

Utilidad del plasma rico en plaquetas como soporte de células estromales en terapias regenerativas del Sistema Nervioso

Usefulness of platelet-rich plasma as a scaffold for stromal cells in regenerative therapies of the Nervous System

Zurita M, Aguayo C, Vaquero J

Unidad de Investigación Neurociencias, FUNDACIÓN MAPFRE. Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda. Majadahonda, Madrid.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Analizar la supervivencia y diferenciación neural de células madre estromales (CME) humanas, soportadas en matrices biológicas de fibrina y de plasma sanguíneo.

Métodos: Se realizaron estudios *in vitro* utilizando matrices de fibrina, de plasma pobre en plaquetas (PPP) y de plasma rico en plaquetas (PRP), como soporte de células estromales humanas obtenidas de médula ósea.

Resultados: A los siete días de cultivo, las células estromales humanas mostraron escasa supervivencia sobre matrices de fibrina, mientras que la supervivencia y capacidad proliferativa fue del 100% sobre matrices de plasma. En cuanto a la diferenciación fenotípica hacia células nerviosas, la diferenciación fue nula sobre matrices de fibrina. Sin embargo, sobre matrices de PPP, el 35,4% de las células expresaron marcadores de diferenciación neuronal y el 20,8% expresaron marcadores de diferenciación astrocítica. El porcentaje de CME que expresaron marcadores neuronales y astrocíticos se incrementaron ($p < 0,05$), al 41,6% y 26,7% respectivamente, cuando la matriz de soporte es PRP.

Conclusión: El PRP se comporta como una matriz adecuada de soporte biológico para células estromales de médula ósea, con posible utilidad en estrategias de terapia celular aplicadas al Sistema Nervioso.

Palabras clave:

Terapia celular, células madre estromales, matrices biológicas.

Abstract

Objective: To analyze survival and neural differentiation of human stromal stem cells supported in biological matrices of fibrin and blood plasma.

Methods: *In vitro* studies have been conducted using fibrin, platelet-poor plasma and platelet-rich plasma, as scaffolds of human stromal stem cells obtained from bone marrow.

Results: at seven days of culture, human stromal cells showed poor survival on fibrin scaffolds, while the survival is virtually 100% using plasma scaffolds. As for the phenotypic differentiation into neurons or astrocytic cells, differentiation is absent on fibrin scaffolds. However, on scaffolds of platelet-poor plasma, 35.4% of cells express markers of neuronal differentiation and 20.8% expressed astrocytic differentiation markers. The percentage of stromal cells expressing neuronal and astrocytic markers increases, with statistically significant difference ($p < 0.05$), to 41.6% and 26.7% respectively, when the scaffold is platelet-rich plasma.

Conclusion: The platelet-rich plasma is an excellent biological scaffold for bone marrow stromal cells in cell therapy strategies on the Nervous System.

Key words:

Cell therapy, stromal stem cells, biological scaffolds.

Correspondencia

J. Vaquero
Hospital Universitario Puerta de Hierro. 28222-Majadahonda, Madrid
jvaquero@telefonica.net

Introducción

Uno de los principales problemas en el campo de la terapia celular aplicada a la regeneración del Sistema Nervioso radica en lograr la supervivencia y diferenciación de las células trasplantadas. En el presente estudio se hace un análisis de la utilidad de matrices biológicas de fibrina, plasma pobre en plaquetas (PPP) y plasma rico en plaquetas (PRP), como soporte de células madre estromales humanas.

Los datos que hemos obtenido en nuestro laboratorio a lo largo de los últimos años muestran que, tras el trasplante de células madre estromales (CME) en cavidades postraumáticas del Sistema Nervioso Central (SNC), ya sean cerebrales o medulares, una gran cantidad de las células trasplantadas mueren por fenómenos de apoptosis, inducidos por la ausencia de contacto intercelular. En estas condiciones, se hace necesario encontrar matrices de soporte celular que se adapten a las cavidades postraumáticas y permitan la supervivencia, migración y diferenciación neural, de las células estromales trasplantadas.

Por otra parte, a la hora de buscar una matriz de soporte celular, ésta debe ser una matriz homologada para uso clínico, puesto que matrices idóneas para lograr supervivencia y diferenciación celular podrían ser incompatibles con su aplicación intracerebral o intramedular o, al menos, carecer de homologación para su utilización en clínica humana.

Entre las matrices teóricamente útiles disponemos del gel de fibrina comercial (Tissucol-Duo®, Baxter-Immuno) que se utiliza con mucha frecuencia en cirugía, sobre todo como sellante biológico, y que es una de las matrices de soporte celular más utilizadas en la terapia celular dentro del campo de la traumatología y de la cirugía máxilo-facial aunque su empleo como soporte de CME *in vivo* no aporta beneficios significativos desde el punto de vista funcional en animales sometidos a terapia celular después para paliar las secuelas de una lesión traumática cerebral crónicamente establecida [1], tal vez porque la malla tisular que produce no permite la migración y la adecuada diferenciación neural de las células madre mesenquimales.

Por otra parte, estudios previos realizados *in vivo* sugieren que la suspensión de las CME en plasma puede ser útil para los protocolos de terapia celular aplicados a regeneración de la médula espinal [2].

