

Purificación, cultivo y caracterización de fibrocitos humanos de sangre periférica

CAROLINA GARCÍA-DE ALBA ✉
KARINA BECERRIL
NANCY CRUZ

Unidad de Investigación. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas
Trabajo recibido: 18-XI-2009; aceptado: 08-IV-2010
Conflicto de intereses: ninguno

RESUMEN

Antecedentes: Los fibrocitos son una población de células progenitoras de fibroblastos y miofibroblastos descrita por primera vez en 1994. Coexpresan marcadores de células mesenquimatosas (colágena I), monocitos (CD14), antígeno panleucocitario (CD45) y células troncales hematopoyéticas (CD34). La presencia de fibrocitos ha sido documentada en padecimientos como el asma y la fibrosis pulmonar idiopática. Hasta el momento se sabe muy poco del papel que juegan los fibrocitos en los mecanismos moleculares que generan la fibrosis pulmonar, por lo que es de gran importancia su estudio tanto in vivo como in vitro. Nuestro objetivo fue establecer una técnica y condiciones de cultivo óptimas para obtener cultivos de fibrocitos altamente enriquecidos.

Palabras clave: Colágena I, fibroblastos, fibrocitos, fibrosis pulmonar.

Key words: Collagen I, fibroblasts, fibrocytes, pulmonary fibrosis.

Material y métodos: Se obtuvieron fibrocitos a partir de concentrados leucocitarios por dos métodos diferentes, el primero separándolos por sus propiedades adherentes y el segundo por enriquecimiento de células CD14+. La caracterización se llevó a cabo por citometría de flujo, análisis de síntesis de colágena, cuantificación de colágena en sobrenadantes de los cultivos e inmunocitoquímica para colágena I. Como control positivo se utilizó una línea celular de fibroblastos normales de pulmón.

Resultados: La citometría de flujo mostró que los cultivos de fibrocitos diferenciados a partir de células CD14+ contienen menor porcentaje de células contaminantes (linfocitos B y T) que los cultivos de fibrocitos obtenidos por adherencia. Además de esto,

ABSTRACT

Background: Fibrocytes constitute a population of progenitor cells for fibroblasts and myofibroblasts first described in 1994. They co-express markers of mesenchymal cells (collagen I), monocytes (CD14), pan-leukocyte antigen (CD45) and hematopoietic stem cells (CD34). The presence of fibrocytes has been documented in diseases such as asthma and idiopathic pulmonary fibrosis. Until now, the role of fibrocytes in the molecular mechanisms of pulmonary fibrosis is largely unknown, and thus their in vivo and in vitro study is of great importance. Our objective was to establish a technique and optimal culture conditions to obtain highly enriched fibrocytes cultures.

Material and methods: Fibrocytes were obtained from leukocyte concentrates by two different methods, firstly by separating them by their adherent properties, and secondly by CD14+ cells enrichment. Characterization was done by flow cytometry, collagen synthesis assay, collagen quantification in culture supernatant, and immunocytochemistry with an antibody against collagen I. A normal lung fibroblasts cell line was used as positive controls.

Results: Flow cytometry showed that fibrocytes cultures obtained from CD14+ cells had less percentage of contaminant cells (B and T lymphocytes) than cultures obtained by adherence. In addition, a higher percentage of collagen synthesis and more collagen concentration in media cultures were observed in these cultures (CD14+). Finally, immunocytochemistry images showed more expression of collagen I in cultures of fibrocytes differentiated from CD14+ cells.

la síntesis de colágena y la concentración de colágena en el medio fue mayor en estos mismos cultivos (CD14+). Por último, las imágenes de inmunocitoquímica mostraron mayor expresión de colágena I en cultivos de fibrocitos diferenciados a partir de células CD14+.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran que para obtener cultivos de fibrocitos altamente enriquecidos la mejor técnica es la de separar y cultivar células CD14+.

Conclusions: Our results show that the best technique to obtain highly enriched fibrocytes cultures is through separation and culture of CD14+ cells.

