



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

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

BOGOTÁ D.C.

JUNIO 2019



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

LAURA MARCELA SIERRA CRUZ

RICHAR DUVÁN TORRES BELTRÁN

YESSICA ALEJANDRA TRIANA

HEYDY DAYANA VERA DELGADO

Autores

LUZ MABEL ÁVILA Ph.D.

Asesora Externa

JEANNETTE NAVARRETE M.SC.

Asesor Interno

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

BOGOTÁ D.C. JUNIO 2019

A Dios por permitirnos terminar este proyecto.

A nuestras familias por su apoyo incondicional

Y a todas aquellas personas que nos brindaron

su apoyo y colaboración.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a la Doctora Luz Mabel Ávila por su paciencia, dedicación y esmero para hacer de este proyecto una realidad.

A Cryo-holdco Latam por la financiación para realizar este proyecto.

A la Doctora Jenniffer Priscila Ávila por enseñarnos y guiarnos siempre a lo largo del proyecto.

A las madres que decidieron participar en este estudio, voluntaria y desinteresadamente.

A todo el personal de Stem Medicina Regenerativa por el tiempo y la comprensión brindada

A la profesora Jeannette Navarrete por su asesoría y paciencia.

A las Doctoras Alejandra Muñoz del INS y Ana María Santos de la Universidad de la Sabana por brindarnos su conocimiento y tiempo.

Y por supuesto a nuestra Alma Máter, la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por ser el benefactor de nuestra formación como profesionales integrales.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	13
2. INTRODUCCIÓN	14
3. ANTECEDENTES	16
4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo General	20
4.2. Objetivos Específicos	20
5. MARCO TEÓRICO.....	21
5.1. Células madre: Generalidades	21
5.2. Clasificación de las Células Madre	21
5.2.1. Clasificación de las Células Madre según su potencial y capacidad de diferenciación.....	22
5.2.2. Células madre embrionarias (CME).....	23
5.2.3. Células madre órgano-específicas (adultas).....	24
5.3. Células Estromales Mesenquimales (MSC).....	25
5.3.1. Generalidades	25
5.3.2. Fuente de Células Estromales Mesenquimales	25
5.3.3. Mecanismo de acción de las Células Estromales Mesenquimales	26
5.3.4. Aplicaciones clínicas de las MSC	27
5.4. El cordón umbilical como fuente de Células Estromales Mesenquimales.....	28
5.4.1. Estructura del cordón umbilical	28
5.4.2. Composición de la gelatina de Wharton	30
5.4.3. MSC de la gelatina de Wharton	31
5.5. Técnicas.....	32
5.6. Buenas Prácticas de Manufactura	35
6. DISEÑO METODOLÓGICO.....	36
6.1. Tipo de estudio	36

6.2.	Población de estudio.....	36
6.2.1.	Universo	36
6.2.2.	Muestra.....	36
6.3.	Metodología	37
6.3.1.	Técnicas y procedimientos	37
7.	RESULTADOS.....	47
7.1.	Obtención y selección de las muestras	47
7.2.	Caracterización morfológica de las MSC obtenidas de cultivo	51
7.3.	Crio preservación de los lotes	52
7.4.	Fenotipificación.....	53
7.5.	Diferenciación osteogénica	54
7.6.	HLA.....	56
7.7.	Cariotipo.....	56
7.8.	Pruebas microbiológicas	57
7.9.	Inducción de malignidad	57
7.10.	Ensayo de inmunomodulación.....	60
8.	DISCUSIÓN	62
9.	CONCLUSIONES	66
10.	RECOMENDACIONES	67
11.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	68
11.5.	Procedimientos para garantizar aspectos éticos en la investigación	68
12.	REFERENCIAS	69
13.	ANEXOS.....	75
13.1.	Anexo 1.Consentimiento informado.....	75
13.2.	Anexo 2. Hoja de seguridad del componente	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de las MSC en la reparación celular y tejidos lesionados.	27
Figura 2. Estructura del cordón umbilical humano.	29
Figura 3. Características morfológicas de WJ-MSC aisladas por método de explante..	32
Figura 4. Plan técnico de trabajo.	37
Figura 5. Procedimiento para la toma de muestra de TCU..	40
Figura 6. Esquema del montaje de ensayo de inmunomodulación con CFSE.	45
Figura 7. Inoculación de las MSC al ratón Balb/c por medio de punción intraperitoneal. d. .	46
Figura 8. Aspecto físico de las muestras de cordón umbilical..	48
Figura 9. Morfología de los lotes celulares.	52
Figura 10. Citometría de flujo del lote 001..	53
Figura 11. Citometría de flujo del lote 002.Citometría de flujo del lote 001.....	54
Figura 12. Semana 3 post sometimiento a medio de diferenciación osteogénica.....	55
Figura 13. Coloración de fosfatasa alcalina posterior a 4 semanas después de inducir a las células a diferenciación ósea.	55
Figura 14. Coloración de Von Kossa posterior a 4 semanas después de inducir a las células a diferenciación ósea.	56
Figura 15. Análisis de bandas G de los lotes 001 y 002 de MSC de GW.....	57
Figura 16. Comparación de las biopsias de los ratones..	60
Figura 17. Resultados del ensayo de inmunomodulación del Lote CMSCTAAGWE-Cryoholdco-002.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de células madre.....	22
Tabla 2. Descripción de las características físicas de las muestras de tejido de cordón umbilical recolectadas.	47
Tabla 3. Tiempo de procesamiento de las muestras llevadas a cultivo.....	50
Tabla 4. Características de los lotes celulares. Lote 001, 002 y 003.....	50
Tabla 5. Peso de los ratones BALB/c.	58