En el presente trabajo nos proponemos estudiar *in vitro* la utilidad de matrices derivadas de fibrina y de plasma, como soporte de CME humanas, y estudiar si las matrices formadas por PRP ofrecen ventajas respecto del empleo de las matrices de PPP. En cualquier caso, el objetivo del estudio es encontrar datos que permitan optimizar los protocolos de terapia celular en lesiones traumáticas del SNC

que actualmente se están empezando a desarrollar en clínica humana.

Material y métodos

En el curso de este estudio se valoró la proliferación, supervivencia y diferenciación neural, *in vitro*, de CME humanas obtenidas de donantes sanos, tras consentimiento informado, en el curso de intervenciones traumatológicas. Se utilizaron matrices de soporte celular constituidas por fibrina, por PPP (plasma pobre en plaquetas) y por PRP (plasma rico en plaquetas). Los estudios se hicieron sobre 10 matrices diseñadas para cada uno de los grupos experimentales, ofreciendo los valores medios de cada grupo, para medidas de comparación estadística. Todas las matrices se polimerizaron en placas P35, (aproximadamente 10 explantes por placa) y se incubaron durante 1 hora, a 37°C, con humedad relativa del 95% y el 5% de CO₂. Las CME se mezclaron con 500 UI de trombina humana disuelta en cloruro cálcico al 10% antes de la polimerización de las matrices, con un total de 50.000 células por explante. Posteriormente, se añadieron, a cada placa, 3 ml de medio de cultivo α -MEM/10%FBS completo. Las observaciones morfológicas de las células incluidas en las matrices se realizaron con un microscopio invertido, tras siete días de cultivo. Al objeto de inducir la diferenciación neural de las CME se añadió diariamente al medio de cultivo 100 ng/ml de Factor de Crecimiento Nervioso (FCN) humano. Se estudiaron 10 matrices, recogiendo el valor medio de todas ellas.

Como consecuencia del estudio, se determinaron los porcentajes de supervivencia, proliferación, apoptosis y diferenciación neural de las CME en las diferentes matrices diseñadas (matrices de fibrina, de PPP y de PRP). Se hicieron estudios comparativos entre grupos (cultivos de CME en las diferentes matrices diseñadas) utilizando el programa estadístico InStat (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), considerándose valor de significación estadística un valor de $p < 0.05$.

Obtención y preparación de las CME

Las CME se obtuvieron a partir de hueso trabecular en pacientes adultos sanos (52 a 60 años) sometidos a cirugía de reemplazo total de cadera. El aspirado de médula ósea se sometió a la técnica de Ficoll-Hypaque. Tras separar la capa de células mononucleares, las CME se resuspendieron en medio α -MEM/10%FBS. El número de células y la viabilidad se determinó mediante el estudio con azul tripán, y las células se cultivaron con una densidad de 5.000 células/cm², en frascos T-75, con α -MEM suplementado con suero fetal bovino 10%, penicilina y sulfato de estreptomina.

Se utilizó citometría de flujo para determinar marcadores específicos en las CME cultivadas. Para ello, las células en suspensión se mezclaron con anticuerpos conjugados con fluorocromos contra CD29, CD31, CD44, CD45, CD105 y CD166 (R&D Systems SL, Inc Minnesota, EEUU). Las CME utilizadas en nuestro estudio mostraron el siguiente perfil fenotípico tras los estudios de citometría de flujo: CD29+, CD44+, CD105+, CD166+, CD34-, CD45-.

Preparación de las matrices de fibrina

Las matrices de fibrina se basaron en el uso de un preparado comercial (Tissucol Duo®, Baxter Inmuno) mezclando las soluciones A y B del mismo. La solución A consiste en una mezcla de fibrinógeno (100mg/ml), factor XIII (10 UI), fibronectina (9 mg) y plasminógeno humano (120 mg/ml), disuelta en aprotinina de origen bovino (3000 UIK), albúmina humana, glicina, cloruro sódico, citrato sódico, polisorbato 80, creatina y agua. La solución B contenía trombina humana (500 UI) y cloruro cálcico (40 µM) al 10% en cloruro sódico. Ambas soluciones se mezclan en una proporción 1:1.

Preparación de las matrices de PPP

Para la preparación de las matrices de plasma, se obtuvo sangre periférica de donantes sanos en tubos con citrato de sodio al 3,8% (0,5 cc de citrato/4,5cc de sangre total). Las muestras de sangre con anticoagulante se centrifugaron a 4.100 g, durante 15 minutos, para obtener la fracción de plasma sin glóbulos rojos, seguida de una segunda centrifugación a 300 g, durante otros 5 minutos, y de una tercera centrifugación a 4.600 g, durante 15 minutos, para precipitar las plaquetas.

Preparación de las matrices de PRP

Para la preparación de las matrices de PRP, se obtuvo sangre periférica de donantes sanos en tubos con citrato de sodio al 3,8% (0,5 cc de citrato/4,5 cc de sangre total). Las muestras de sangre con anticoagulante se centrifugaron a 4.100 g, durante 15 minutos, seguida de una segunda centrifugación a 300 g, durante 5 minutos, para obtener la fracción de PRP.

Estudios citológicos

La viabilidad celular se determinó mediante la observación de la morfología de las células con el microscopio invertido, utilizando una escala basada publicada por Willert et al [3], considerando los siguientes parámetros de valoración: 0: todas las células están muertas y aparecen flotando en el medio de cultivo; 1: solo algunas células es-

tán vivas, con morfología redondeada; 2: se observaron muchas células vivas, pero solo unas pocas muestran expansiones citoplasmáticas y el resto presentaban una morfología redondeada; 3: la mayoría de las células estaban vivas y muchas de ellas mostraban una morfología fibroblástica; 4: todas las células sobrevivían y todas ellas mostraban morfología fibroblástica.

