



CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL PERFIL DE SEGURIDAD E INDUCCIÓN DE MALIGNIDAD DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES AISLADAS DE LA GELATINA DE WHARTON DEL CORDÓN UMBILICAL HUMANO: ESTUDIO PILOTO

Autores

Laura Marcela Sierra, Richar Duván Torres,
Yessica Alejandra Triana y Heydy Dayana Vera

Asesoras

Jeannette Navarrete M.SC.
Luz Mabel Ávila Ph.D.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de ciencias de la salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá D.C. Junio 2019



CONTENIDO

1. Marco teórico
2. Objetivos
3. Metodología
4. Resultados
5. Discusión
6. Conclusiones
7. Recomendaciones
8. Agradecimientos

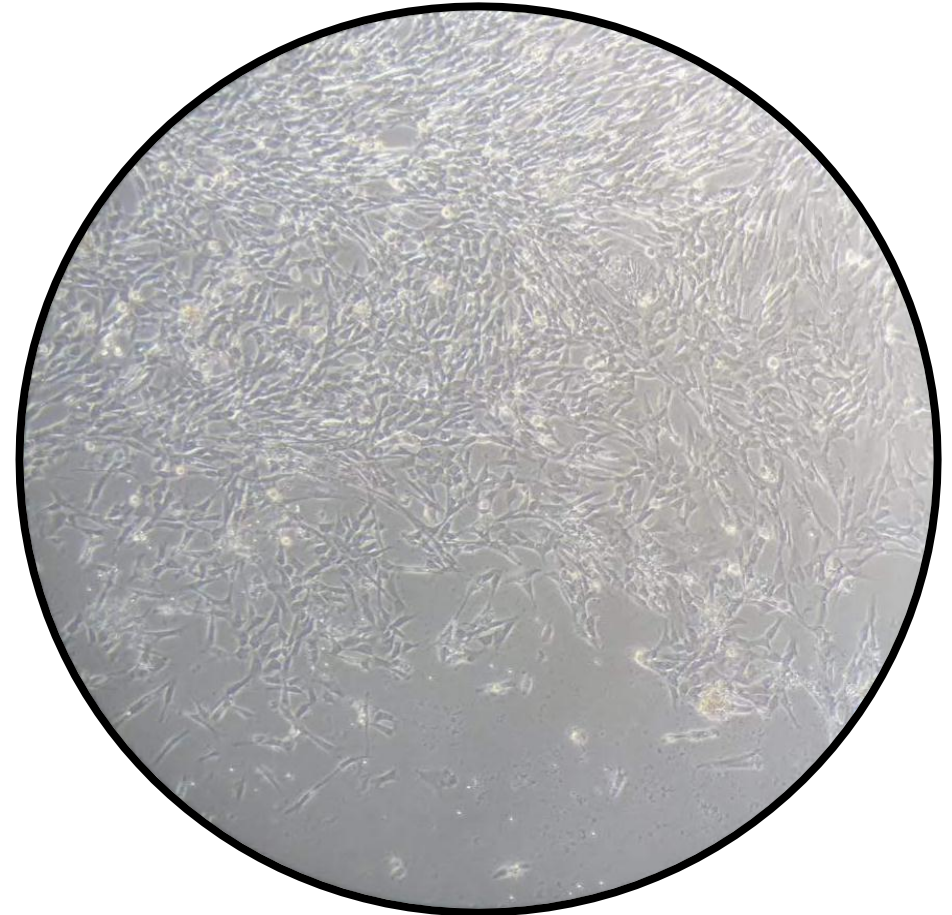


Imagen de autor

1. MARCO TEÓRICO

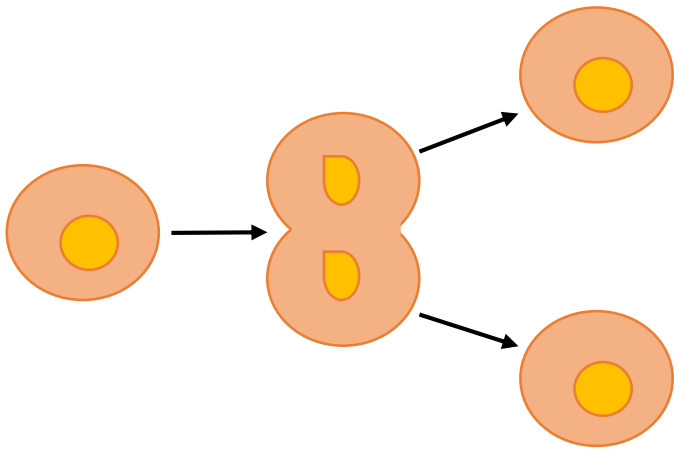


CÉLULAS MADRE

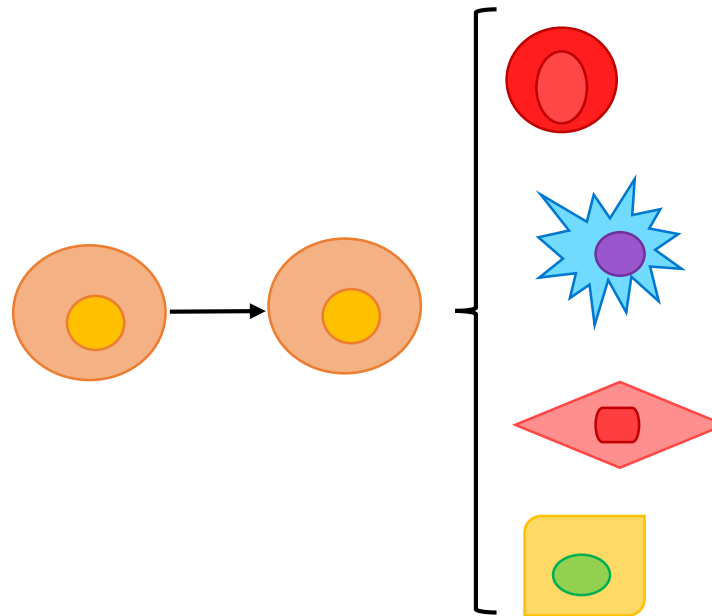
Células indiferenciadas que tienen el potencial de dar lugar a diferentes tipos de células en el organismo durante la vida temprana y el crecimiento posnatal.

CARACTERÍSTICAS

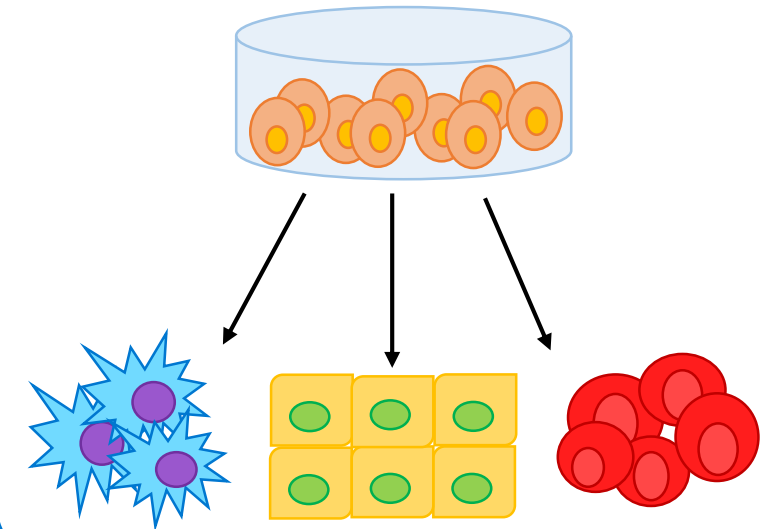
1. Autorenovación



2. Plasticidad



3. Regeneración tisular



CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (MSC)

1. GENERALIDADES

- Células madres adultas multipotentes
- **Origen embrionario:** Mesodermo
- **Morfología:** Células adherentes de morfología fibroblastoide
- **Características biológicas:** Autorenovación, plasticidad, propiedades inmunomoduladoras (modulan la proliferación y diferenciación de células T) y regeneración tisular.

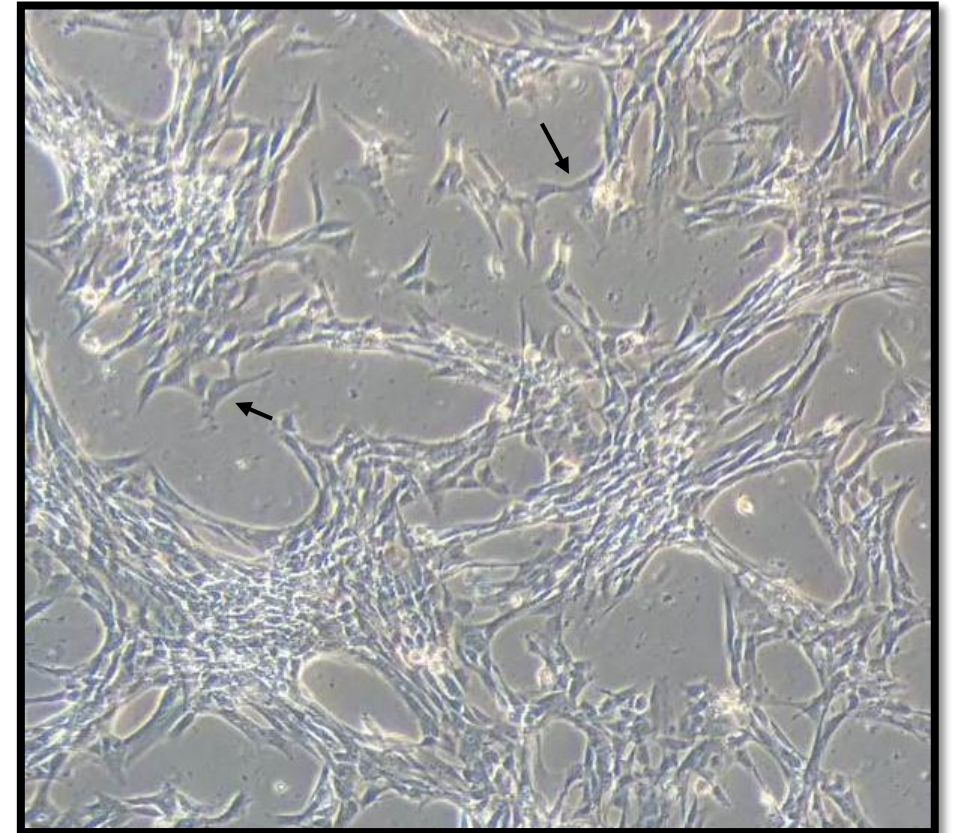


Imagen de autor

CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES MSC

2. IDENTIDAD DE LAS MSC

La identidad de las MSC de cualquier fuente de tejido se verifica mediante el cumplimiento de los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular.