INTRODUCCIÓN

Los fibrocitos son una población de células circulantes progenitoras de fibroblastos y miofibroblastos que fue descrita por primera vez en 1994.¹ Comprenden del 0.1-0.5% de la población de leucocitos en sangre periférica, son células adherentes y cuando son cultivados adquieren una morfología en forma de huso muy parecida a la de los fibroblastos.² Coexpresan marcadores de células mesenquimatosas (colágena I, fibronectina), antígeno panleucocitario (CD45) monocitos (CD14) y células troncales hematopoyéticas (CD34).³⁻⁵

Existen diversas evidencias de que los fibrocitos circulantes pueden participar en la reparación de tejidos y cicatrización ya que entran rápidamente a sitios de lesión, se diferencian a fibroblastos/miofibroblastos y secretan un perfil único de citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas aunado a su capacidad de secreción de proteínas de matriz extracelular.⁶⁻⁹

La presencia de los fibrocitos en enfermedades pulmonares ha sido ya documentada en padecimientos como el asma, donde se ha mostrado acumulación de fibrocitos en la mucosa bronquial circundante a áreas subepiteliales de fibrosis.^{10,11} Además, Mehrad *et al*¹² encontraron un incremento en el porcentaje de fibrocitos circulantes en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y neumonía intersticial inespecífica comparados con controles sanos y más recientemente nuestro grupo demostró, por primera vez, la presencia de fibrocitos en tejido pulmonar de pacientes con FPI.¹³

Hasta el momento se sabe muy poco del papel que juegan los fibrocitos en la generación y modulación de los mecanismos de fibrogénesis

en la FPI, por lo cual, para continuar con la caracterización de estas novedosas células es de gran importancia establecer una técnica y condiciones de cultivo óptimas para obtener cultivos de fibrocitos altamente enriquecidos. Bajo esta perspectiva, decidimos evaluar la eficiencia de dos métodos de obtención de fibrocitos a partir de sangre periférica, utilizando como estándar de evaluación los marcadores de fibrocitos descritos previamente en la literatura.³⁻⁵

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de fibrocitos

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica a partir de concentrados leucocitarios obtenidos del Servicio de Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) utilizando un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Amersham Biosciences).

Posteriormente, se utilizaron dos diferentes procedimientos de selección: 1) Separación de células adherentes (monocitos y fibrocitos) por sus propiedades de adhesión: las células mononucleares se cultivaron en cajas Falcon T25 o en cajas de 6 pozos sobre cubreobjetos de vidrio, usando medio de cultivo modificado Dubelcco (DMEM, por sus siglas en inglés) con 20% de suero humano AB (Valley Biomedical, Inc) a 37°C y 5% CO₂ por 24 h. Después se retiraron las células no adherentes y el resto se cultivó por siete días más con cambios de medio cada tres días; 2) Separación de células CD14+: se separaron los subtipos de leucocitos incubando las células mononucleares de sangre periférica con un coctel de anticuerpos y perlas magnéticas es-

pecíficos para selección negativa de células 14+ (EasySep human monocyte [14+] negative selection kit, stem cell technologies). Las células CD14+ obtenidas por selección negativa fueron cultivadas en las mismas condiciones que las anteriores por ocho días con cambios de medio cada tres días.

Inmunotipificación por citometría de flujo

Al octavo día de cultivo las células obtenidas por ambos métodos se recuperan utilizando un medio para disociación celular libre de enzimas (GIBCO), se centrifugaron y resuspendieron en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) con 2% de albúmina a una densidad de 1×10^5 células por tubo. Se incubaron con anticuerpos de superficie para CD3, CD14, CD19, CD45 (BD Biosciences) y CXCR4 (Jackson ImmunoResearch) 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, las células fueron incubadas en una solución comercial para permeabilización siguiendo las recomendaciones del proveedor (Cytotfix/Cytoperm, BD Biosciences) y se procedió a incubar con un anticuerpo de cabra anticolágena I humana (1:200, Santa Cruz Biotechnology) por 30 min a 4°C, después se incubó con el anticuerpo secundario de burro anticabra DyLight 649 (1:200, Jackson ImmunoResearch) por 30 min. Al finalizar la tinción, las células se resuspendieron en paraformaldehído al 2%. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences) utilizando el software Cell Quest 3.2.1f1 (BD Biosciences).