Para intentar determinar el grado de diferenciación celular morfológica y de acuerdo con sus expansiones citoplasmáticas, se utilizó la siguiente escala, 0: las células permanecían indiferenciadas y la mayoría mantenían una morfología redondeada; 1: las células permanecen indiferenciadas y solo unas pocas mostraban una morfología fibroblástica; 2: las células permanecían indiferenciadas, pero la mayoría mostraban morfología fibroblástica; 3: unas pocas células mostraron cambios en el tamaño del citoplasma y presentaban algunas prolongaciones; 4: la mayoría de las células mostraron importantes cambios en su citoplasma y presentaron numerosas expansiones citoplasmáticas; 5: todas las células mostraron importantes cambios en su citoplasma y presentan numerosas expansiones.

Estudios de proliferación y de apoptosis

La capacidad de proliferación de las CME sobre las diferentes matrices fue medida en función de la expresión de Ki-67 (LabVision Westinghouse, Dr. Fremont, CA, EE.UU.) y la tasa de muerte celular se valoró mediante la tinción de TUNEL, al cabo de siete días en cultivo.

Estudios de diferenciación neural

Para los estudios de diferenciación neural, se realizaron estudios inmunohistoquímicos, tras una semana de cultivo. Se hicieron estudios para identificación de nestina (International Inc., Temecula, CA, EE.UU.), beta-III-tubulina (Chemicon International Inc., Temecula, CA, EE.UU.), para estudiar diferenciación neuronal, y PGFA (Chemicon International Inc., Temecula, CA, EE.UU.) para estudiar la diferenciación astrocítica de las CME.

Estudios de Microscopía Electrónica

Para microscopía electrónica de transmisión, las muestras fueron fijadas con glutaraldehído en un tampón de cacodilato sódico (pH 7,35) durante 48-72h a 4°C, con postfijación en 1% de tetróxido de osmio a temperatura ambiente. Las muestras fueron incluidas en araldita y se utilizó un microscopio electrónico Philips EM-200 para confirmar imágenes de apoptosis y para diferenciar apoptosis de necrosis celular.

Resultados

La Tabla I muestra los porcentajes medios, para cada una de las matrices estudiadas, en lo que respecta a supervivencia celular y expresión de nestina, beta-III tubulina, PGFA, TUNEL y Ki67 por parte de las CME.

En general, las matrices de fibrina mostraron una malla consistente y bastante manejable, pero las CME no conseguían adherirse adecuadamente, y a las pocas horas de su cultivo aparecían formando aglomerados de células, con una morfología redondeada y solo de forma ocasional se podía visualizar alguna célula con la típica morfología mesenquimal (viabilidad morfológica grado 1). En estas matrices no había ningún signo de diferenciación neural después de siete días de tratamiento del cultivo con FCN, presentando las células una morfología redondeada (grado 0 de diferenciación).

Los estudios inmunohistoquímicos confirmaron los hallazgos morfológicos en cuanto a la ausencia de diferenciación fenotípica neural, ya que en ningún momento se observaron CME positivas a nestina, beta-III-tubulina o PGFA.

Por otra parte, se observó una mínima supervivencia celular ($2,1 \pm 1,4\%$) según la tinción con bromuro de etidio. Las CME mantuvieron en la mayoría de los casos una morfología esférica, quedando atrapadas entre las redes de fibrina. Presentaban una morfología compatible con apoptosis, mostrando un núcleo típicamente condensado y picnótico y un citoplasma retraído, siendo posible observar la formación de cuerpos apoptóticos.

Los estudios de microscopía electrónica mostraron una cromatina nuclear condensada en torno a la membrana nuclear y un citoplasma retraído donde se observaban pequeños orgánulos y numerosas vesículas, es decir, características que confirmaban las alteraciones de apoptosis. Al lado de

estas células se observaron cuerpos apoptóticos, rodeados de membrana y con cromatina condensada en su interior.

En el caso de las matrices de fibrina, el porcentaje de células TUNEL-positivas fue siempre mayor que el porcentaje de células en proliferación. Como valores medios, tras recoger datos de la totalidad de matrices de fibrina estudiadas, se recogió que el porcentaje de células TUNEL-positivas era del $80 \pm 7,8\%$ y el de células Ki67-positivas, del $0,8 \pm 0,2\%$.

Las matrices de PPP mostraron suficiente consistencia para ser utilizadas como soporte celular. Las CME se adherieron a la matriz desde el inicio del cultivo, mostrando una típica morfología mesenquimal. Mostraban una gran proliferación, incrementándose su número exponencialmente a lo largo de los primeros siete días de cultivo. En ningún momento se observaron imágenes celulares compatibles con células en apoptosis. La viabilidad medida mediante la tinción con bromuro de etidio mostró una supervivencia del $99,1 \pm 0,8\%$. En el estudio de microscopía electrónica, las CME mostraban una morfología redondeada, con un núcleo ovoide, extenso retículo endoplásmico, mitocondrias y numerosas vesículas citoplasmáticas. La morfología celular, de acuerdo a la escala modificada de Willert et al [3] fue de grado 3 los primeros 3 días del cultivo y luego se apreció un grado 4, manteniéndose así a lo largo de los siete días de estudio.