1

Capacidad de crecer y adherirse a la superficie del recipiente de cultivo

2

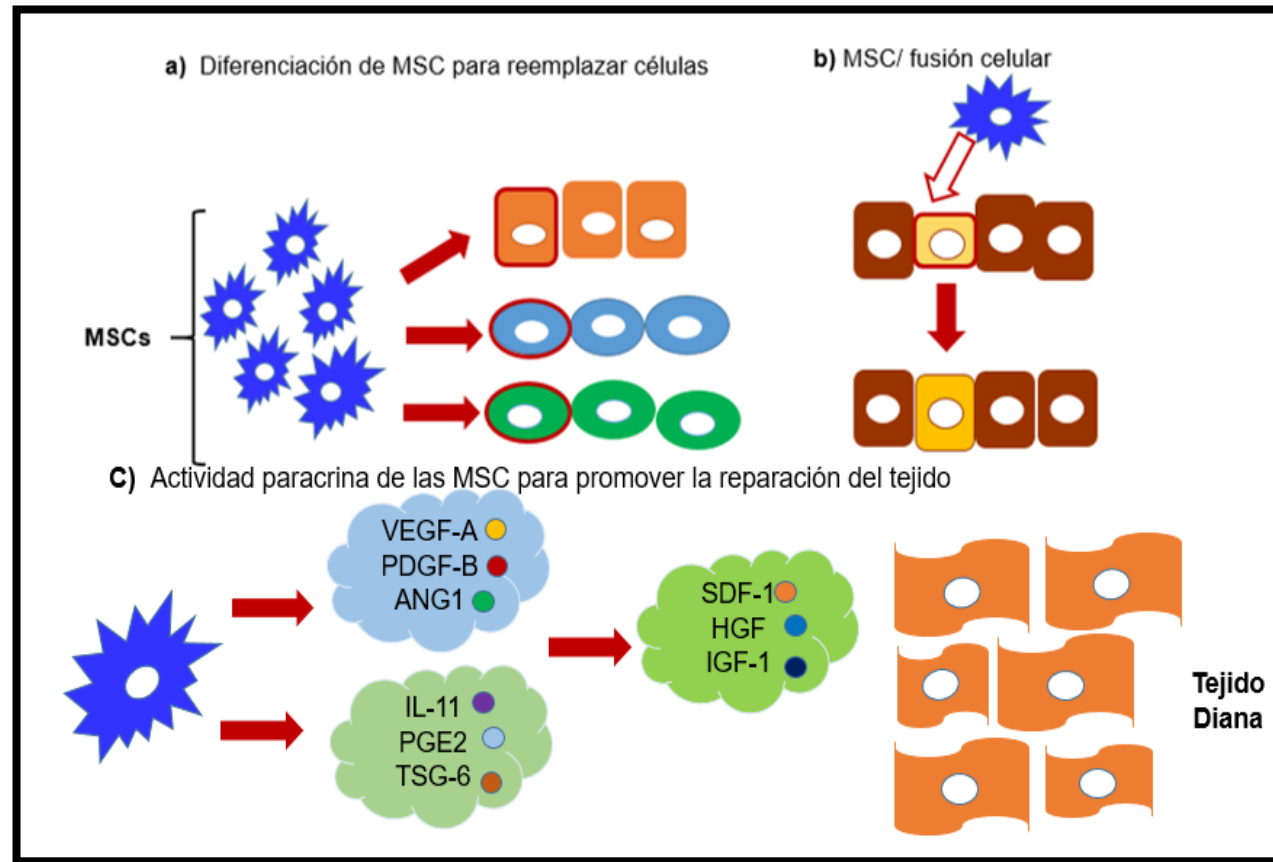
Característica fenotípica
Positivo: CD105, CD90 y CD73.
Negativo: CD45, CD34 y HLA-DR

3

Potencial de diferenciación *in vitro* a adipocitos, condrocitos y osteocitos

CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES MSC

3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS MSC



A) Diferenciación a distintos linajes celulares para el reemplazo celular. **B)** Rescate de células dañadas mediante fusión celular. **C)** Secreción de factores paracrinos como factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. Figura modificada de Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. Stem Cell Research & Therapy.

CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES MSC

5. CORDÓN UMBILICAL HUMANO. FUENTE DE MSC

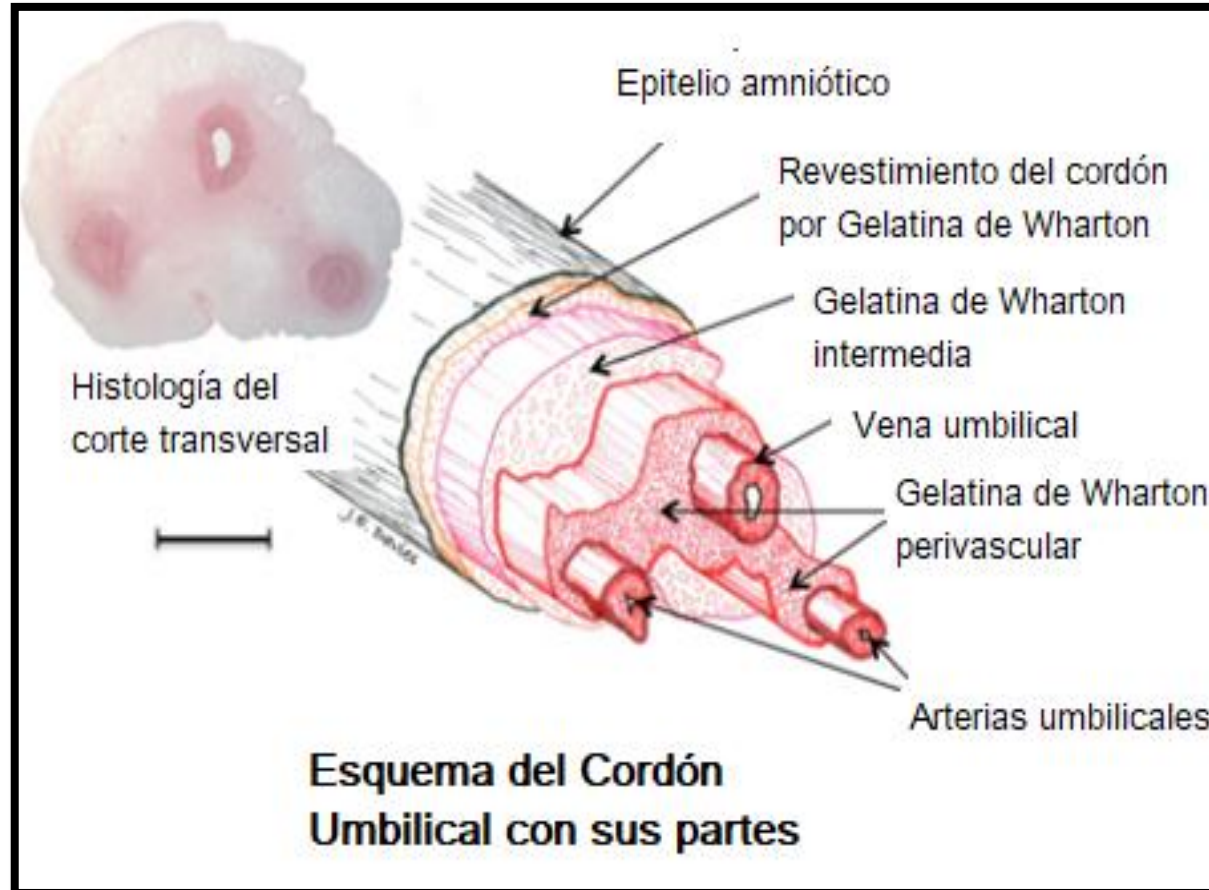


Figura modificada de: *The structure of the human umbilical cord with a three dimensional by Stem cells.*

CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES MSC

5. APLICACIONES DE MSC

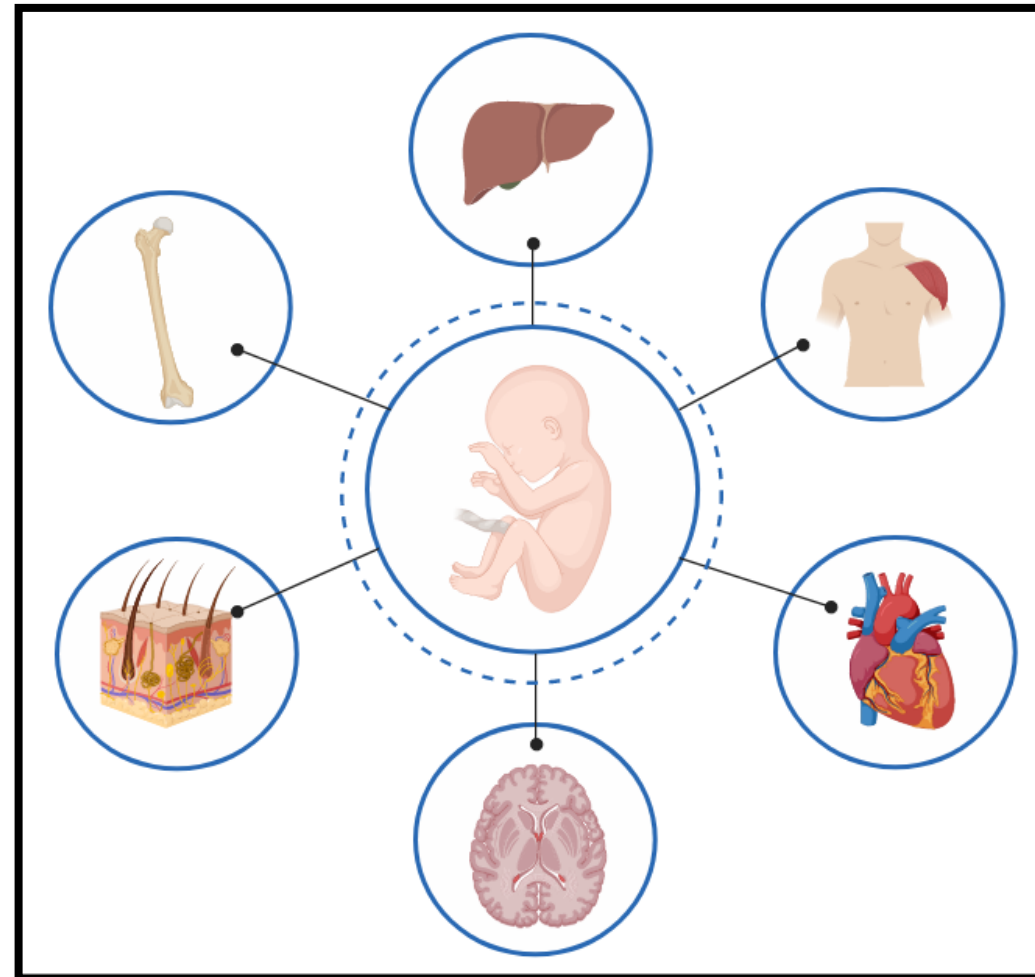


Imagen de autor

A clear plastic petri dish containing a bacterial culture on a blue agar surface. The culture consists of numerous small, white, circular colonies scattered across the surface. A yellow strip is visible at the top edge of the dish. The dish is placed on a blue paper towel. In the background, a blue metal frame with circular holes is partially visible.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