Ensayo de síntesis de colágena

La síntesis de colágena se evaluó por triplicado como ya se ha descrito.¹⁴ En resumen, las células fueron cultivadas en cajas de 6 pozos con medio de cultivo DMEM y 20% de suero humano AB. Después de ocho días de cultivo, el medio fue reemplazado con medio fresco sin suero conteniendo 15 mCi/mL de (3H) prolina (New England Nuclear, Boston, MA), 50 mg/mL de ácido ascórbico y 50 mg/mL de β -aminopropionitrilo. Al finalizar ocho horas de incubación, se obtuvieron los sobrenadantes colocándose en hielo y se dializaron en agua bidestilada con inhibido-

res de proteasas (N-etilmaleimida 25 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.1 mM, EDTA 10 mM, azida de sodio 0.02%). Más tarde, para eliminar los inhibidores de proteasas las muestras se dializaron nuevamente sólo en agua bidestilada, se liofilizaron y se resuspendieron en una solución de Tris-HCl, pH 7.6 (Tris-HCl 50 mM y CaCl_2 10 mM). Las alícuotas se incubaron con o sin 36 mg/mL colagenasa bacteriana pura tipo VII (sigma) por 3 h a 37°C, después se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10%, frío y ácido tánico al 0.5% en presencia de 100 mL de albúmina; se lavaron dos veces en TCA 5%/ácido tánico 0.25% a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes se resuspendieron en 10 mL de fluido para conteo de emisión radiactiva (Aquasol; New England Nuclear); para evaluar la síntesis de colágenas, los precipitados se hidrolizaron en 1 mL HCl 6 N, por 24 h a 70°C y también se resuspendieron en 10 mL de fluido para conteo de emisión radiactiva para la cuantificación de la síntesis de proteínas no colágenas. La emisión radiactiva de las muestras fue evaluada utilizando un contador de centelleo marca Beckman (Beckman LS6000 SE, Palo Alto, CA).

El porcentaje de síntesis de colágena fue calculado de acuerdo con la fórmula: % síntesis de colágena = $(\text{dpm colágena} \times 100) / (\text{dpm proteínas no colágena} \times 5.4) + (\text{dpm colágena})$.¹⁵

Cuantificación de colágena en el medio por método de Sircol

El ensayo colorimétrico de Sircol (Biocolor, UK) se realizó como ya se ha descrito.¹⁶ En resumen, los sobrenadantes recolectados fueron centrifugados a 1,500 rpm por 4 min para retirar la matriz extracelular, posteriormente se mezclaron 100 μL del sobrenadante con 1 mL de colorante de Sircol y se incubaron por 30 min; las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 5 min para obtener el complejo colágena-colorante formado. Después de decantar el sobrenadante, los botones se disolvieron en 1 mL de reactivo alcalino de Sircol y se colocaron en un agitador. Al finalizar, se leyeron 100 μL de la solución en un espectrofotómetro a 540 nm. Todos los ensayos fueron hechos por triplicado. Los resultados se expresaron en microgramos de colágena por mL por 24 h.

Inmunocitoquímica para colágena I

Las células que fueron cultivadas sobre cubreobjetos se lavaron con PBS frío y se permeabilizaron y fijaron utilizando metanol al 100% por 2 min a -20°C , se retiró el metanol y se agregó acetona al 100% por 3 min a -20°C , se retiró la acetona y se lavó con TBS-T 0.1% (Tris base 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.1%). Los fibrocitos fijados en cubreobjetos se incubaron durante 10 min en una solución de H_2O_2 al 3% para bloquear peroxidases endógenas, se lavaron dos veces con TBS-T y se incubó con el anticuerpo primario de cabra anticolágena tipo I (dilución 1:100) (Santa Cruz, Biotechnology); más tarde, se llevaron a cabo dos lavados con TBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado utilizando un kit de detección universal siguiendo las recomendaciones del fabricante (Dako Denmark) durante 20 min seguido de dos lavados con TBS-T. Finalmente se incubó durante 20 min con streptavidina-HRP (Dako Denmark) y se reveló con amino etil carbazol (AEC [BioGenex, San Ramon, CA]).