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. <i>Características físicas de las muestras de tejido de cordón umbilical.</i>	48
Gráfica 2. Recuento de células adherentes posterior a 15 días de cultivo.	49
Gráfica 3. Datos de número de divisiones, factor de expansión, recuento de CMN y peso en gramos de la GW posterior a 25 días de cultivo de los tres lotes seleccionados inicialmente	51
Gráfica 4. Peso de los ratones.	59
Gráfica 5. Promedio de cada uno de los ítems del ensayo de inmunomodulación.	61

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

SC: Célula madre

MSC: Células Estromales Mesenquimales

CMA: Célula madre adulta

CMH: Célula madre Hematopoyética

UC: Cordón umbilical

WJ: Gelatina de Wharton

GMP: Buenas Prácticas de Manufactura

WJ-MSC: Células Estromales Mesenquimales de la Gelatina de Wharton

TCU: Tejido de Cordón Umbilical

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

CMN o MNC: Células Mononucleares

PBS: Buffer salino de fosfatos

PSA: Antibiótico penicilina-estreptomicina-anfotericina

DMEM: Medio Mínimo Modificado de Dulbecco

PHA: Fitohemaglutinina

LPRP: Lisado de Plasma Rico en Plaquetas

DMSO/Dex40: Dimetilsulfóxido/Dextran 40

1. RESUMEN

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

La Gelatina de Wharton del Cordón Umbilical Humano se postula como fuente alternativa de Células Estromales Mesenquimales por ser menos invasiva su obtención y reportar mayor capacidad de duplicación celular in vitro. El objetivo de este trabajo piloto es obtener al menos un lote de células grado GMP de MSC de Gelatina de Wharton con óptimo perfil de seguridad y calidad para futuras investigaciones de carácter clínico y/o básico. Para este estudio se recolectaron 11 muestras mediante donación altruista de gestantes sanas previa firma de consentimiento informado desde Octubre a Diciembre del 2018. Se realizó el aislamiento de las MSC por explante, citometría para marcadores CD34, CD45, CD90, CD105 y CD73, microbiología, diferenciación osteogénica, estabilidad cromosómica, propiedad inmunomoduladora, e inducción de malignidad in vivo. Del total de muestras, solo seis cumplieron con los criterios de inclusión iniciales. Al cultivo, solo dos muestras (Lotes 001 y 002) tuvieron un recuento $>50 \times 10^6$ de MSC. Para estos dos lotes, la diferenciación osteogénica alcanzó el 100% además de mostrar un inmunofenotipo acorde a lo establecido por la ISCT. No se encontraron anomalías genéticas y no se observó inducción de malignidad in vivo después de la administración intraperitoneal de éstas en ratones BALB/c. El ensayo de inmunomodulación de ambos lotes evidenció que únicamente el Lote 002 suprimió la proliferación de mononucleares en 37,9%. Con nuestro estudio piloto concluimos que el Lote 002 de Células Madre Mesenquimales derivadas de Gelatina de Wharton de Cordón Umbilical es seguro para ser usado en futuras investigaciones básicas y/o clínicas.

PALABRAS CLAVES: Células Estromales Mesenquimales, Gelatina de Wharton, Cordón Umbilical, Buenas Prácticas de Manufactura, Perfil de seguridad, Inducción de Malignidad.

2. INTRODUCCIÓN

Las Células Estromales Mesenquimales han captado el interés de la comunidad científica debido a múltiples características que se les han atribuido a lo largo de diversas investigaciones como proliferación *ex vivo* a largo tiempo, potencial de diferenciación multilínea e inmunopropiedades que las postulan como candidatas para el tratamiento de desórdenes inmunes como el lupus eritematoso sistémico entre otros(1).

Tradicionalmente las células madre han sido obtenidas y aisladas de la médula ósea, pero esto ha ido cambiando progresivamente ya que las propiedades y el número de células se ve directamente afectada por la edad del donante, además de lo complejo que resulta el proceso de extracción. Por tal motivo, los investigadores se han volcado a la búsqueda de fuentes alternativas de MSC como los tejidos perinatales. Se ha descrito que la placenta, el líquido amniótico y el cordón umbilical son fuentes ideales para la obtención de MSC debido a que son una fuente rica de estas células y la obtención no supone dilemas éticos como sí ocurre con la médula ósea(2–5).

Con respecto a las Células Estromales Mesenquimales derivadas de cordón umbilical, la literatura les atribuye un amplio abanico de propiedades únicas que postulan a estas células como potenciales tratamientos para múltiples enfermedades. En un estudio realizado en Chile por Bartolucci y sus colaboradores(6), se implantaron MSC derivadas del cordón umbilical, específicamente de la Gelatina de Wharton, en 7 pacientes con falla cardíaca en estadio III logrando evidenciar mejoramiento en la función ventricular izquierda lo que se traduce en una mejor calidad de vida en estos pacientes. Los autores atribuyen este resultado a la expresión incrementada de factores miocardiogénicos como el HGF (Hepatocytes Growth Factor) que es incluso 55 veces superior a la expresión dada por MSC derivadas de la médula ósea.