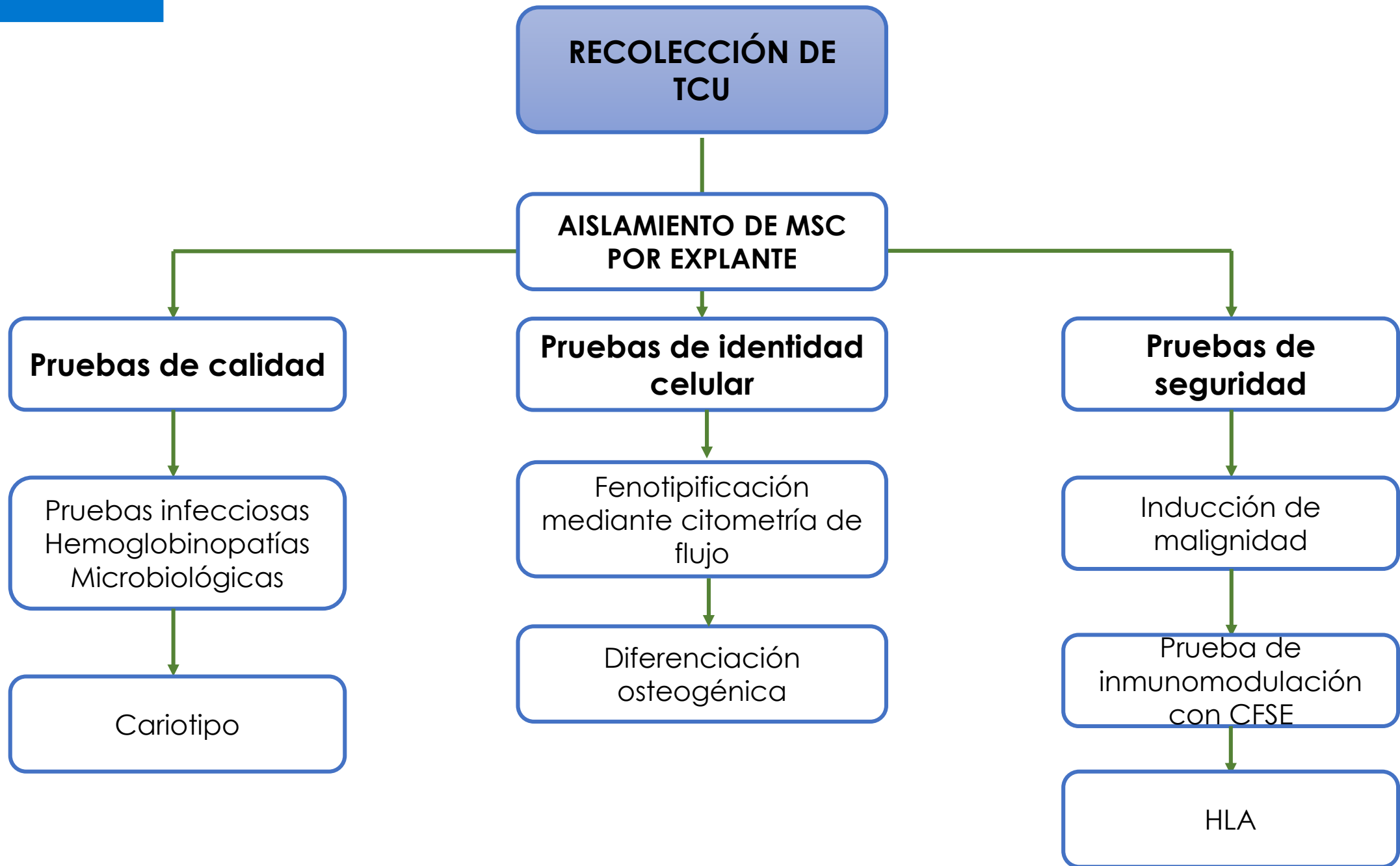
Caracterizar y evaluar el perfil de seguridad e inducción de malignidad de Células Estromales Mesenquimales aisladas de la Gelatina de Wharton de cordón umbilical humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

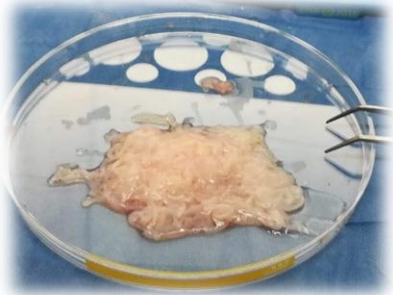
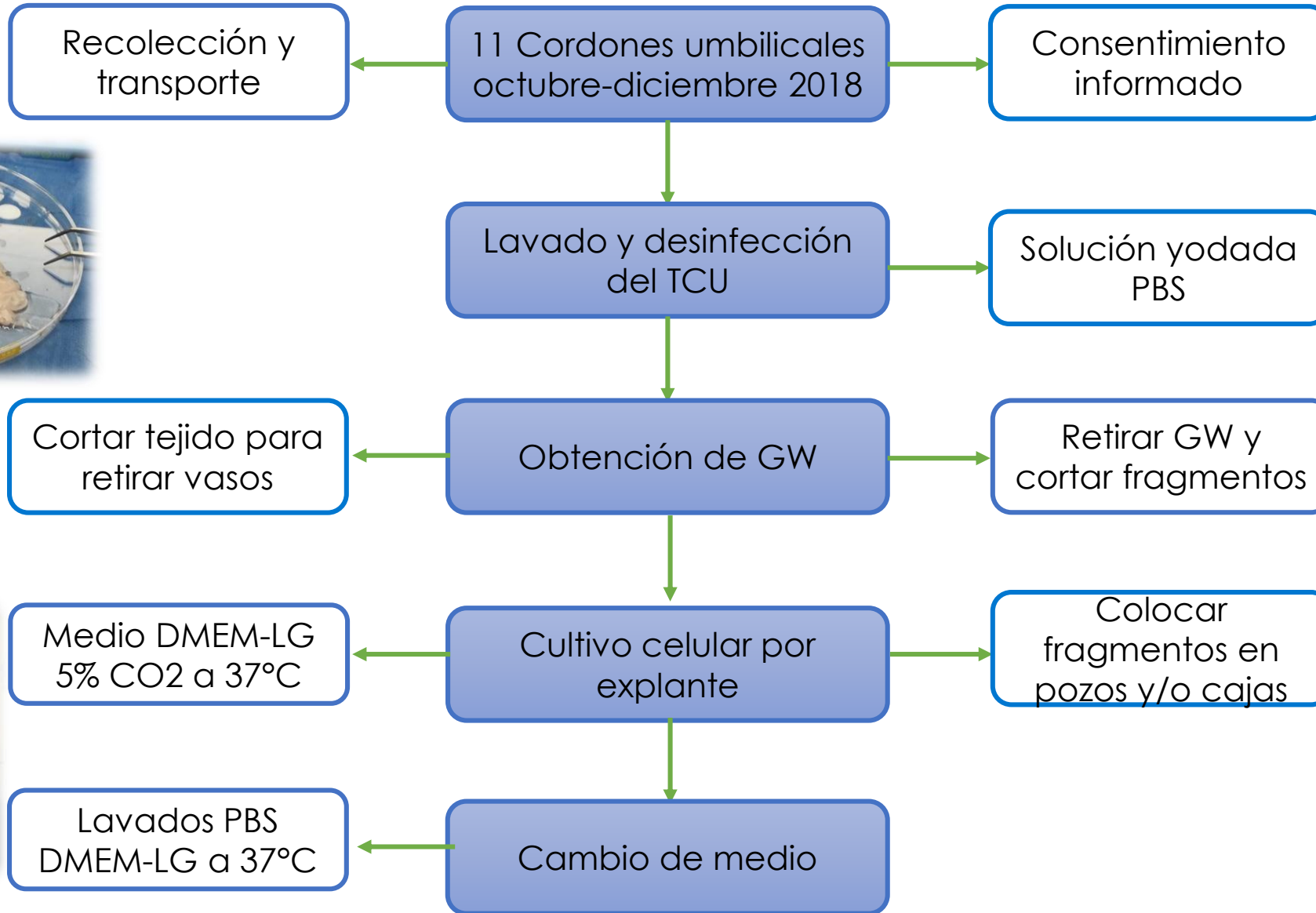
- Aislar e identificar las Células Estromales Mesenquimales de la Gelatina de Wharton de Cordón Umbilical humano.
- Identificar la capacidad inmunomoduladora de las MSC y las anomalías de los cromosomas tanto estructurales como numéricas posterior a la expansión.
- Identificar inducción de malignidad in vivo de las MSC.
- Evaluar los procedimientos que apliquen Buenas Prácticas de Manufactura en la obtención de mínimo un lote de células mesenquimales con un perfil de seguridad óptimo para futuras investigaciones de carácter básico y/o clínico.

3. METODOLOGÍA

A laboratory setting with a person wearing blue gloves holding a multi-well plate. The background shows various lab equipment like a rack, pipette tips, and petri dishes.



RECOLECCIÓN DEL TCU Y AISLAMIENTO DE LAS MSC



PRUEBAS DE IDENTIDAD CELULAR

FENOTIPIFICACIÓN

- Citómetro de flujo BD FACS Canto II
- Kit de Análisis de MSC Humanas (BD Stemflow™)
- Anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos: CD90 FITC, CD105 APC(Endoglina), CD73 PE-A.

DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

TINCIÓN DE VON
KOSSA



Nitrato de plata al 5% y luz UV
durante 3 horas

FOSFATASA
ALCALINA



- Kit 86R de Sigma Aldrich
- Contratinción solución de hematoxilina de Gill N°3

PRUEBAS DE SEGURIDAD

INMUNOMODULACIÓN
CON CFSE

- Gradientes de densidad Ficoll Hypaque
- Marcaje con ester de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE)

INDUCCIÓN DE
MALIGNIDAD



Imagen de autor

Marcaje de los ratones Balb/c (Lotes, CP y CN)

Inoculación intraperitoneal



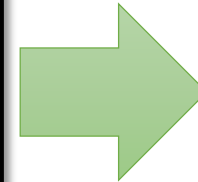
Lotes: 0,5 ml MSC 1×10^6 en SS con 5% de Albúmina Humana
Control negativo: SS con 5% de Albúmina Humana
Control positivo: 0,5 ml de células HELA 1×10^6

A microscopic view of a cell culture, showing numerous cells with prominent nuclei and cytoplasm, arranged in a dense, interconnected network. The cells are stained, likely with hematoxylin and eosin (H&E), giving them a pinkish-purple hue. The background is a light, slightly textured grey.

4. RESULTADOS

AISLAMIENTO Y PRUEBAS DE CALIDAD

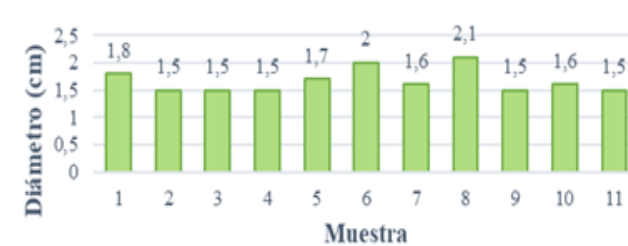
RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS



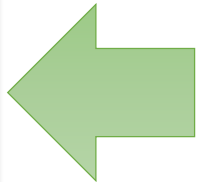
A Longitud del cordón umbilical



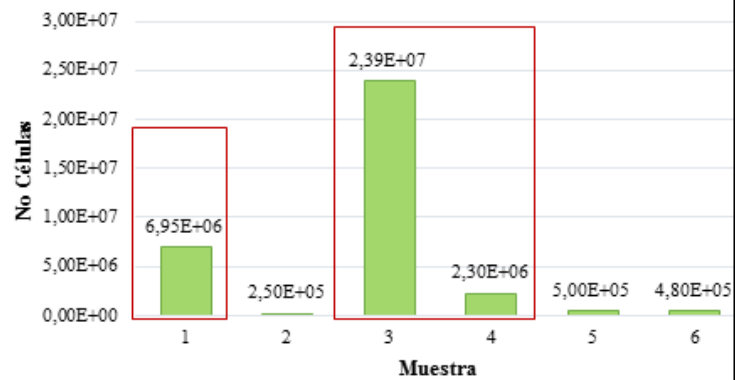
B Diámetro del cordón umbilical



C Peso de la Gelatina de Wharton



Recuento de células adherentes posterior a 15 días de cultivo



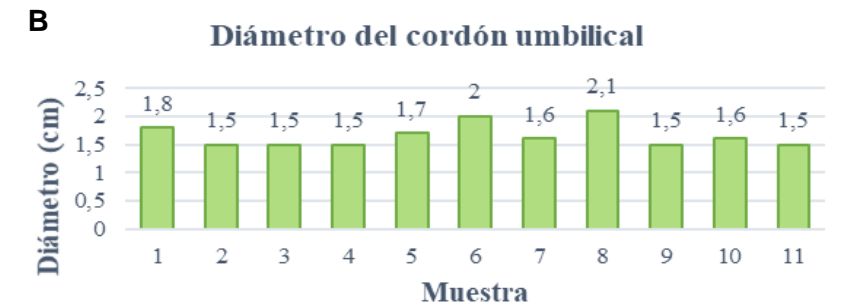
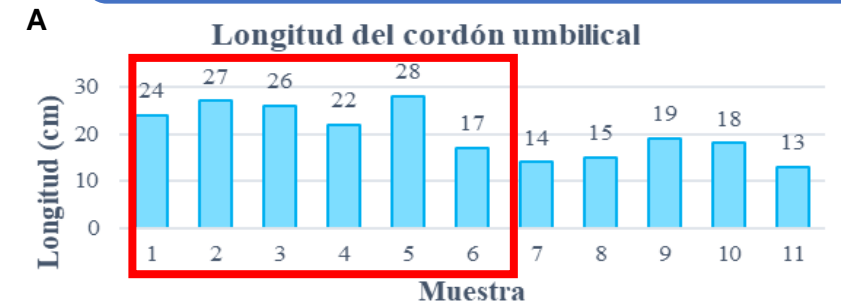
CELULARIDAD A LOS 15 DÍAS DE CULTIVO

AISLAMIENTO Y PRUEBAS DE CALIDAD

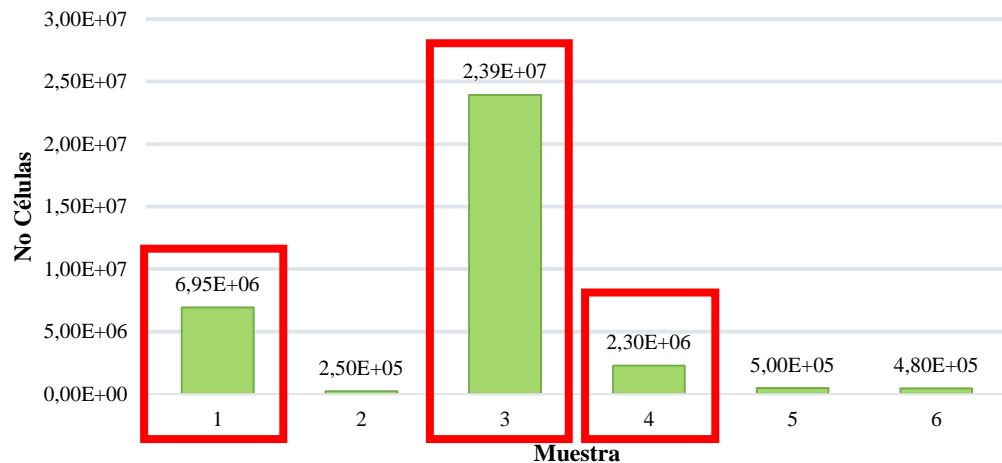
RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS



CARACTERÍSTICAS DEL CORDÓN



Recuento de células adherentes posterior a 15 días de cultivo

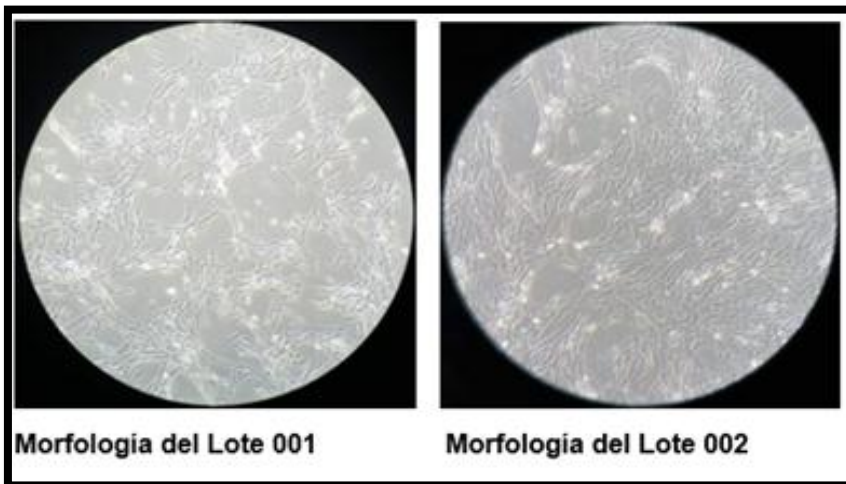


CELULARIDAD A LOS 15 DÍAS DE CULTIVO

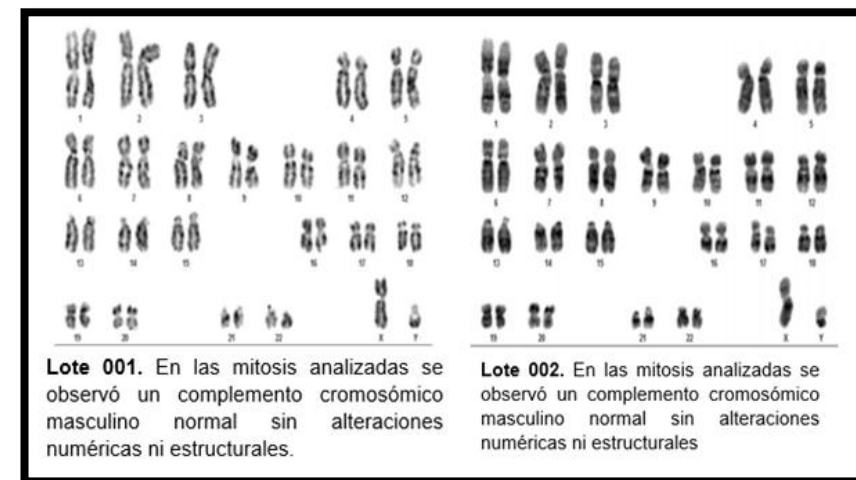
CARCATERÍSTICAS DE LOS TRES LOTES SELECCIONADOS A LOS 25 DÍAS DE CULTIVO

Lote	Peso en gramos de GW	Recuento de células adherentes posterior a 18 días de cultivo	Celularidad a los 25 días de cultivo	Viabilidad	Factor de expansión	Tiempo en horas para dividirse
001	13,77	6.950.000	>50.000.000	96,03%	14,5	11,58
002	7,76	23.925.000	>50.000.000	97,52%	5,96	28,1
003	11,11	2.300.000	18.600.000	95,16%	8,08	21