RESULTADOS

Utilizando un gradiente de densidad se separaron células mononucleares de sangre periférica a partir de concentrados leucocitarios obtenidos del Servicio de Banco de Sangre del INER, 30×10^6 células fueron cultivadas en cajas Falcon T25 (10×10^6 células por caja) durante 24 h, tiempo en el cual se retiraron las células no adherentes y se

agregó medio fresco, las células se cultivaron siete días más. A partir del mismo concentrado leucocitario se utilizaron 1×10^8 células mononucleares para purificar monocitos CD14+ utilizando un coctel de anticuerpos y perlas magnéticas. Las células obtenidas $\sim 10\text{-}15 \times 10^6$ células de las cuales $\sim 78\text{-}85\%$ eran CD14+ por citometría de flujo (datos no mostrados) se sembraron en cajas T25 a una densidad de $3\text{-}5 \times 10^6$ células por caja, después de 24 h de cultivo se retiraron las células no adherentes y se agregó medio fresco continuando el cultivo siete días más. A los siete días de cultivo se observó en los cultivos de concentrado leucocitario que aproximadamente el 80-90% de las células tenían una morfología en forma de huso parecida a fibroblastos, mientras que en los cultivos de células CD14+ más del 90% habían adquirido esta morfología.

Para caracterizar a las poblaciones existentes en los cultivos se hicieron tinciones con anticuerpos fluorescentes con las combinaciones de anticuerpos que reconocen moléculas descritas para identificar a los fibrocitos. También se incluyeron anticuerpos específicos para las principales poblaciones celulares contaminantes de los cultivos de células mononucleares (linfocitos B y T). La caracterización fenotípica se evaluó por el método de citometría de flujo (Tabla I), encontrando que el porcentaje de fibrocitos en los cultivos provenientes de células CD14+ era mayor que el obtenido de cultivos de células mononucleares de concentrado leucocitario; asimismo, encontramos que las células contaminantes en los cultivos de concentrado leucocitario eran en su mayoría linfocitos B.

Tabla I. Análisis del inmunofenotipo de fibrocitos obtenidos de concentrados leucocitarios y diferenciados a partir de células CD14+ analizado por citometría de flujo.

| Marcadores | Cultivo CD14+ 8 días | Cultivo CL 8 días |
|--------------------------|----------------------|-------------------|
| CD3+ (linfocitos T) | 1.2% | 1.3% |
| CD19+ (linfocitos B) | 1.6% | 24.4% |
| CD45+ | 95.9% | 96.3% |
| CD14+ | 10.6% | 7.2% |
| Colágena I+ | 97.2% | 74.3% |
| Colágena I+/CD45+ | 94.1% | 73.0% |
| Colágena I+/CXCR4+ | 96.9% | 74.3% |
| Colágena I+/CXCR4+/CD45+ | 94.1% | 73% |

Resultados representativos de 3-5 experimentos.
CL: Concentrado leucocitario

Debido a que diversas moléculas expresadas por los fibrocitos también pueden expresarse en ciertas subpoblaciones de macrófagos, se realizó la caracterización funcional evaluando la capacidad de los fibrocitos para sintetizar colágena. El ensayo de biosíntesis de colágena mostró que los fibroblastos *in vitro* sintetizan casi dos veces más colágena (56.45%) que ambos cultivos de fibrocitos. Los fibrocitos diferenciados a partir de células CD14+ sintetizan colágena en mayor porcentaje (30.2%) respecto de los obtenidos a partir del método de adherencia (23.8%) (Figura 1A). Por otro lado, se determinó la concentración de colágena producida por los fibrocitos cultivados a partir de diferentes métodos de purificación; los ensayos de cuantificación de colágena en el sobrenadante de los cultivos muestran un patrón similar al observado con la síntesis de colágena, donde se observa que los

fibrocitos diferenciados a partir de células CD14+ muestran una mayor producción de colágena con respecto al método de separación por adherencia (Figura 1B), estos datos muestran una buena correlación con los resultados de biosíntesis de colágena.

Por último, para demostrar la síntesis de colágena en nuestros cultivos se realizó inmunocitoquímica para colágena I, utilizando fibroblastos de pulmón como control positivo (Figura 2A) observamos que la mayoría de las células en ambos cultivos eran positivas para la tinción con colágena I, pero la tinción fue más intensa en los cultivos de fibrocitos obtenidos de células CD14+ (Figura 2B) que en los obtenidos de concentrado leucocitario (Figura 2C).

