):10-4.
2. García-Cosamalón J. Intervertebral disc, sensory nerves and neurotrophins: who is who in discogenic pain? *J Anat* 2010; 217:1-15.
3. Urban J PG, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res. Ther* 2003; 5:120-30.
4. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, *et al.* Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8514-9.
5. Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, Yin H. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem* 2010; 114:13-27.
6. Zhang Q. Differential Toll-like receptor-dependent collagenase expression in chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1633-41.
7. Huang KY. IL-20 may contribute to the pathogenesis of human intervertebral disc herniation. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 2008; 33:2034-40.
8. Burke JG. Human nucleus pulposus can respond to a pro-inflammatory stimulus. *Spine (Phila. Pa. 1976)* 2003; 28:2685-93.
9. Wang F. Ex vivo observation of human nucleus pulposus chondrocytes isolated from degenerated intervertebral discs. *Asian Spine J.* 2011; 5:73-81.
10. Horner HA. Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on matrix expression and cell phenotype. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 2002; 27:1018-28.
11. Gruber HE, Stasky A, Hanley EN. Characterization and phenotypic stability of human disc cells in vitro. *Matrix Biol* 1997; 16:285-8.
12. Gruber HE. Human intervertebral disc cells from the annulus?: Three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF- β 1. 1997; 21:13-21.
13. Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, Gründer T. Human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 2005; 30:2743-8.
14. Heidari M, Tahmasebi M, Etemad, S. In vitro human chondrocyte culture: a modified protocol. 2011; 9:102-9.
15. Barbero, A. Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12:476-84.
16. Tran-Khanh N, Hoemann CD, McKee MD, Henderson JE, Buschmann MD. Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix. *J Orthop Res* 2005; 23:1354-62.
17. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:R45.
18. Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease. *Eur Spine J* 2008; 17(Suppl 4):452-8.
19. Eyre BDR, Muir H. Types I and II collagens in intervertebral disc. 1976; 157:267-70.
20. Rajan NE. Toll-Like receptor 4 (TLR4) expression and stimulation in a model of intervertebral disc inflammation and degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013; 38:1343-51.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.