MORFOLOGÍA DE LOS LOTES 001/002

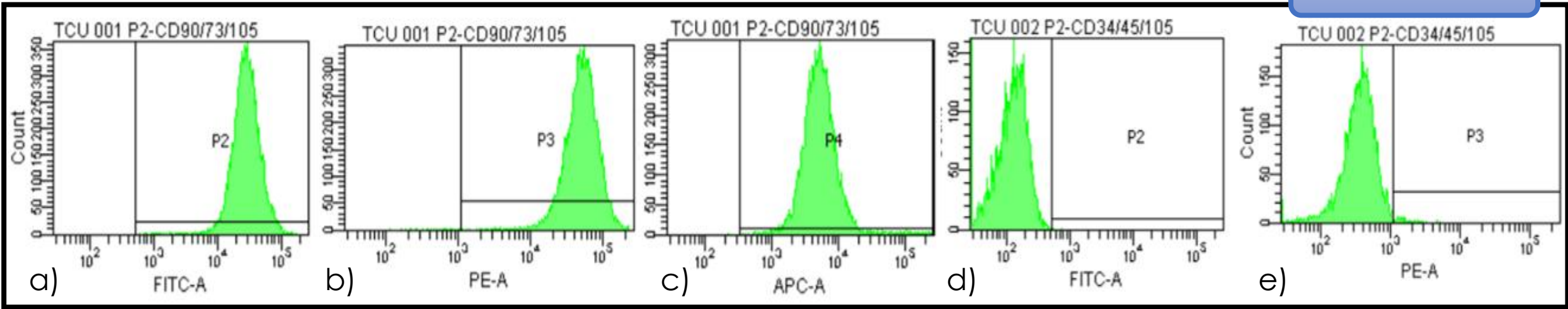


CARIOTIPO DE LOS LOTES 001 /002

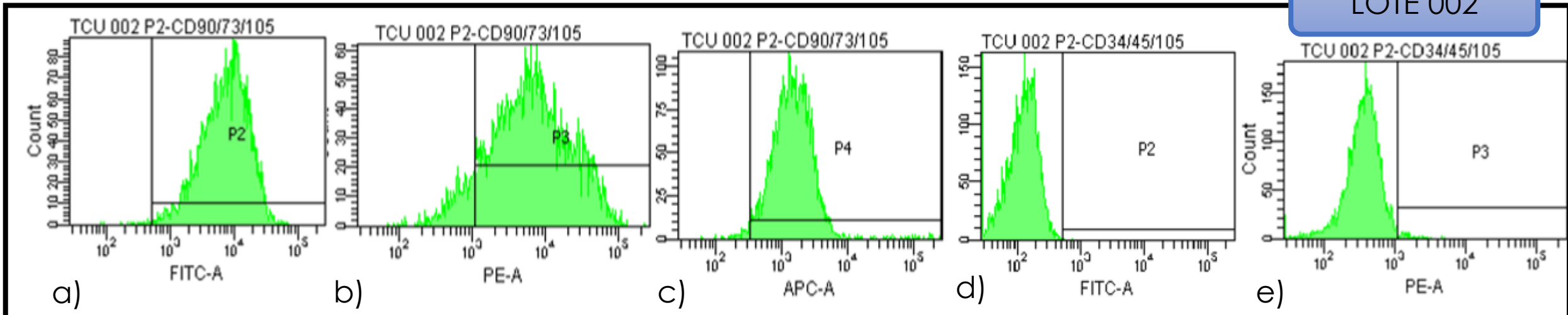


PRUEBAS DE IDENTIDAD

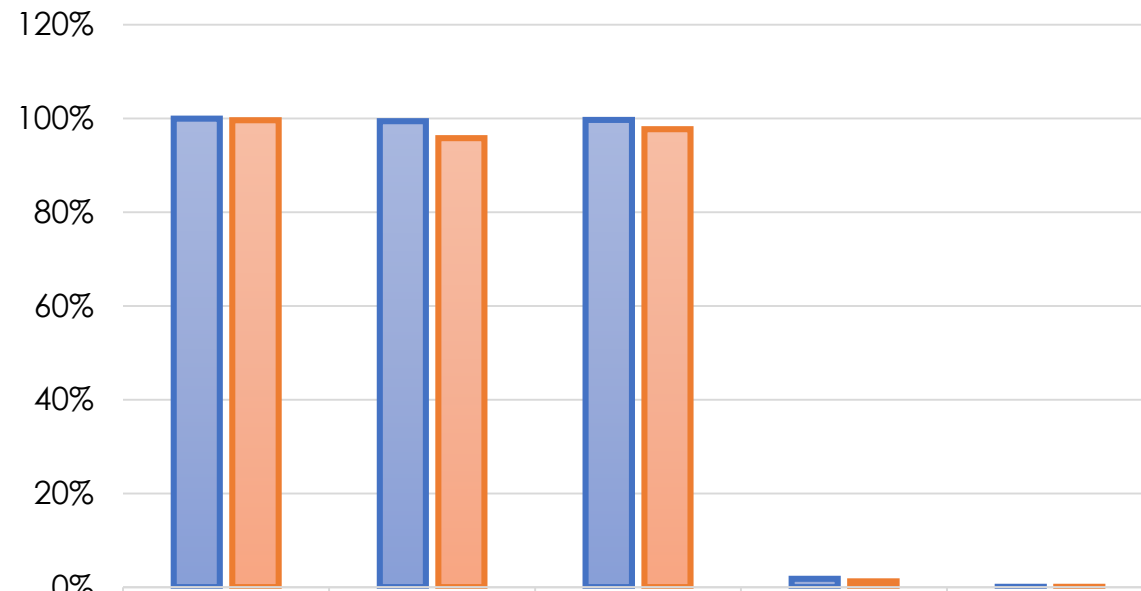
LOTE 001



LOTE 002



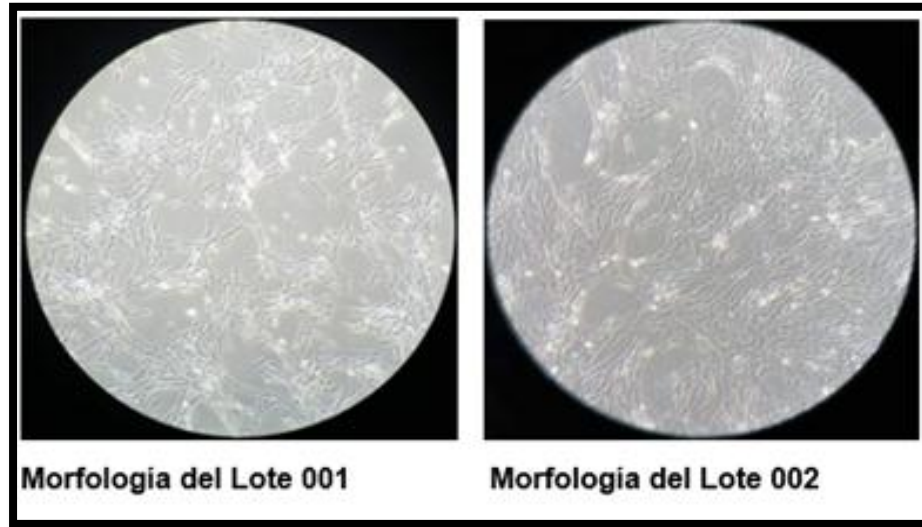
PORCENTAJE DE CADA UNO DE LOS MARCADORES PARA LA CARACTERIZACION INMUNOFENOTIPICA DE MSC



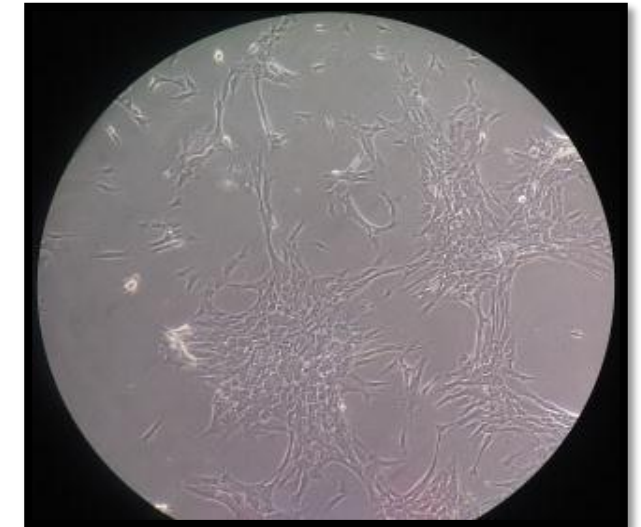
	CD90	CD73	CD105	CD45	CD34
■ Porcentaje Lote 001	100%	99,40%	99,70%	1,80%	0,10%
■ Porcentaje Lote 002	99,60%	95,80%	97,70%	1,20%	0,10%

■ Porcentaje Lote 001 ■ Porcentaje Lote 002

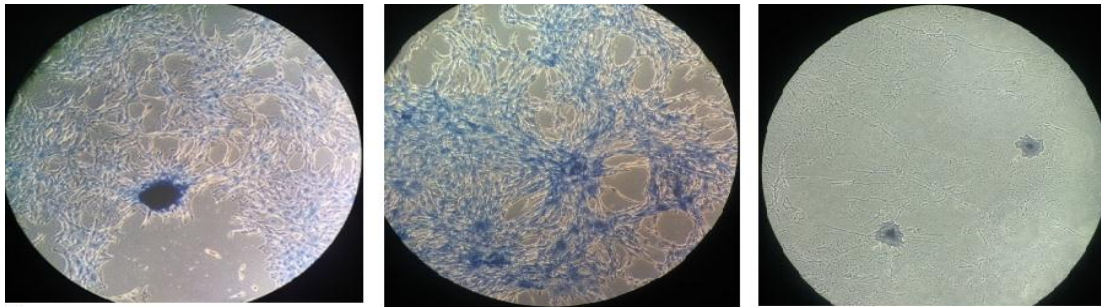
DIFERENCIACIÓN
OSTEOGÉNICA



3 sems



ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA



a

LOTE 001

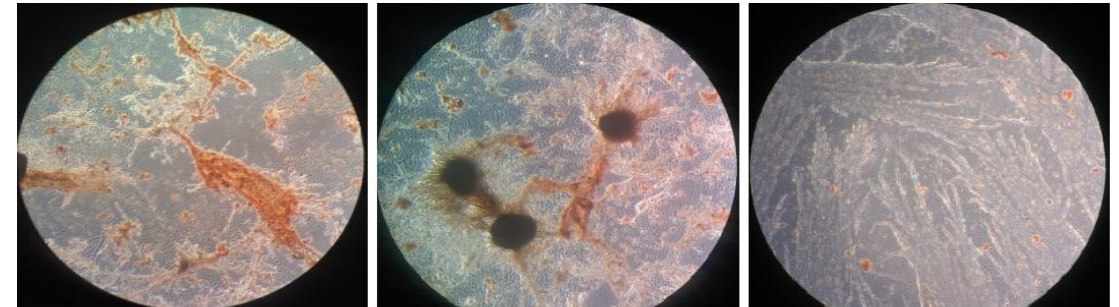
b

LOTE 002

c

CONTROL (-)