Las UC-MSC han demostrado un amplio poder de inmunomodulación, especialmente útil para la regeneración de tejidos. En un estudio realizado en China(1) se logró demostrar que los exosomas producidos por estas células promueven la angiogénesis y subsecuentemente la reparación de heridas, lo cual se evidenció *in vivo* con modelos murinos que presentaban quemaduras de II grado en la piel. Batolucci *et al.* (3) exagera aún más esa propiedad inmunomoduladora, sugiriendo que las UC-MSC son capaces de disminuir la respuesta inmune humoral del receptor frente a los HLA de las mismas.

Teniendo en cuenta este panorama, el banco de las UC-MSC cobra importancia precisamente por ese avance vertiginoso de la Medicina Regenerativa con estas células.

Briddell *et al.* (6) recalcan que el potencial terapéutico de estas células es enorme para diferentes enfermedades, además de que este tejido es considerado “un desecho” por lo que su obtención es relativamente sencilla y en términos de trasplante, estas células no son solo compatibles con el niño sino también en teoría con sus progenitores, hermanos e incluso abuelos (alotrasplante).

Unido a esto, el proceso de banco se ve beneficiado en cuanto a que la Gelatina de Wharton es una fuente rica de estas células madre y las características únicas que las identifican permite que se pueda establecer un protocolo que escale la producción de UC-MSc sin que esto afecte sus propiedades a futuro(4,5).

Es entonces como nace este estudio que pretende caracterizar y determinar la seguridad de MSC derivadas específicamente de la Gelatina de Wharton para futuros estudios clínicos que ratifiquen y expandan el potencial espectro terapéutico de estas células, así como dar paso a un adecuado proceso de banco de estas UC-MSc.

3. ANTECEDENTES

El proceso de banco de Células Estromales Mesenquimales se encuentra poco descrito en la literatura. Los estudios relacionados a este tema se enfocan en evaluar y optimizar los procesos que de alguna manera pueden influir en la viabilidad celular, inmunofenotipo y funcionalidad de las MSC como el aislamiento, almacenamiento y criopreservación. Por ejemplo, Chatzistamatiou T, et al. (7) determinaron en 2014 que el método de explante garantizaba un mayor número de células aisladas de gelatina de Wharton del cordón umbilical, al igual que mayor viabilidad comparado con la digestión enzimática. En cuanto al proceso de criopreservación, los autores demostraron que el uso de DMSO y de nitrógeno líquido no afecta la producción celular en el proceso de banco, aunque las células deben pasar primero por un proceso de cultivo y expansión para evitar que el estrés producido por el método de aislamiento empleado no afecte la viabilidad celular y el rendimiento final de las mismas. Esta misma aclaración es reafirmada por Lechanteur C, et al. (8) quienes realizan el mismo proceso en un banco de MSC derivadas de médula ósea en Helsinki. En otro estudio realizado en la Facultad De Medicina De La Universidad de Lisboa, Portugal, se demuestra que el posterior descongelamiento y criopreservación de las células incluso después de tres años, no causa diferencias estadísticamente significativas en el potencial de inmunomodulación, en la viabilidad celular y no se induce a la muerte celular programada por el congelamiento o por el uso de crioprotectores(9). Sin embargo, algunos estudios han evidenciado que la congelación de tejidos y el uso de dimetilsulfóxido y suero fetal bovino (DMSO-SFB) para su criopreservación generan cambios genéticos y de comportamiento celular post-trasplante, lo que disminuye su viabilidad para uso clínico; debido a esta problemática, se están evaluando otros métodos de criopreservación que no contengan DMSO ni suero animal. En un estudio realizado por Shivakumar S, et al. (10) se evaluó el efecto de dos crioprotectores (DMSO y solución de cóctel) sobre las células después de la post-descongelación del tejido, siguiendo dos protocolos de congelación diferentes (Convencional [-1 ° C / min] y programado).

Para analizar el comportamiento de estas células frente a los dos crioprotectores en los dos protocolos utilizados, se evaluó expresión de marcadores de superficie, factores pluripotentes, y diferenciación in vitro en osteocitos, adipocitos, condrocitos y hepatocitos, donde las células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (WJ-MS) criopreservadas con una solución de cóctel junto con el método programado (Prog-Cock) y con el método

convencional (Conv-Cock), fueron comparables con WJ-MSCs del tejido WJ reciente (Fresh). También se estudió la expresión de factores pro-apoptóticos (BAX, p53 y p21) y factor anti-apoptótico (BCL2) mediante RT-PCR y Western blot, donde las WJ-MSCs post-descongelación del grupo Conv-Cock, mostraron una expresión significativamente aumentada de factores pro-apoptóticos y una expresión reducida de factor anti-apoptótico en comparación con los otros grupos experimentales, además de resultados no tan positivos en los demás análisis en comparación con las células frescas y método programado(10). Por lo tanto, se concluye, que la congelación de tejido WJ fresco utilizando solución de cóctel junto con el método de congelación programado, permite una banca de tejidos WJ eficiente para futuras terapias regenerativas. A pesar de esto, se hace propicio estudiar por períodos de tiempo más prolongados el uso de esta solución cóctel y el método convencional ya que solo se realizó la criopreservación en un rango de 90 días.