La capacidad de proliferación de las CME sobre las matrices de PPP (medida en base a la expresión de Ki67) y la tasa de muerte celular medida por la expresión de células TUNEL positivas mostró una proliferación media del $98,7 \pm 1,1\%$. Paralelamente, el número de células TUNEL positivas fue muy pequeño, con un valor medio de $1,2 \pm 1,3\%$ (Figura 1).

Cuando las células fueron cultivadas en presencia de FCN sobre matrices de PPP, el porcentaje de diferenciación neural fue muy superior al obtenido en el grupo de matrices de fibrina. A los siete días del tratamiento con FCN, las matrices de PPP mostraron en general un alto porcentaje de células con signos de diferenciación neural, con retracción del citoplasma y algunas protrusiones citoplasmáticas. Como media, el $70,2 \pm 3,2\%$ de las células, teniendo en cuenta la totalidad de las matrices estudiadas, mostraban importantes signos microscópicos de diferenciación (grado 4). Esta diferenciación morfológica se correlacionaba claramente con una diferenciación fenotípica neural, ya que desde el punto de vista inmunohistoquímico, los porcentajes medios de células con expresión de nestina, beta-III-tubulina y PGFA, fueron del $4,2 \pm 2,1\%$, $35,4 \pm 4,3\%$ y $20,8 \pm 4,3\%$, respectivamente.

Las matrices de PRP fueron consistentes, estables y manejables sin excesiva dificultad. Las CME se adherían adecuadamente a las proteínas de la matriz desde el primer día

Tabla 1. Datos comparativos de supervivencia celular, diferenciación fenotípica neural (nestina), neuronal (Beta-III-tubulina) y astrocítica (PGFA), apoptosis (TUNEL) y proliferación (Ki67) de las CME soportadas por matrices de fibrina (F), plasma pobre en plaquetas (PPP) y plasma rico en plaquetas (PRP)

	Fibrina X ± DE	PPP X ± DE	PRP X ± DE
Supervivencia (%)	2,1 ± 1,4	99,1 ± 0,8***	99,5 ± 0,2***
Nestina+ (%)	0	4,2 ± 2,1***	7,2 ± 1,8***
Beta III tubulina+ (%)	0	35,4 ± 4,3*	41,6 ± 5,8*
PGFA+ (%)	0	20,8 ± 4,3*	26,7 ± 6,5*
TUNEL+ (%)	80 ± 7,8	1,2 ± 1,3***	0,5 ± 0,3***
Ki67+ (%)	0,8 ± 0,2	98,7 ± 1,1*	99 ± 0,8*

*** p<0,0001; * p<0,05.

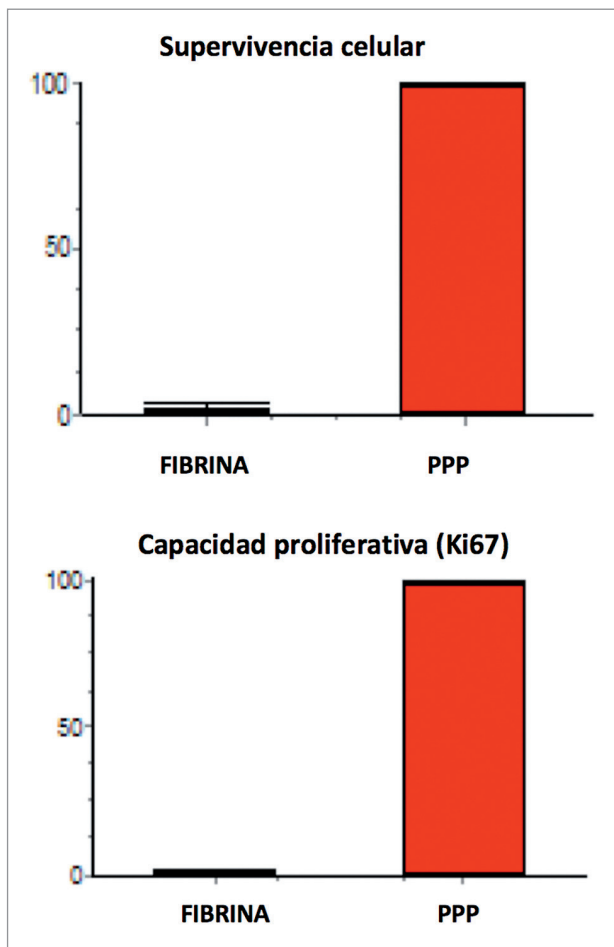


Fig. 1. Porcentaje de células madre estromales (CME) con signos morfológicos de supervivencia y con expresión de Ki67 (capacidad proliferativa) en las matrices de fibrina y de plasma pobre en plaquetas (PPP), a los siete días de cultivo.

del cultivo, de tal forma que a las pocas horas de su cultivo se podían localizar células dispersas de una forma homogénea entre la malla de proteína y las células, las cuales presentaban una típica morfología mesenquimal, con un citoplasma expandido y con emisión de prolongaciones. Mostraban igualmente una gran capacidad de proliferación, incrementándose su número exponencialmente a lo largo de los siete días del estudio. En ningún momento se observaron imágenes celulares compatibles con células en apoptosis. La viabilidad medida mediante la tinción con bromuro de etidio mostró una supervivencia del $99,5 \pm 0,2\%$. En el estudio de microscopía electrónica, las CME mostraban una morfología redondeada, con un núcleo ovoide, extenso retículo endoplásmico, mitocondrias y numerosas vesículas citoplasmáticas. La morfología celular, de acuerdo a la escala modificada de Willert et al [3] fue de grado 3 los primeros 3 días del cultivo y luego se

apreció un grado 4, manteniéndose esta valoración al final de la primera semana de cultivo.