TINCIÓN DE VON KOSSA



a

LOTE 001

b

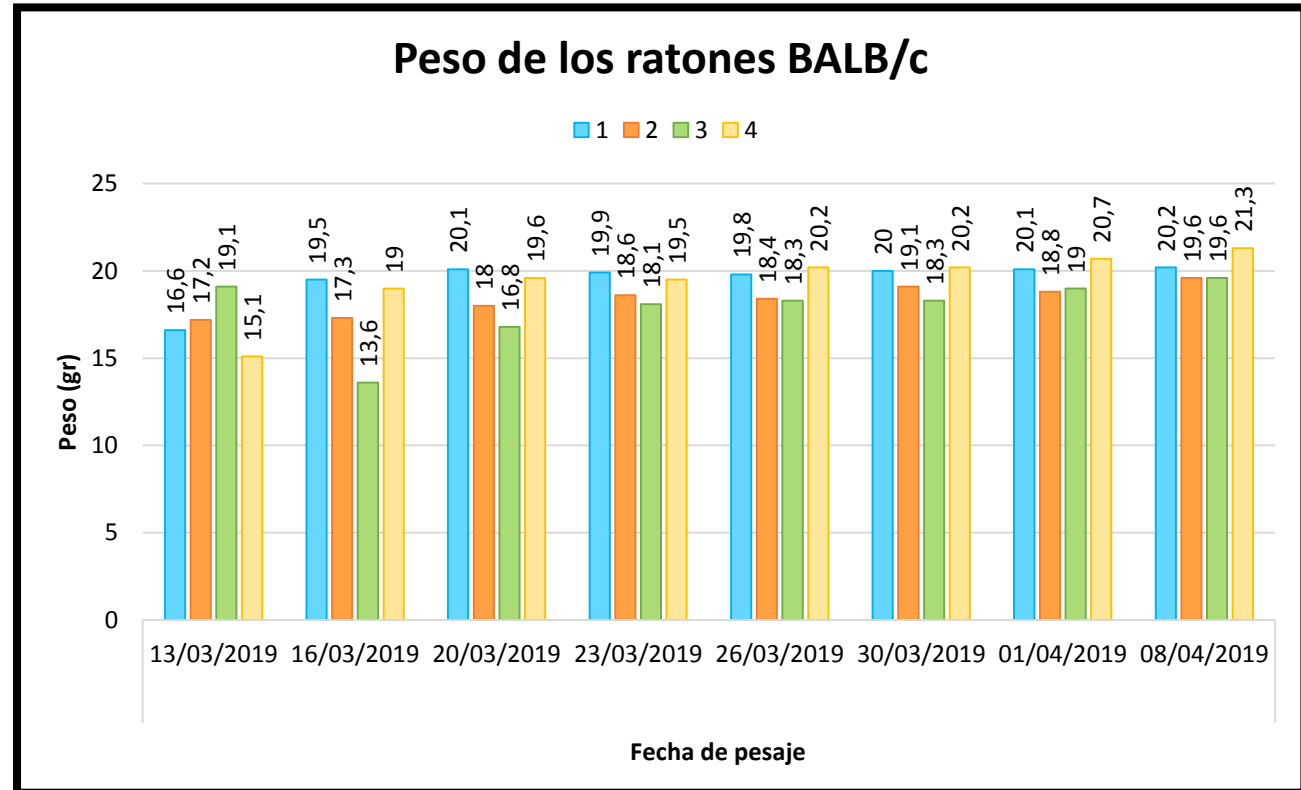
LOTE 002

c

CONTROL (-)

PRUEBAS DE SEGURIDAD

INDUCCIÓN DE MALIGNIDAD



Individuo inoculado con (1) Lote 001, (2) Lote 002, (3) Células HeLa, (4) Sln. salina



Se observa que el Hígado del Control positivo presenta un patrón puntiforme por toda la superficie del órgano lo cual, unido al abultamiento dorsal de este individuo, permite inferir que hubo inducción de malignidad. Al estar ausente estos fenómenos en el resto de individuos, el dictamen es más alentador.

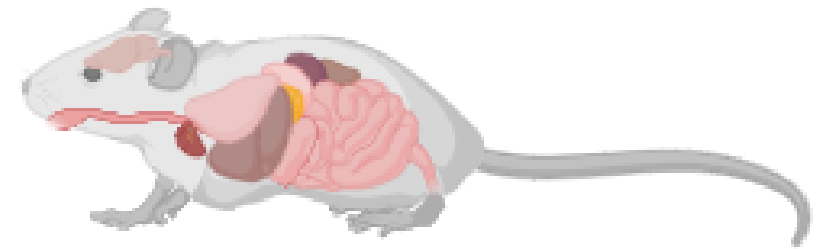
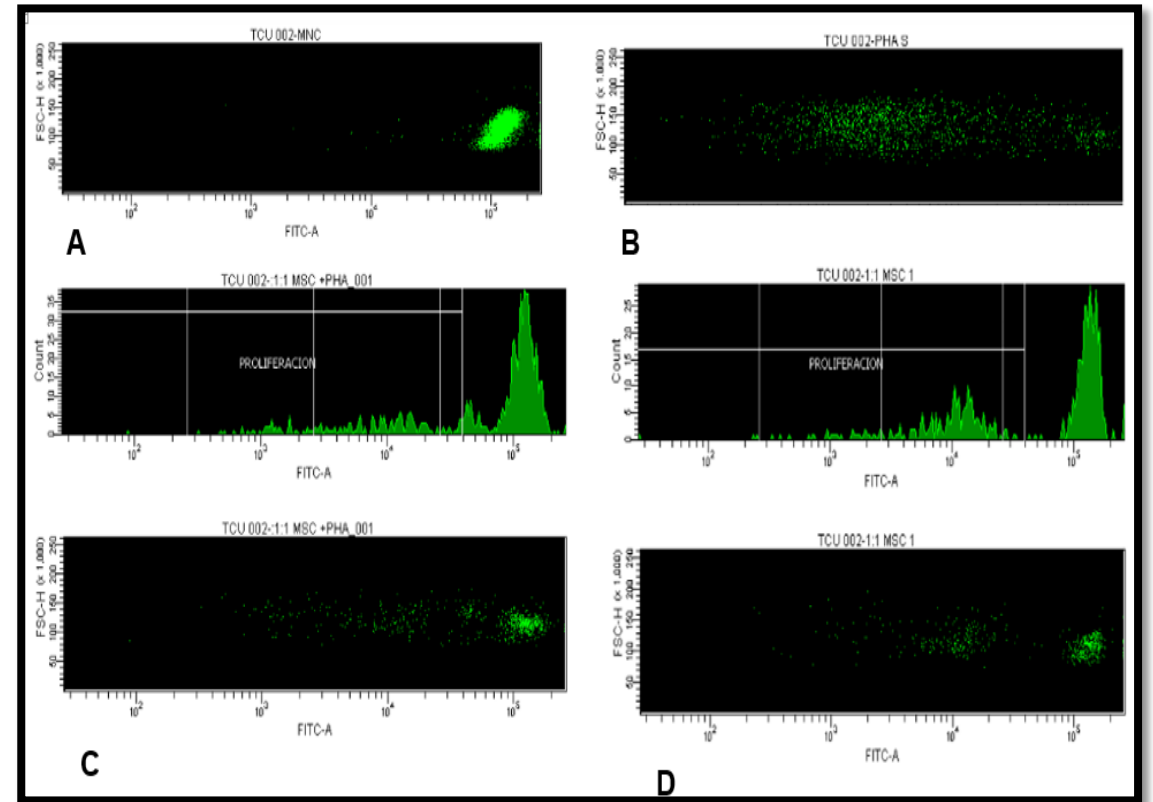
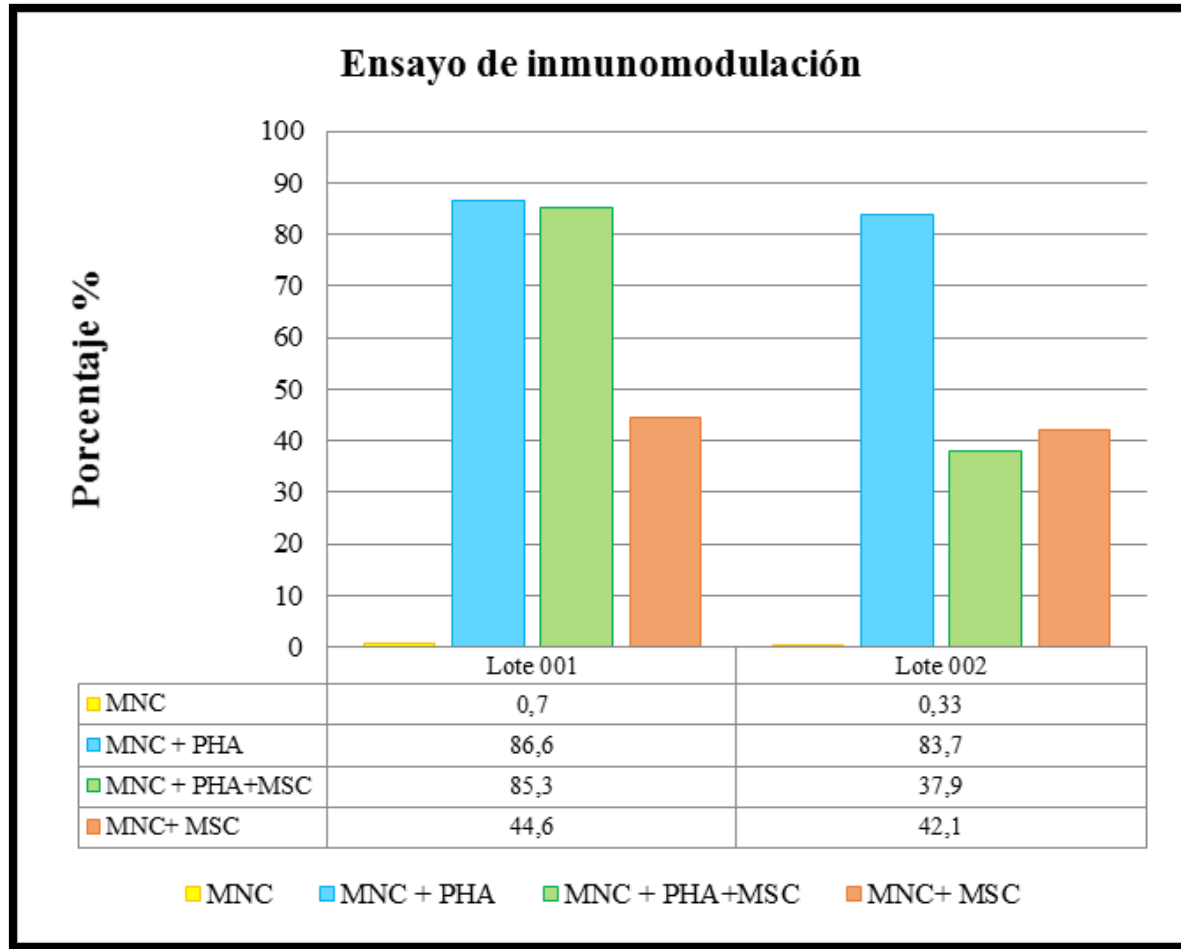