La médula ósea es el “estándar de oro” para el aislamiento de éstas células, sin embargo, su obtención requiere de procedimientos invasivos. Tal es el motivo por el cual se están considerando tejidos extraembrionarios como la WJ del cordón umbilical a partir del cual se pueden derivar células con características de MSC de manera más accesible y su uso no genera problemas éticos. Los efectos regenerativos y terapéuticos de las MSC se deben principalmente a sus efectos inmunomoduladores, capacidad de autorrenovación y potencial de diferenciación, lo que las convierte en una opción atractiva para aplicaciones básicas y clínicas basadas en células.

En España se ha descrito el proceso de obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales. En dicho estudio realizado por Arbós A, et al. (2013) (11) se establece como hipótesis la factibilidad de obtener cordones umbilicales para derivar MSC y conservarlas almacenadas en un biobanco, en paralelo a un banco de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical para facilitar su utilización terapéutica. Los resultados confirman la hipótesis inicial al mostrar que es factible, en el contexto de un banco de sangre de UC, desarrollar un banco de MSC obtenidas a partir del mismo. Esta estrategia permite disponer de manera simultánea tanto de las MSC de UC como de los progenitores hematopoyéticos del mismo donante. Este hecho conlleva la ventaja añadida de disponer de los datos serológicos y de tipificación HLA de estas células, que una vez almacenadas y caracterizadas podrían utilizarse durante la fase aguda de lesiones tisulares y además

complementar otras terapias como el rechazo de órganos sólidos en trasplantes o las enfermedades autoinmunes.

La WJ al ser identificada como una fuente alternativa de MSC, Raf D, et al. (2018)(12) desarrolló un estudio comparativo entre dos métodos de aislamiento de MSC; un primer método denominado cultivo de explante y el segundo método conocido como digestión enzimática. Los resultados obtenidos son equiparables al estudio de Chatzistamatiou T (2014), mencionado anteriormente, los cuales demuestran que el método de aislamiento por explante es mejor comparado con el de digestión enzimática con colagenasa tipo I. El potencial de expansión es mayor por la técnica de explante y las células presentan una mejor característica de MSC.

En el año 2013, el doctor Salehinejad P, et al. estudió el método más adecuado para el aislamiento de células mesenquimales derivadas del cordón umbilical humano. Comparó cuatro métodos para el aislamiento de células: tres métodos enzimáticos; colagenasa / hialuronidasa / tripsina, colagenasa / tripsina y tripsina, y un método de cultivo de explantes. Para evaluar los resultados de los diferentes métodos utilizó la prueba de exclusión del colorante azul de tripan, la sal soluble en agua de tetrazolio, citometría de flujo, la actividad de la fosfatasa alcalina y la tinción histoquímica. Las células MSC se aislaron con éxito por todos los métodos, pero el método de aislamiento utilizado alteró profundamente el número de células y la capacidad de proliferación de las células aisladas. Las células se diferenciaron con éxito en linajes adipogénicos y osteogénicos y se detectó actividad de fosfatasa alcalina en las colonias de células de todos los grupos. El análisis de citometría de flujo reveló que CD44, CD73, CD90 y CD105 se expresaron en todos los grupos, mientras que CD34 y CD45 no se expresaron. A partir de dichos resultados concluyen que la diferencia radica en la densidad celular y capacidad de proliferación de las células de cada grupo; siendo el explante el método que resulta ser más indicado para obtener MSC de cordón umbilical(13).

Actualmente hay poca información disponible en la literatura sobre los parámetros de la cinética del cultivo y el efecto de los pases celulares sobre la estabilidad genética de las MSC, el mantenimiento de su identidad, su multipotencialidad o sus propiedades inmunomoduladoras. Este conocimiento se hace esencial para establecer protocolos de expansión y producir una población homogénea de células para uso clínico con características reproducibles. Es por eso que Fazzina, et al. (2015)(14) estandarizaron un protocolo confiable

para aislar WJ-MSC con fines de banca celular, en el que los UC fueron aislados por una técnica semiautomatizada mediante enzimas con grado GMP, y las MSC criopreservadas y almacenadas para su posterior expansión. En el estudio se evaluó la estabilidad genética, la diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, la fenotipificación tras 12 semanas post-descongelamiento y expansión en medio de cultivo donde se demostró que los tejidos de cordón umbilical obtenidos mediante el procedimiento semiautomatizado se pueden criopreservar inmediatamente después del procesamiento sin comprometer las capacidades de proliferación, fenotipo y propiedades de multipotencia de las MSC, lo que permite tener un acercamiento a un procedimiento rápido y confiable para obtener productos celulares que pueden ser criopreservados inmediatamente después del aislamiento y descongelados según sea necesario, para la expansión y el uso clínico sin cambiar las características iniciales de las MSC.

Una de las ventajas de WJ-MSC en comparación con otras fuentes de células madre incluye la reducción de la enfermedad injerto contra huésped y un mejor acceso al trasplante, ya que cuentan con un efecto no tumorigénico. Dicho efecto puede ser causado por la regulación a la baja de la señalización de c-myc. En ensayos preclínicos y clínicos de MSC en fase temprana, la seguridad de las MSC trasplantadas no está bien documentada en modelos animales, aunque se han inyectado MSC de cordón umbilical humano por vía intravenosa en primates no humanos para probar la seguridad de estas, se han inyectado células una vez cada 2 semanas durante 6 semanas en monos cynomolgus. No se informó toxicidad relacionada con el trasplante de células madre, y todos los sitios de inyección y los órganos estudiados por histopatología fueron normales, sin formación de tumor. Además, las WJ-MSC inyectadas en modelos murinos con enfermedad de xenoinjerto han dado como resultado un buen injerto y un resultado funcional y no se ha observado tumorigénesis. Aunque hay muy pocos estudios acerca de la inyección de MSC descritos se deben realizar más estudios in vivo a largo plazo para garantizar la seguridad de las MSC y poder aumentar la eficacia terapéutica de las MSC derivadas de tejidos adultos(15).