Por otra parte la capacidad de proliferación de las CME sobre las matrices de PRP (medida en base a la expresión de Ki67) y la tasa de muerte celular objetivada por la técnica de TUNEL mostró mejores resultados que en el caso de las matrices de fibrina, ya que este balance estaba más inclinado hacia el lado de la proliferación, siendo mucho menor el número de células TUNEL positivas (Figura 2). Las CME cultivadas sobre las matrices de PRP presentaban una alta tasa de proliferación (Figura 3) con un valor medio de célu-

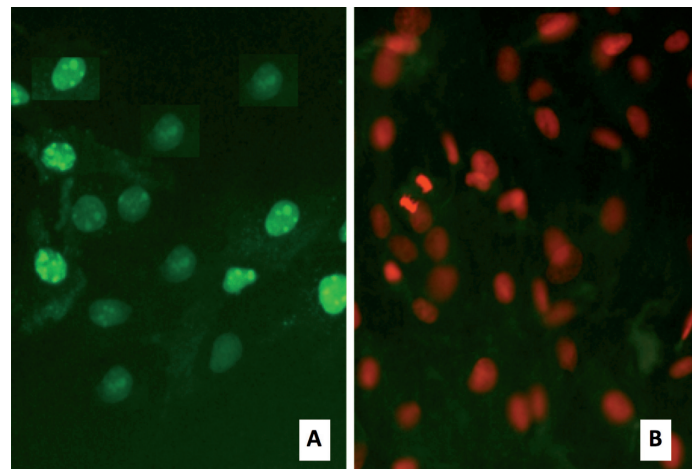


Fig. 2. Estudios de inmunofluorescencia con técnica de TUNEL para ver células madre estromales (CME) en apoptosis. En las matrices de fibrina (A) existen numerosas células en apoptosis (tinción nuclear en verde). En las matrices de plasma rico en plaquetas (PRP) no se aprecian células en apoptosis (B). Siete días de cultivo.

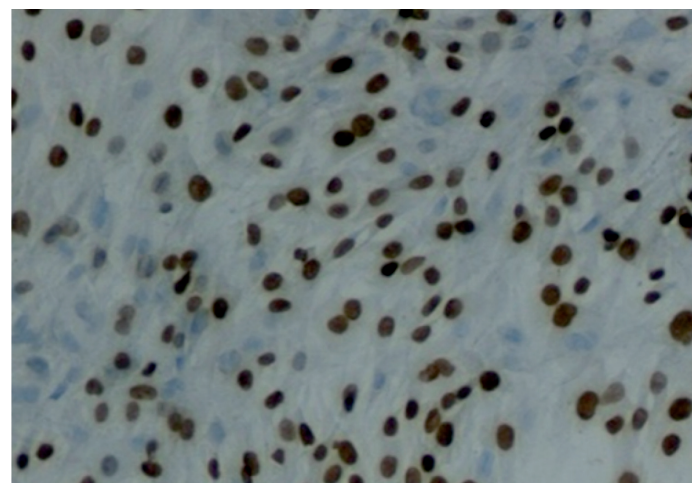


Fig. 3. Células madre estromales (CME) cultivadas sobre una matriz de plasma rico en plaquetas (PRP). Técnica inmunohistoquímica para detectar proliferación celular (Ki67). Prácticamente todas las células muestran positividad a Ki67. Siete días de cultivo.

las expresando Ki67 del $99 \pm 0.8\%$. Paralelamente, el número de células TUNEL positivas era muy pequeño y en ningún caso fue superior al 0.8% ($0.5 \pm 0.3\%$).

Cuando las células fueron cultivadas en presencia de FCN sobre matrices de PRP, el porcentaje de diferenciación neural fue muy superior al obtenido en el grupo de matrices