Imagen de Biorender

ENSAYO DE INMUNOMODULACIÓN



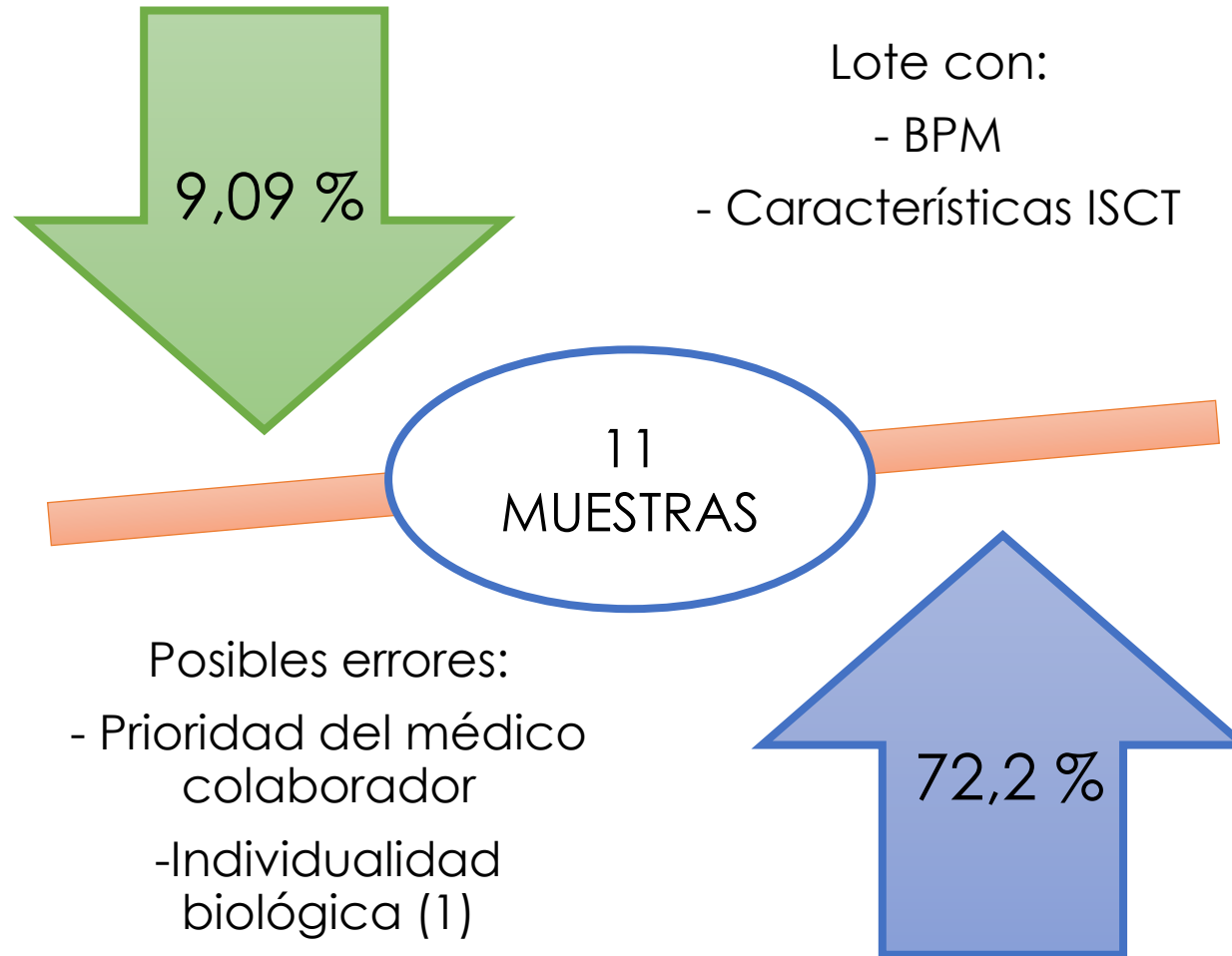
Lote 002
 (A) Control negativo, (B) Control positivo, (C) CMN + PHA + MSC, (D) CMN + MSC.