4. OBJETIVOS

4.1. 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.

4.2. 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 anormalidades 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.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Células madre: Generalidades

Las células madre, también conocidas como Stem Cells (SC) o células troncales, se describen ampliamente como 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. Una de las principales características de las células madre es la "autorrenovación", esto se define como la capacidad de multiplicarse por mitosis para generar al menos una célula hija con características similares a la célula iniciadora y capacidad de reconstrucción tisular *in vivo*. Otra característica fundamental de las células madre es su capacidad para diferenciarse en células especializadas bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales. Debido a estas características, las células madre representan herramientas poderosas para explorar varios aspectos de la biología celular y son muy prometedoras como herramientas terapéuticas para el descubrimiento de fármacos y la regeneración de tejidos(16,17).

5.2. Clasificación de las Células Madre

Las SC han sido objeto de gran interés en las últimas décadas debido a sus características y a su potencial terapéutico. Las investigaciones en este campo proporcionan conocimientos sobre cómo un organismo se desarrolla a partir de una sola célula fertilizada, así como también sobre los mecanismos mediante los cuales los individuos adultos sanos reparan las células dañadas y mantienen la homeostasis de sus órganos y tejidos(18).

Las células madre se pueden clasificar de acuerdo con su potencia, lo que indica qué tanto están comprometidas con convertirse en un tipo celular específico y típicamente se correlaciona con la etapa de desarrollo de la cual se obtienen (*Tabla 1*)(17). Por tanto, las células madre se clasifican como totipotentes, pluripotentes o multipotentes, pues son capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas. En los animales superiores, estas se clasifican en 2 grupos: células madre embrionarias y células madre órgano-específicas (adulto)(17,18).

Tabla 1.Tipos de células madre. Adaptado de: Franceschetti T, De Bari C. The potential role of adult stem cells in the management of the rheumatic diseases. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease. 2017; 9(7):165-179.

Tipo de célula madre	Potencia	Fuente de tejido
Células madre embrionarias	Pluripotente	Blastocisto
Pluripotencia inducida células madre	Pluripotente (programada)	Fibroblastos cutáneos, queratinocitos, células T, hepatocitos, otras células somáticas
Células madre fetales	Multipotente	La sangre fetal, la médula ósea, el hígado, el pulmón, riñón, páncreas
Células madre adultas.	Multipotente	Células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales: cordón umbilical, tejidos adultos (sangre periférica, médula ósea, membrana sinovial, periostio, tejido adiposo, pulpa dental)

5.2.1. Clasificación de las Células Madre según su potencial y capacidad de diferenciación

1. Totipotenciales: únicamente el cigoto y las descendientes de las 2 primeras divisiones son células totipotenciales, ya que tienen la capacidad de formar tanto el embrión como el trofoblasto de la placenta.
2. Pluripotenciales: a los 4 días las células totipotenciales empiezan a diferenciarse y forman el blastocisto y la masa celular interna. Las células de esta última son consideradas pluripotenciales y pueden diferenciarse en las 3 líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero pierden la capacidad de formar la placenta.
3. Multipotenciales: son células capaces de producir un rango limitado de linajes de células diferenciadas de acuerdo con su localización, por ejemplo, las SC del sistema nervioso central tienen el potencial de generar 3 tipos celulares: neuronas, oligodendrocitos y astrocitos.
4. Unipotenciales: son células capaces de generar un solo tipo de célula específica; por ejemplo, las CM en la membrana basal de la epidermis interfolicular, que producen únicamente escamas queratinizadas(18).

5.2.2. Células madre embrionarias (CME)

Se clasifican en tres tipos: Células madre embrionarias, Células madre germinales y Células madre de los teratomas y teratocarcinomas.

- **Embrionarias**

Derivan de la masa celular interna del embrión en el estadio de blastocito (7-14 días) y son totipotentes y pluripotentes. A partir de ellas, y tras muchas divisiones celulares, surgirán con las que forman parte del tejido especializado; sin embargo, aunque las células de la masa celular interna del blastocisto son pluripotentes, no son en sí mismas células madre dentro del embrión, porque estas no se mantienen indefinidamente como tales en condiciones *in vivo*, sino que se diferencian sucesivamente en los diversos tipos celulares durante la fase intrauterina. Lo que ocurre es que cuando se extraen del embrión y se cultivan bajo ciertas condiciones *in vitro*, estas se convierten en células «inmortales» dotadas de esas 2 propiedades mencionadas: autorrenovación y pluripotencia, características importantes para poder ser utilizadas en terapia celular(18).

- **Germinales**

Se localizan en la cresta germinal de los fetos, lugar donde se produce la diferenciación de la línea germinal.