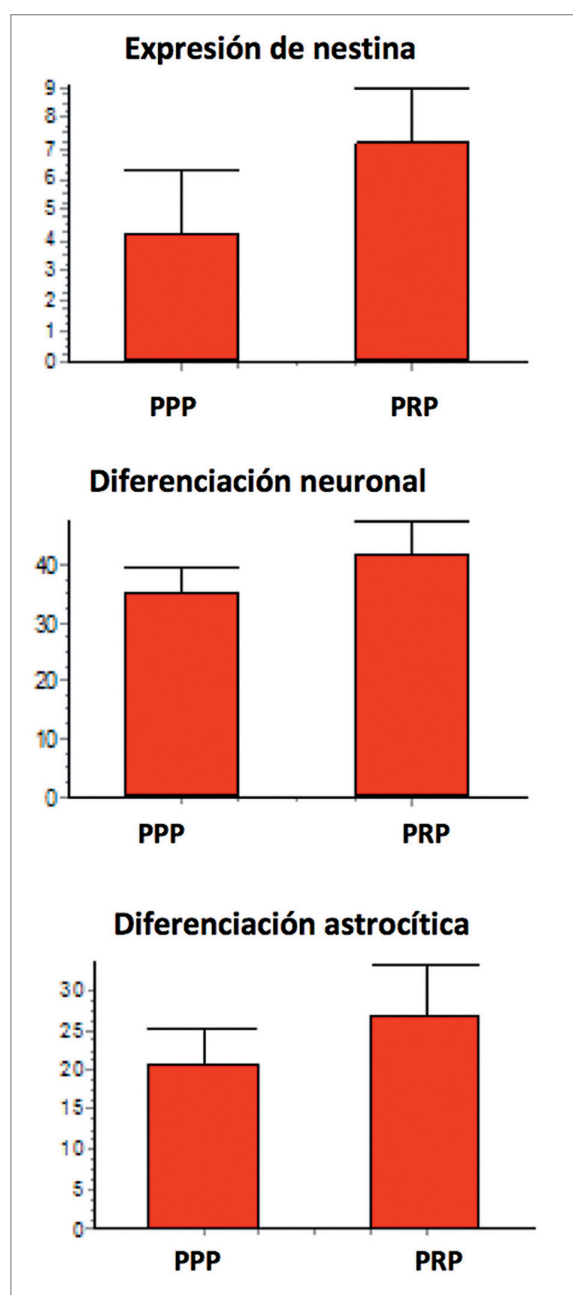


Fig. 4. Porcentajes de células madre estromales (CME) con expresión de marcadores de diferenciación neural (nestina), de diferenciación neuronal (Beta-III tubulina) y de diferenciación astrocítica (PGFA) en las matrices de plasma pobre en plaquetas (PPP) y de plasma rico en plaquetas (PRP) a los 7 días de cultivo. La expresión de los marcadores es superior en el caso de las matrices de PRP ($p < 0.05$).

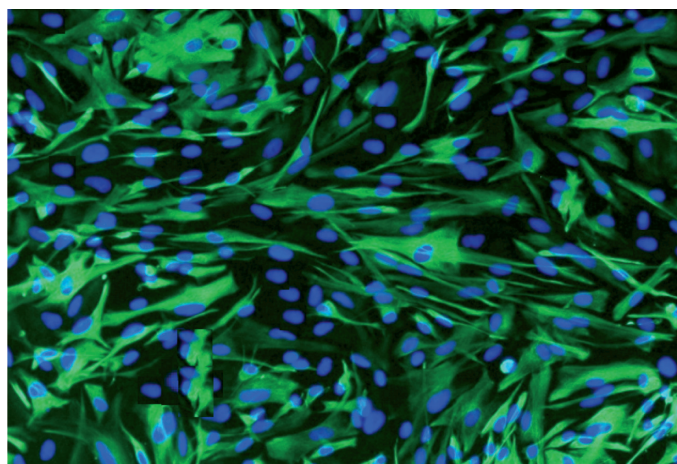


Fig. 5. Expresión de Beta-III-tubulina (diferenciación neuronal) en el caso de un cultivo de células madre estromales (CME) soportadas en una matriz de plasma rico en plaquetas (PRP). Siete días de cultivo.

de fibrina y de PPP (Figura 4). A los siete días del tratamiento con FCN, las matrices de PRP mostraron en general un alto porcentaje de células con signos de diferenciación neural, con retracción del citoplasma y algunas protrusiones citoplasmáticas. Como media, el $78,2\%$ de las células, teniendo en cuenta la totalidad de las matrices estudiadas, mostraban importantes signos microscópicos de diferenciación (grado 4). Esta diferenciación morfológica se correlacionaba claramente con una diferenciación fenotípica neural, ya que desde el punto de vista inmunohistoquímico, los porcentajes medios de células con expresión de nestina, beta-III-tubulina y PGFA, fueron del $7,2 \pm 1,8\%$, $41,6 \pm 5,8\%$ y $26,7 \pm 6,5\%$, respectivamente (Figura 5).

Discusión

En el momento actual son numerosos los estudios sobre terapia celular con células madre adultas que se están desarrollando para el tratamiento de diversas enfermedades en el campo de la odontología, cardiología, traumatología o neurocirugía [4][5]. Pero a pesar de los datos que avalan la capacidad de las células madre para reparar el tejido dañado, la regeneración tisular que se consigue está muy limitada por la escasa supervivencia de las células trasplantadas. La mayor parte de las células mueren en los primeros días tras el trasplante, debido a las condiciones adversas que se encuentran en el lugar de inyección (isquemia, inflamación). En estas circunstancias un gran porcentaje de células mueren por anoikis, una forma peculiar de apoptosis desencadenada por la pérdida de contacto intercelular, como se ha demostrado después de trasplantes celulares, tanto en lesiones del Sistema Nervioso [6] como en lesiones cardíacas [7].

Para paliar este problema se hace necesario llevar a cabo la administración de células funcionalmente activas junto con matrices de soporte, donde las células se puedan adherir, proliferar y migrar, y donde los estímulos físicos y químicos procedentes del entorno tisular lleguen sin problemas, ya que también son indispensables para determinar la conducta de las células [8].

En nuestro presente estudio hemos desarrollado un análisis comparado de matrices de fibrina, PPP y PRP, para valorar su capacidad de soporte de CME humanas y de lograr supervivencia y diferenciación de las mismas hacia un fenotipo neural, con el objetivo de determinar su utilidad a la hora de ser aplicadas sobre lesiones del SNC, donde en la mayor parte de las ocasiones, tras una lesión traumática se desencadenan una serie de mecanismos fisiopatológicos que culminan con la aparición de una cavidad en el seno del tejido y donde la supervivencia de las células tras una terapia celular es muy limitada.