5. DISCUSIÓN

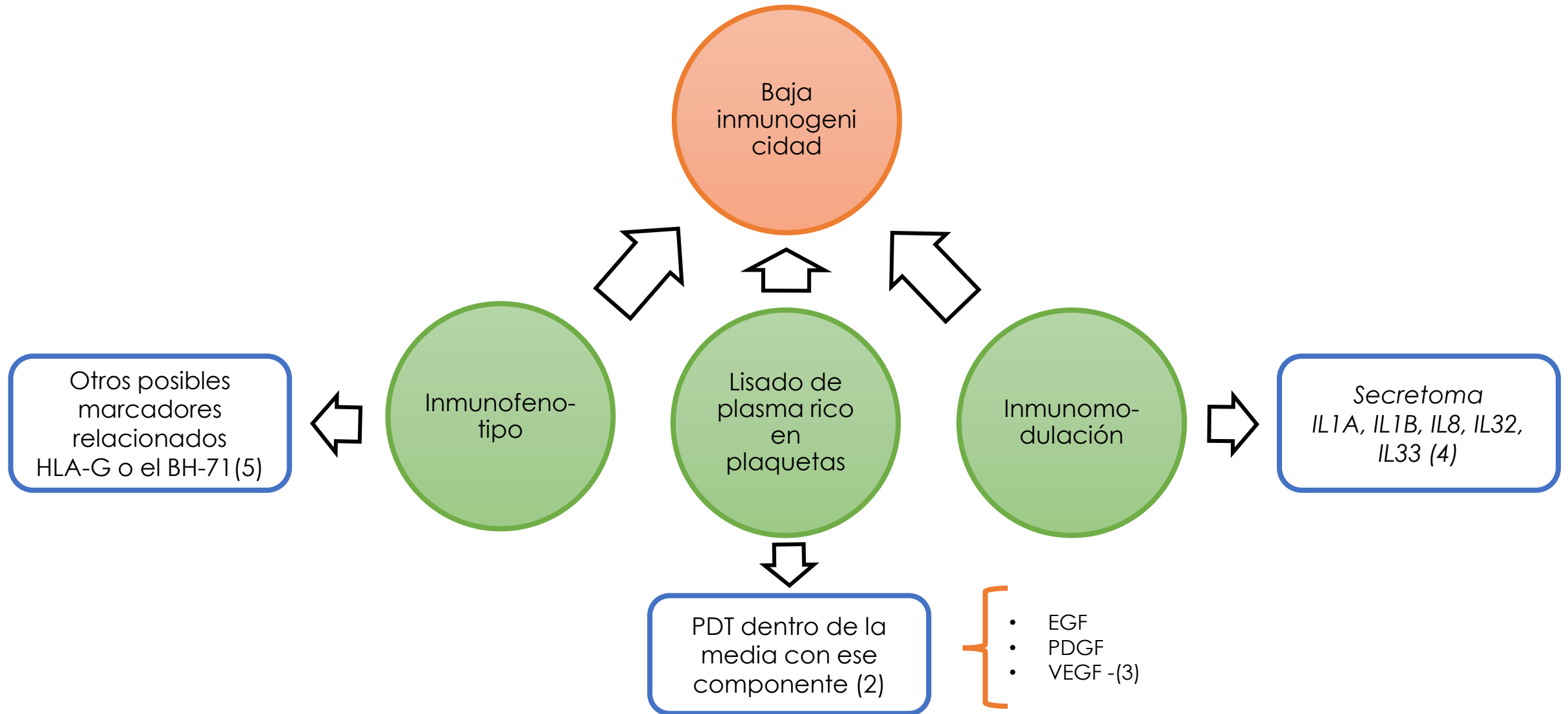


1966 (50) 2016

Recuperación de muestras



Propiedades de las MSC obtenidas



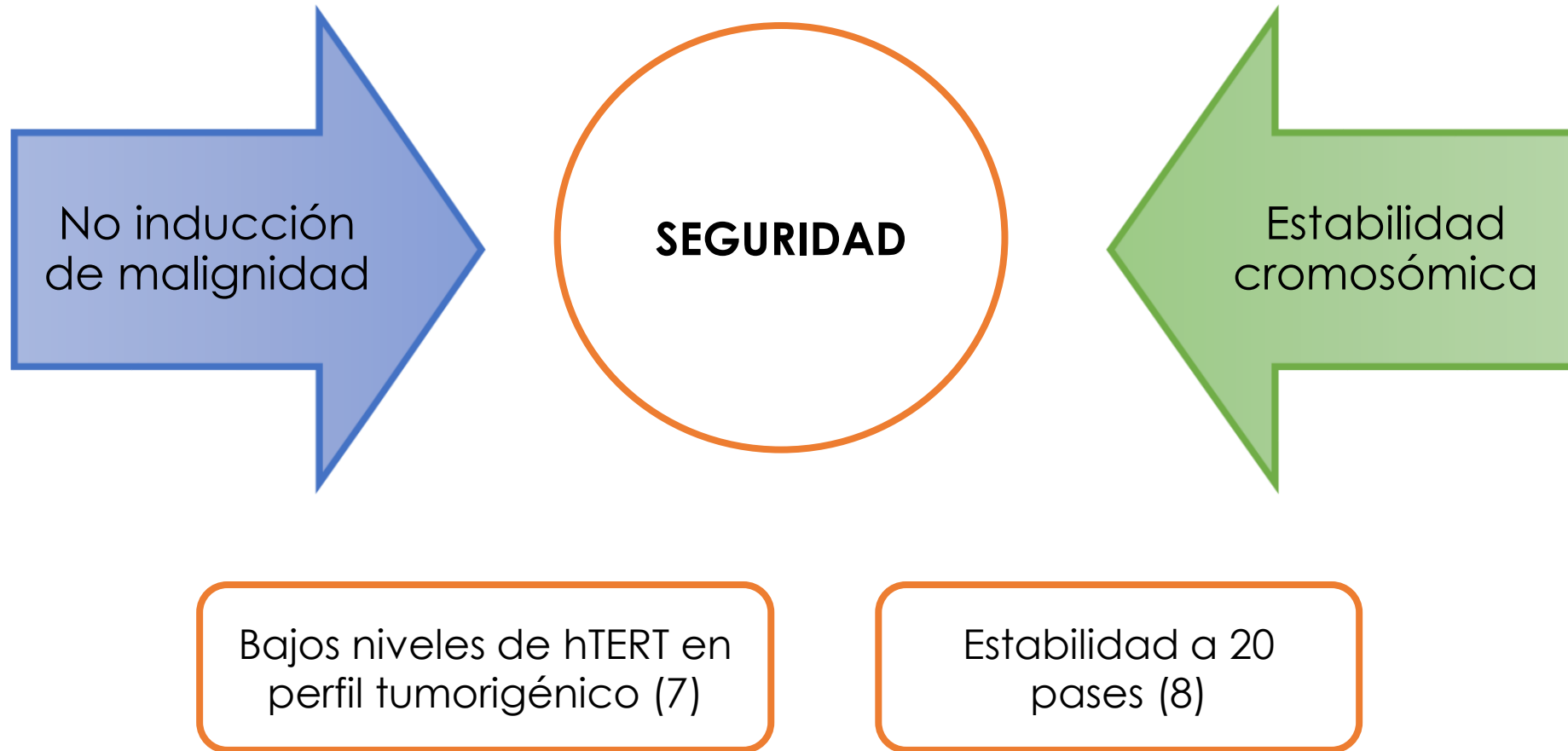
(2) Chen MS, Wang TJ, Lin HC, Thierry B. Four types of human platelet lysate, including one virally inactivated by solvent-detergent, can be used to propagate Wharton jelly mesenchymal stromal cells.

(3) Chen MS, Wang TJ, Lin HC, Thierry B. Four types of human platelet lysate, including one virally inactivated by solvent-detergent, can be used to propagate Wharton jelly mesenchymal stromal cells

(4) Barrett AN, Fong C-Y, Subramanian A, Liu W, Feng Y, Choolani M, et al. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Show Unique Gene Expression Compared with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using Single-Cell RNA-Sequencing.

(5) Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan C V. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: Phenotypic characterization and Optimizing their therapeutic potential for clinical applications. Int J Mol Sci.

Las MSC obtenidas son seguras



(7) Oliver-Vila I, Coca MI, Grau-Vorster M, Pujals-Fonts N, Caminal M, Casamayor-Genescà A, et al. Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. *Cytotherapy* [Internet]. 2016;18(1):25–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.001>

(8) Koltsova AM, Krylova TA, Musorina AS, Zenin V V., Turilova VI, Yakovleva TK, et al. The Dynamics of Cell Properties during Long-Term Cultivation of Two Lines of Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of Human Umbilical Cord. *Cell tissue biol.* 2018;12(1):7–19.

5. CONCLUSIONES

GABINETTE B

Con nuestro estudio piloto concluimos que el lote obtenido de Células Estromales Mesenquimales derivadas de Gelatina de Wharton de Cordón Umbilical (Lote 002) es completamente seguro y de alta calidad para ser usado en futuras investigaciones básicas y/o clínicas ya que:

El perfil inmunofenotípico del Lote está plenamente alineado con lo descrito por la ISCT

El tiempo de duplicación de las MSC obtenidas está acorde a lo descrito en la literatura

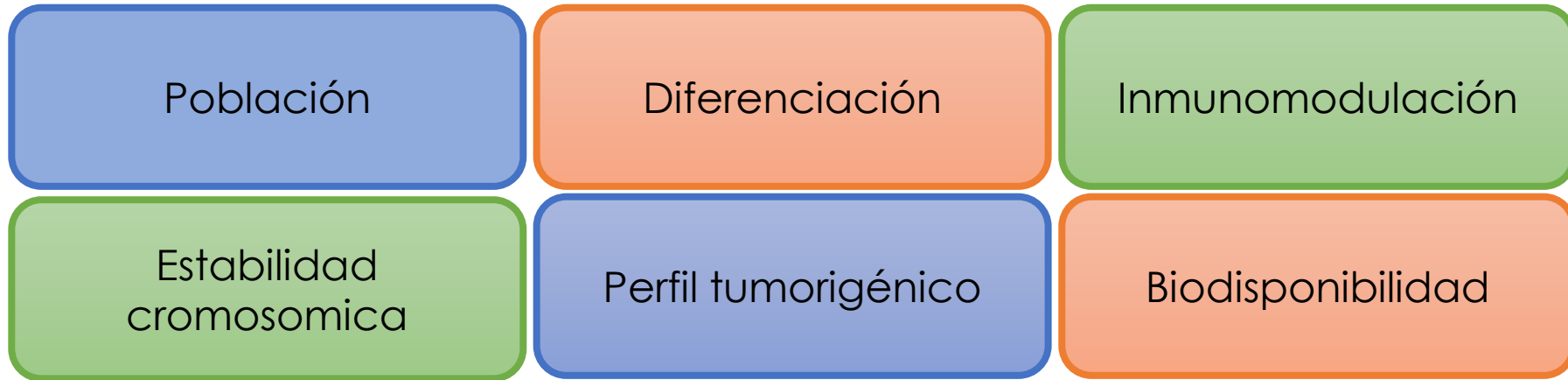
El Lote 002 es capaz de suprimir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica en los porcentajes esperados (>30%)

La estabilidad cromosómica a 4 pases de las MSC es satisfactoria con ausencia de anomalías estructurales

Las células no inducen malignidad en modelos murinos

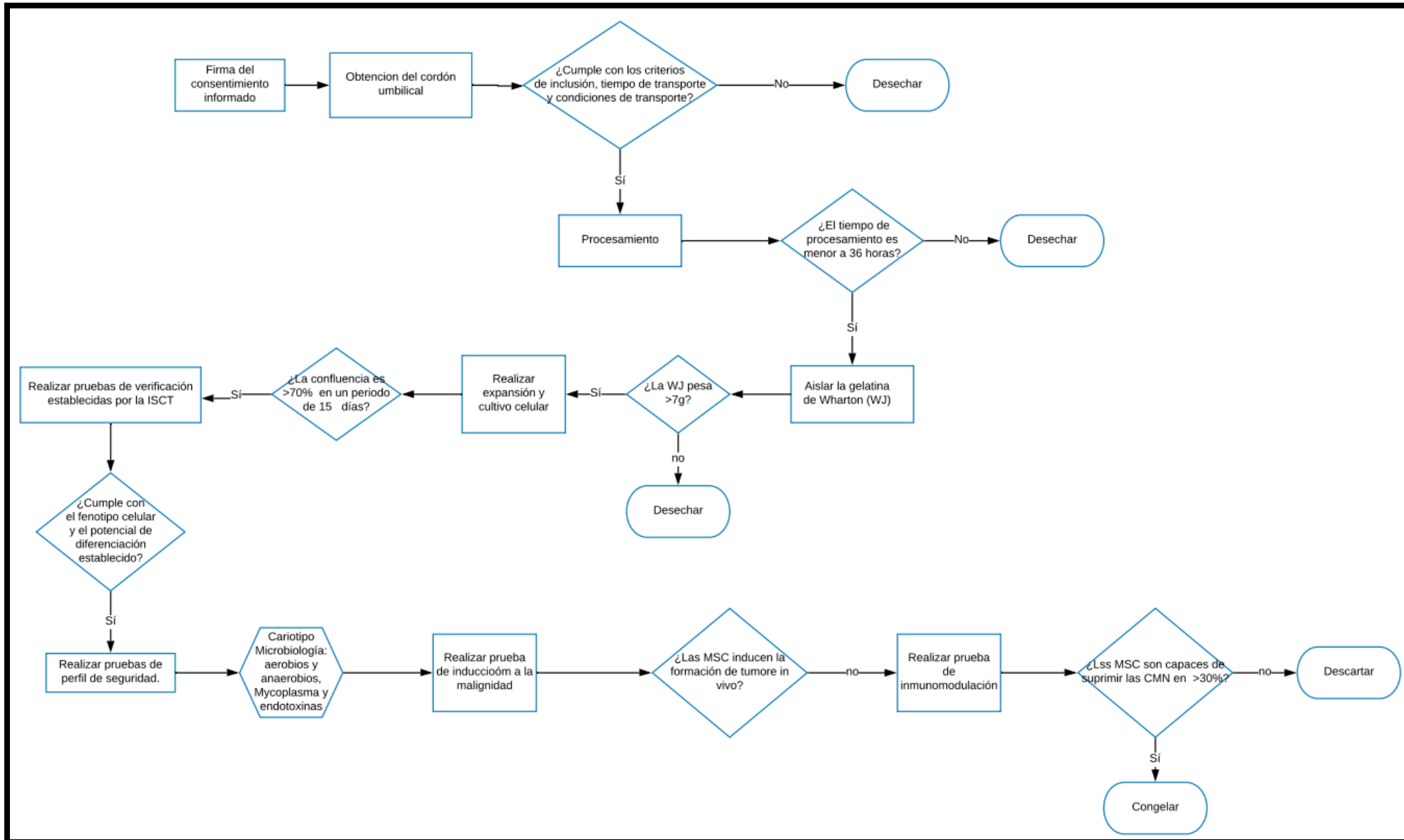
The image shows two dissected rat hearts placed in a clear petri dish. The hearts are light pinkish-white and have been cut open to reveal internal structures. Surgical forceps are visible on the right side of the dish, holding one of the hearts. The background is a solid blue color.

6. RECOMENDACIONES



Considerar las disposiciones legales vigentes en Colombia para productos biológicos como las células madre en aras de consolidar las bases tecnocientíficas y regulatorias en la creación de un banco alogénico de WJ-MSC.

PROTOCOLO PARA EL ESTUDIO PILOTO



AGRADECIMIENTOS