- **De los teratomas y teratocarcinomas**

Se localizan en las gónadas en forma de tumoración. Las células diferenciadas del tumor se forman a partir de células madre pluripotentes de carcinoma embrionario que derivan, a su vez, de células primordiales germinales del embrión (posimplantación). Son tumores que contienen una gran variedad de tipos celulares que incluyen desde células musculares, cartílago, hueso, epitelio, neuroectodérmico primitivo, estructuras ganglionares y epitelio glandular, es decir, derivan de las 3 capas embrionarias que tiene un embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo)(18).

5.2.3. Células madre órgano-específicas (adultas)

Las Células Madre Adultas (CMA) son derivadas de las células embrionarias, a lo largo de la vida del tejido poseen capacidad multipotencial, es decir, son capaces de originar células especializadas de un órgano concreto en el embrión y también en el adulto. Estas células son ideales para la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos y la terapia de sustitución celular. Esto se debe principalmente a su capacidad de diferenciarse en múltiples líneas celulares(18).

La terapia basada en células madre adultas constituye la forma de tratamiento más innovadora para la regeneración de los tejidos patológicos, ausentes o deficitarios, así como de relleno estético apropiado para variedad de indicaciones cosméticas y reconstructivas; asimismo, es una de las líneas prioritarias de investigación en todo el mundo y evita los problemas de rechazo inmune de los homotrasplantes, las complicaciones inherentes a la implantación de otros materiales aloplásticos, las secuelas estéticas o funcionales de las zonas donantes de los autotrasplantes de mayor morbilidad y los problemas éticos del uso de células madre embrionarias, de ahí que la terapia celular se haya convertido en una realidad en la última década y haya surgido como un nuevo instrumento para múltiples especialidades(18).

Entre las CMA más estudiadas se encuentran las Células Madre Hematopoyéticas (CMH) y las Células Estromales Mesenquimales o Mesenchymal Stromal Cell (MSC) en inglés. Las CMH han sido objeto de extensa investigación ya que son responsables de la regeneración y mantenimiento de las células sanguíneas que se ubican en sangre periférica, Médula ósea (MO), hígado y timo(19).

En la última década se han realizado numerosos estudios de caracterización de Células Madre Mesenquimales que las han definido como células adherentes pluripotentes de morfología fibroblastoide no hematopoyéticas, capaces de diferenciarse en diversos tejidos como osteoblastos, adipocitos y condrocitos(19).

5.3. Células Estromales Mesenquimales (MSC)

5.3.1. Generalidades

Las MSC son un grupo de células madre adultas multipotentes presentes en prácticamente todos los tejidos estructurales y de soporte de un organismo, que pueden aislarse y expandirse fácilmente *ex vivo*(20). Estas células fueron aisladas de médula ósea y caracterizadas por primera vez por Alexander Friedenstein quien las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos(21). Además, poseen características biológicas únicas tales como la plasticidad, autorrenovación a largo plazo y propiedades inmunológicas, considerándose células inmunoprivilegiadas ya que modulan la proliferación y diferenciación de células T y B, la maduración de células dendríticas y la actividad de las Natural Killer *in vitro*(22). Es por eso que durante los últimos años las MSC han adquirido una gran importancia, gracias a su potencial terapéutico(16) y posterior uso en medicina regenerativa.

La identidad de las MSC de cualquier fuente de tejido se verifica comúnmente mediante el cumplimiento de los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, International Society Cellular Therapy), que incluyen 1) capacidad de crecer y adherirse a la superficie del recipiente de cultivo, 2) Perfil característico de expresión de marcadores de superficie como CD105, CD90 y CD73, y ausencia de marcadores como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD19 y HLA-DR, y 3) Potencial de diferenciación *in vitro* a adipocitos, condrocitos y osteocitos(22,23).

5.3.2. Fuente de Células Estromales Mesenquimales

Las MSC residen en diversos tejidos siendo las primeras aisladas de MO. Desde entonces se ha considerado este órgano como la principal fuente y el estándar de oro para la obtención de dichas células(24).

No obstante, la MO como fuente de aislamiento de estas células presenta limitaciones, como el bajo número de MSC, el riesgo en la toma de la muestra por ser un procedimiento invasivo y la disminución en la capacidad de proliferación y diferenciación de las células según la edad del donante; razones por las cuales fuentes alternativas como la sangre del cordón umbilical,

la gelatina de Wharton, el líquido amniótico, la placenta y el tejido adiposo han tenido acogida para lograr el aislamiento y el cultivo de estas células(24).

5.3.3. Mecanismo de acción de las Células Estromales Mesenquimales

Hasta la fecha no se conocen con claridad los mecanismos de acción de las células Madre Mesenquimales, sin embargo, han surgido varias hipótesis con el objetivo de explicar la función de éstas en el trasplante alogénico. Entre las hipótesis más estudiadas se encuentran la transdiferenciación celular, la fusión de células y un efecto autocrino/paracrino secundario a la liberación por las células de diferentes moléculas solubles o citoquinas con acciones específicas, que incluyen varios factores de crecimiento.

La hipótesis de la transdiferenciación celular, ha sugerido que las señales emitidas por medio de factores liberados por las células residentes, son capaces de estimular a las células trasplantadas para su transdiferenciación en el tipo de célula residente circundante, lo que permitiría su integración al "nicho" apropiado para su acción regenerativa (*figura 1. a*). El mecanismo de fusión consiste en una especie de rescate de células dañadas mediante la incorporación de células jóvenes (*figura 1. b*). También se ha descrito la acción mediante factores solubles liberados por las células trasplantadas que pueden desempeñar una acción esencial en la regeneración de los tejidos mediante un mecanismo paracrino que actúa estimulando en el sitio afectado a las células normales residentes, además se cree que existe adicionalmente un efecto autocrino sobre las propias células trasplantadas que los secretan, modulando su biología y favoreciendo su autorrenovación, proliferación y continuidad de sus funciones (*figura 1. c*) (25,26).