El gel de fibrina constituye una matriz muy utilizada en diversos estudios clínicos y experimentales y se forma polimerizando fibrinógeno con trombina y calcio, formándose así una malla de fibrina que simula los últimos pasos de la cascada de la coagulación sanguínea. Inicialmente se preparaba con plasma de donante, pero debido a la baja concentración de fibrinógeno en el plasma, la estabilidad y calidad de la matriz era muy baja. Actualmente existen preparados comerciales de gel de fibrina (Tissucol-Duo®) que se utilizan como matriz de soporte celular en estudios clínicos de terapia celular, sobre todo en el campo de la traumatología y de la cirugía máxilo-facial. Estas matrices permiten el crecimiento celular y además permiten la incorporación de factores de crecimiento [9-11]. Por otra parte, pueden ser modificadas en su consistencia, manipulando las concentraciones de fibrinógeno, calcio y trombina durante el proceso de polimerización. De esta forma, las matrices de fibrina se han utilizado como soporte de células madre embrionarias, fibroblastos, o incluso células madre adultas mesenquimales [12][13].

No obstante, en nuestro estudio se ha constatado una baja supervivencia celular en estas matrices, posiblemente debido a que el gel de fibrina utilizado es tan denso que las células se quedan atrapadas entre la red de proteína y aunque se adhieren a la matriz, no tienen posibilidad de expandirse ni de migrar. Es conocido que la conformación de la fibrina y las propiedades mecánicas del gel son dependientes de la concentración de fibrinógeno [12] pero estos datos no excluyen que el resto de los componentes del gel de fibrina, como puede ser la trombina o el cloruro cálcico, puedan jugar un papel importante en la capacidad de adhesión y proliferación de las células, de hecho no hay un

consenso claro y existen estudios que aseguran que altas concentraciones de trombina pueden inhibir la migración de las células sobre las matrices de fibrina [12]. Existen estudios *in vivo* que demuestran cómo las CME, cuando se trasplantan junto con un gel de fibrina, no se quedan atrapadas, sino que pueden migrar y penetrar en los tejidos adyacentes y esto posiblemente es debido a que *in vivo* la degradación de la matriz es mucho más rápida que *in vitro*, lo que favorece la migración celular y su colonización de los tejidos adyacentes [13]. Otros estudios señalan que la concentración de fibrinógeno es un factor más limitante que la trombina a la hora de permitir la expansión y migración de las células [14][15].

En nuestro estudio, las concentraciones de fibrinógeno y trombina utilizadas para diseñar las matrices de fibrina se han elegido intentando mantener la proporción entre el fibrinógeno y la trombina existente en los preparados comerciales. Por otra parte, nuestros resultados sugieren que la concentración de trombina no es un factor condicionante de la supervivencia celular, puesto que con la misma concentración de trombina (500 UI) en las matrices de fibrina encontramos baja supervivencia celular, mientras que en las matrices de plasma la supervivencia celular es cercana al 100%. Estos datos sugieren que posiblemente sea el fibrinógeno el factor que tenga una mayor implicación en cuanto a la permisividad de la supervivencia celular.

El PRP representa una de las matrices autólogas más utilizadas en ortopedia y en cirugía oral y máxilo-facial desde hace tiempo, pero no ha sido nunca utilizado hasta el momento en terapias regenerativas del SNC. Un coágulo sanguíneo natural contiene un 95% de hematíes, un 5% de plaquetas, menos de un 1% de leucocitos y fibrina.

En numerosas ocasiones se utiliza el PRP con la finalidad de aportar factores tróficos diversos, de origen plaquetario. Estos factores tróficos tienen acciones específicas en los tejidos, y además interactúan con otros factores tróficos, logrando activación de genes y producción de determinadas proteínas [16]. Cuando la fracción plaquetaria se mezcla con la trombina en un lapso de unos 20 segundos se forma un gel enriquecido con fibrina que contiene factores promotores del crecimiento celular derivados de las plaquetas [17], pero como el contenido de fibrinógeno es menor que el usado en las matrices de fibrina, la solidez de la matriz resultante es considerablemente menor, con unas propiedades físicas que permiten la nidación celular y su multiplicación.

Es bien conocido que los gránulos secretados por las plaquetas, los gránulos alfa, contienen numerosos factores de crecimiento, capaces de influir en la regeneración de diferentes tipos de tejidos cuando son liberados por las plaquetas,

tras ser éstas activadas por diversos estímulos, como puede ser la trombina [18][19]. Estos factores son críticos en la regulación de los procesos de curación de heridas y juegan un papel crucial en los procesos de litogénesis, quimiotaxis, diferenciación y metabolismo [20]. *In vivo*, la secreción activa de estos factores de crecimiento se inicia con el proceso de coagulación de la sangre, unos 10 minutos después de la formación del coágulo, mediante la fusión de los gránulos alfa plaquetarios con la membrana plasmática. Este proceso puede ser activo hasta 7 días, siendo numerosos los tipos celulares que poseen receptores para estos factores plaquetarios (osteoblastos, fibroblastos, células epidérmicas, células endoteliales, etc). Una vez que se produce la unión receptor-factor de crecimiento, se activan una serie de señales internas que provocan la expresión de una secuencia genética correspondiente bien a la proliferación celular o a otras funciones biológicas. Aunque su mecanismo de actuación no es claro, los factores tróficos liberados por la plaquetas junto con las señales ambientales hacen que las CME migren, se dividan e incrementen la síntesis de matriz extracelular [21].