DISCUSIÓN

Los fibrocitos circulantes son una novedosa población de células hematopoyéticas capaces de diferenciarse a fibroblastos y miofibroblastos y participar en procesos de reparación tisular y fibrosis. Por lo que, la obtención de cultivos de fibrocitos con un porcentaje de pureza alto es un paso clave en el proceso de caracterización y análisis *in vitro* de estas células.

La técnica descrita por otros autores⁷⁻⁹ implica el uso de cuando menos tres columnas magnéticas para eliminación por separación positiva de células CD3+ (linfocitos T), CD19+ (linfocitos B) y CD14+ en el día 8-10 de cultivo de las células mononucleares obtenidas de los concentrados leucocitarios, esto incrementa tres a cuatro veces los costos y disminuye la recuperación celular.

En el presente trabajo describimos una técnica de obtención de fibrocitos para estudios *in vitro* en la cual, desde un inicio, se lleva a cabo una separación negativa de células CD14+ provenientes de concentrados leucocitarios, utilizando anticuerpos acoplados a perlas magnéticas, enriqueciendo así la población que da origen a los fibrocitos. De esta manera, también se elimina el uso de dos columnas magnéticas asegurando un mayor rendimiento en la recuperación celular y un menor costo. Cabe mencionar que el porcentaje de células contaminantes remanentes puede ser también mayor (~2-8%), comparado con la técnica ya descrita en la literatura (~2-3%),¹⁷

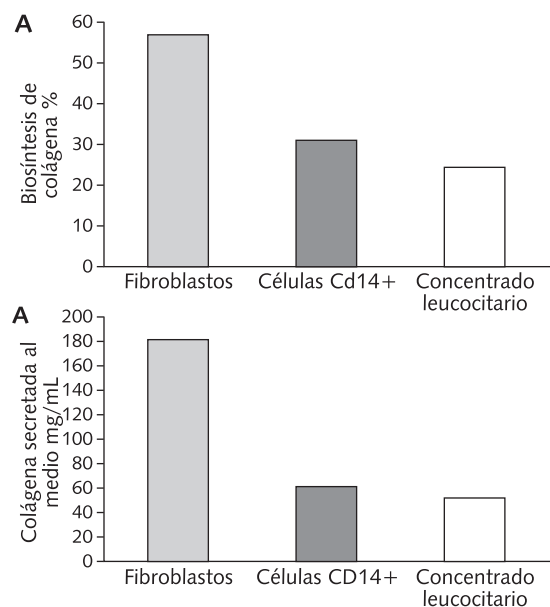


Figura 1. Síntesis y secreción de colágena en cultivos de fibrocitos obtenidos a partir de concentrado leucocitario humano. **A)** los fibrocitos diferenciados a partir de una población purificada de CD14+ sintetizan mayor porcentaje de colágena que los fibrocitos obtenidos por método de adherencia; **B)** los resultados de la cuantificación de colágena en el medio correlacionan con los resultados de síntesis de colágena.