Se ha comprobado que las células madre pueden producir varios elementos solubles que son esenciales para su acción y que incluyen factores que intervienen en la citoprotección, proliferación, diferenciación y migración celular, angiogénesis, respuesta inflamatoria, asentamiento celular y quizás con otras funciones aún no conocidas(27). Aunque se han descrito más mecanismos moleculares por medio de los cuales las células son capaces de realizar su acción regenerativa, los tres descritos anteriormente son los más estudiados y más aceptados. Cabe resaltar que las células pueden utilizar varios mecanismos a la vez como lo describe Spees y sus colaboradores(26).

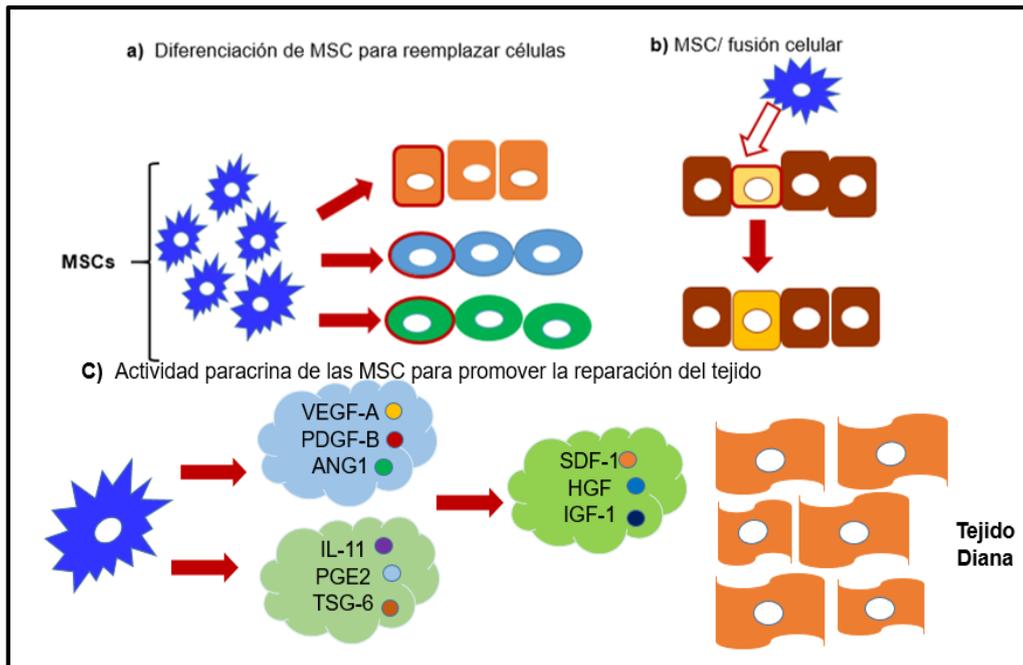


Figura 1. Mecanismos de las MSC en la reparación celular y tejidos lesionados. A) Diferenciación a distintos linajes celulares para el reemplazo celular. B) Rescate de células dañadas mediante fusión celular. C) Secreción de factores paracrinos como factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. Figura modificada de Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. Stem Cell Research & Therapy. [Online]. 2016; 7(1):125. [Cited 2017 Sep 17]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5007684/>

5.3.4. Aplicaciones clínicas de las MSC

Hoy día, la principal aplicación de las SC es en la médula ósea debido a que es un recurso celular propio, accesible y abundante para la terapia celular de SC autólogas; sin embargo, a medida que esta envejece disminuye su potencial y número en el tejido humano(18). Franceschetti y Bari han descrito en su revisión que “las células madre adultas van a permanecer en sitios especializados denominados nichos, que son microambientes especializados en los que las células madre adultas permanecen paradas (no divididas)”(17). En este nicho las células van a permanecer hasta que se necesite de la acción regenerativa.

Los potenciales terapéuticos de las MSC han sido investigados en ensayos clínicos de fases I, II y III en enfermedades cardiovasculares, esclerosis múltiple, apoplejía, enfermedad de Crohn, osteogénesis imperfecta, autismo, diabetes tipo I, osteoartritis, nefritis lúpica, esclerosis sistémica rápidamente progresiva, distrofia muscular, degeneración macular y lesión de la médula espinal, entre otros. Es claro que se requieren muchos más ensayos

clínicos que aporten robustez a los datos iniciales obtenidos en reportes de caso, series de caso y ensayos clínicos(28)¹⁹. Se ha reportado la utilización de las MSC en diversos ensayos clínicos como vehículo terapéutico de genes en el caso de enfermedades monogénicas, o como vehículo de terapias antitumorales o antiangiogénicas, incluso como terapia de reemplazo celular, por su potencial de diferenciación en el uso de la regeneración de tejidos destruidos o dañados(28). En esta área se están desarrollando trabajos de investigación donde se busca reemplazar células dañadas por células funcionales que restituyan la función normal de los tejidos u órganos en enfermedades debilitantes, tales como: nefritis lúpica, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, afecciones cardiovasculares, entre otras.