Son muchos los datos que existen acerca de la capacidad de las matrices biológicas de PRP para inducir la diferenciación de las CME hacia hueso o cartílago [22], y como resultado de nuestro presente estudio, hemos podido demostrar que las CME son capaces de adquirir un fenotipo neuronal, si a las matrices de PRP se le añaden factores de crecimiento neuronal, hecho que cobra alta importancia de cara a su utilización en terapias del SNC. Nuestros resultados demuestran, por tanto, que factores neurotróficos como el FCN tienen capacidad de lograr la transdiferenciación de CME humanas adultas cuando se incorporan a las matrices de plasma. El hecho de poder inducir la diferenciación neural de las CME humanas *in vitro* sobre matrices biológicas de plasma, abre teóricamente muchas posibilidades respecto del tratamiento de lesiones del SNC mediante técnicas de terapia celular y permite plantear la utilidad de dichas matrices para evitar la pérdida celular por apoptosis tras un trasplante. Aunque se han descrito procesos de diferenciación de células madre sobre matrices de fibrina, no existen datos acerca de si puede tener lugar procesos de transdiferenciación neural de CME cultivadas sobre matrices plasmáticas.

Además, nuestros resultados confirman que factores neurotróficos, tales como el FCN, son capaces de transdiferenciar CME adultas hacia una morfología neural, y teniendo en cuenta que estos factores de crecimiento son liberados por células del SNC, es lógico admitir su implicación en los fenómenos de diferenciación celular que tiene lugar *in vivo* cuando las CME se trasplantan en el cerebro o en la médula espinal.

En cuanto a la eficacia de las diferentes matrices biológicas utilizadas como soporte de CME, nuestros resultados muestran que la supervivencia de las CME es muy escasa en las matrices de fibrina, siendo extraordinariamente alta en las matrices de plasma, tanto si es plasma pobre o rico en plaquetas. En cuanto a la proliferación y apoptosis, es obvio que, confirmando los datos de supervivencia, las matrices de plasma son extraordinariamente eficaces en comparación con la escasa proliferación celular y altísimo índice de apoptosis que muestran las CME en matrices de fibrina. Cuando se analizan estas ventajas respecto de que se trate de matrices de plasma pobre o rico en plaquetas, no hemos encontrado que la presencia de factores plaquetarios tenga influencia significativa sobre la supervivencia celular, proliferación o apoptosis. Sin embargo, a la hora de analizar los fenómenos de diferenciación celular, nuestros resultados muestran que las matrices de fibrina no permiten diferenciación neural de las CME, al contrario de lo que ocurre en el caso de utilizar matrices plasmáticas. Además, es significativa la diferencia obtenida entre matrices de plasma pobre o rico en plaquetas, en cuanto a la diferenciación neural obtenida, siendo estadísticamente significativa la mayor la diferenciación fenotípica hacia neuronas y astrogliá en presencia de PRP, en comparación con lo que ocurre en el caso de matrices de PPP. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Rodríguez A, Zurita M, Vaquero J. Estudio de la utilidad del gel de fibrina como soporte celular en el trasplante intracerebral de células madre mesenquimales. *Trauma Fund MAPFRE* 2009; 20:243-8.
2. Zurita M, Vaquero J, Bonilla C, Santos M, De Haro J, Oya S, et al. Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation* 2008; 86:845-53.
3. Willert SM, Arendas KJ, Gottlieb DI, Sakiyama Elbert SE. Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. *Biomaterials* 2006; 27:5990-6003.
4. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardioimycytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007; 25:1015-24.
5. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* 2003; 31:27-33

6. Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Katoh H, et al. *In vivo* imaging of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J* 2005; 19:1839-41.
7. Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45:567-81.
8. Samadikuchaksaraei A. An overview of tissue engineering approaches for management of spinal cord injury. *J Neuroeng Rehabil* 2007; 4:1-16.
9. Sakiyama-Elbert SE, Panitch A, Hubbell JA. Development of growth factor fusion proteins for cell-triggered drug delivery. *FASEB J* 2001; 15:1300-2.
10. Ruzzymah BH. Autologous human fibrin as the biomaterial for tissue engineering. *Med J Malaysia* 2004; 59(suppl B):30-1.
11. Schmoekel HG, Weber FE, Schense JC, Grätz KW, Schawaldler P, Hubbell JA. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. *Biotechnol Bioeng* 2005; 89:253-62.
12. Cox S, Cole M, Tawil B. Behavior of human dermal fibroblasts in three dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng* 2004; 10:942-54.
13. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cells transplantation. *Biomaterials* 2003; 24:2497-502.
14. Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JC, Helgerson S, Tawil B. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng* 2006; 12:2385-96.
15. Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu BM. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng* 2006; 12:1587-99.
16. Sunitha RV, Muniratham EN. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res* 2008; 19:42-6.
17. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91:4-15.
18. Harrison P, Cramer EM. Platelet-granules. *Blood Rev* 2003; 7:52-62.
19. Van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoeltinga PJ, Jansen JA. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 2006; 12:3067-73.
20. Garg AK. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dental Implantol Update* 2000; 11:17-21.
21. Lu HH, Vo JM, Chin HS, Lin J, Cozin M, Tsay R, et al. Controlled delivery of platelet-rich plasma derived growth factors for bone formation. *J Biomed Mater Res A* 2008; 86:1128-36.
22. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 2004; 10:955-64.

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.