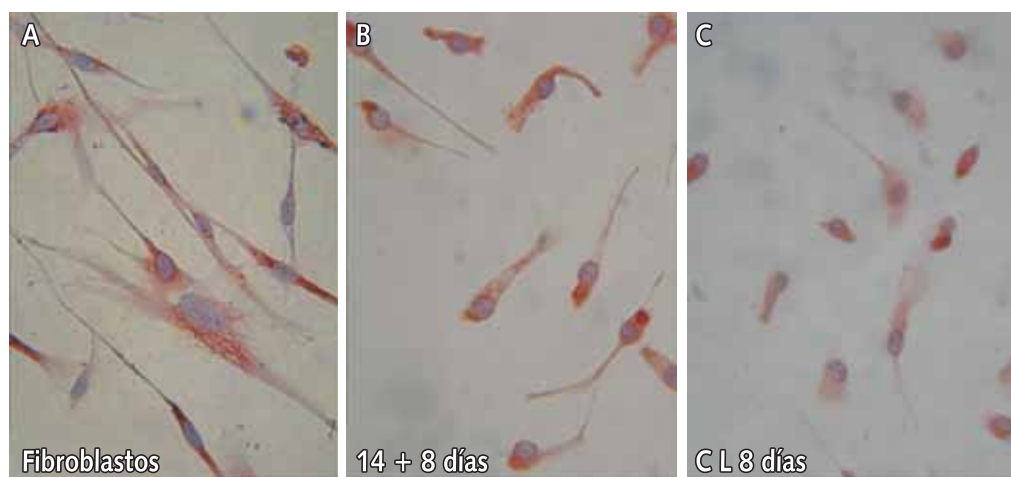


Figura 2. Inmunocitoquímica para colágena tipo I en cultivos de fibrocitos obtenidos a partir de concentrado leucocitario humano. Se utilizaron fibroblastos de pulmones normales como controles positivos (A). En las imágenes se puede observar que los fibrocitos obtenidos por ambas técnicas son positivos para colágena I, aunque la tinción para fibrocitos diferenciados a partir de células CD14+ (B) es más intensa que la observada en fibrocitos obtenidos por adherencia (C). También pueden observarse diferencias en la morfología (mayor número de células en forma de huso) que pueden indicar un mayor estado de diferenciación en fibrocitos obtenidos de CD14+ comparado con los obtenidos por adherencia.

lo cual debe tomarse en cuenta tanto en el diseño como en el análisis de experimentos con esta población de células.

Finalmente, tomando en cuenta nuestra experiencia, consideramos que la técnica descrita por nuestro grupo tiene mayores ventajas que desventajas, incluyendo la disminución importante en los costos y que se podría extender su uso en el análisis de fibrocitos de pacientes no sólo con enfermedades fibrosantes del pulmón, sino también otras patologías inflamatorias e infecciosas del sistema respiratorio.¹⁰⁻¹²

REFERENCIAS

1. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair.* Mol Med 1994;1:71-81.
2. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. *Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites.* J Immunol 2001; 166:7556-7562.
3. Aiba S, Tagami H. *Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids.* J Cutan Pathol 1997;24:65-69.
4. Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R. *Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood.* Int J Biochem Cell Biol 2004;36:598-606.
5. Strieter RM, Gomperts BN, Keane MP. *The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis.* J Clin Invest 2007;117:549-556.
6. Postlethwaite AE, Shigemitsu H, Kanangat S. *Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis.* Curr Opin Rheumatol 2004;16:733-738.
7. Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. *Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes.* J Immunol 1998;160:419-425.
8. Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, et al. *Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo.* FASEB J 2001; 15:2215-2224.
9. Hong KM, Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. *Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.* J Biol Chem 2007;282:22910-22920.
10. Nihlberg K, Larsen K, Hultgårdh-Nilsson A, Malmström A, Bjermer L, Westergren-Thorsson G. *Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane?* Respir Res 2006;7:50.
11. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. *Identification of circulating fibrocytes as precursors of*

- bronchial myofibroblasts in asthma*. J Immunol 2003;171:380-389.
12. Mehrad B, Burdick MD, Zisman DA, Keane MP, Belperio JA, Strieter RM. *Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease*. Biochem Biophys Res Commun 2007;353:104-108.
13. Andersson-Sjöland A, de Alba CG, Nihlberg K, et al. *Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol 2008;40:2129-2140.
14. Becerril C, Pardo A, Montaña M, Ramos C, Ramírez R, Selman M. *Acidic fibroblast growth factor induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts*. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:1020-1027.
15. Peterkofsky B, Diegelmann R. *Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins*. Biochemistry 1971;10:988-994.
16. Yurovsky VV. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand enhances collagen production by human lung fibroblasts*. Am J Respir Cell Mol Biol 2003;28:225-231.
17. Wang JF, Jiao H, Stewart TL, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE. *Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts*. Wound Rep Reg 2007;15:113-121.

✉ **Correspondencia**

Dra. Carolina García de Alba.
Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias Ismael Cosío Villegas.
Calzada de Tlalpan 4502, colonia
Sección XVI. México, D.F., 14080
Correo electrónico:
caro_gdealbar@yahoo.com