5.4. El cordón umbilical como fuente de Células Estromales Mesenquimales

El cordón umbilical humano es una rica fuente de MSC. De hecho, es el advenimiento de la biología MSC que ha impulsado el creciente interés en el tejido del cordón umbilical, como lo atestigua el creciente número de publicaciones en las dos últimas décadas(28).

5.4.1. Estructura del cordón umbilical

En los mamíferos placentarios, el cordón umbilical es una estructura que conecta la placenta con el feto en desarrollo, proporcionando así una fuente de alimento fetal. El cordón umbilical humano a término tiene un promedio de 50 cm de largo y una circunferencia media de 1,5 cm. El cordón umbilical cuenta con un revestimiento exterior de una sola capa de epitelio amniótico que encierra un tejido conjuntivo mucoide en el que se encuentra tres vasos, una vena y dos arterias, que transportan sangre oxigenada y desoxigenada entre la placenta y el feto, respectivamente. Estos vasos comprenden solamente una túnica íntima y media y carecen de túnica adventicia. Las funciones adventicias que generan soporte vascular y alguna función contráctil, se consideran cumplidas por el tejido conjuntivo mucoide denominado "Gelatina de Wharton" la cual fue descrita por primera vez por Thomas Wharton en 1656 y la denota como un tejido que evita el retorcimiento de los vasos durante el movimiento del feto en el útero y además no es inervada y no contiene sangre ni linfa (*Figura 2*)(29).

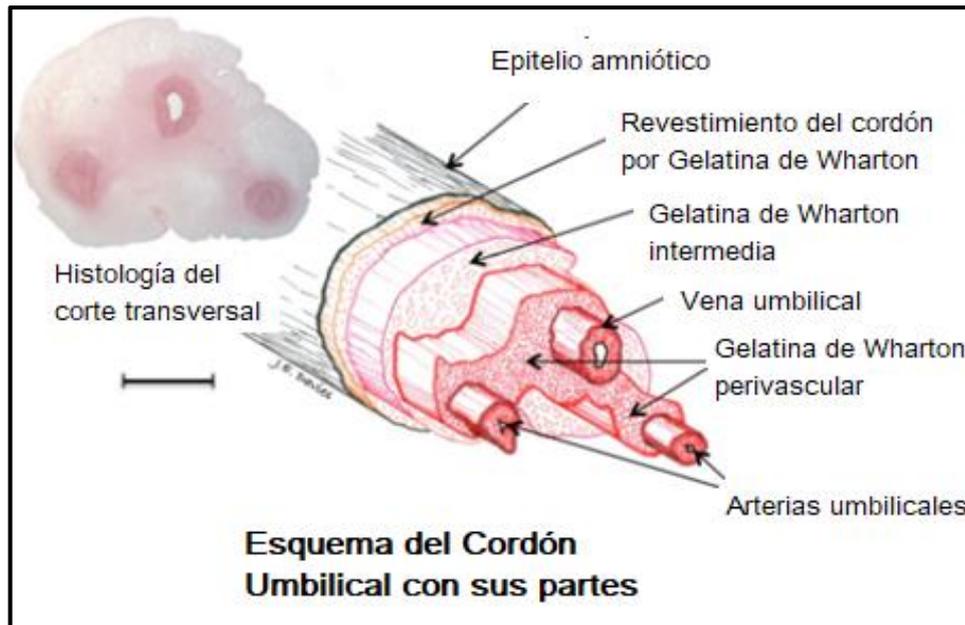


Figura 2. Estructura del cordón umbilical humano. Corte transversal completo del cordón que muestra un epitelio amniótico externo y tres vasos contenidos dentro de la gelatina de Wharton. Modificada de: The structure of the human umbilical cord with a a three- dimensional by Stem cells. [Online]. 2017; 6(7):1620-1630. [Consulted 2018 apr 10]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28488282>

La clasificación regional de la anatomía del cordón umbilical humano se divide en seis zonas: a) el epitelio amniótico, b) estroma subamniótico, c) las hendiduras, (d) el estroma intervascular, e) el estroma perivascular, y f) los vasos(29).

La zona subamniótica contiene células inmaduras que conservan la capacidad de proliferación mientras que la zona perivascular contiene células altamente diferenciadas, las células de estas dos regiones son de origen embriológico diferente. En cuanto al tiempo de diferenciación de las células en las dos regiones se evidencia que aquellas que se ubican en la región subamniótica tienen un tiempo de diferenciación prolongado en comparación con las de la zona perivascular, que muestran una capacidad de diferenciación mucho más rápida(29).

Las hendiduras dentro de la gelatina de Wharton se consideran regiones desprovistas de colágeno, y se cree que juegan un papel importante en las propiedades mecánicas del tejido. La presencia de hendiduras proporciona una señal útil cuando se examina la gelatina de Wharton, ya que están ausentes en las zonas perivascular y subamniótica.

Aunque la estructura del cordón umbilical parece simple, su desarrollo embriológico da lugar a aportaciones celulares de varias fuentes. En el desarrollo humano, después de la

implantación del blastocisto al final de la primera semana después de la fecundación, el feto se conecta inicialmente al endometrio materno a través del trofoblasto invasor. Esta conexión se desarrolla rápidamente a través del tallo de conexión, formado a partir del mesoblasto extraembrionario, el saco vitelino secundario y la pared del trofoblasto mural. Pronto, durante el desarrollo temprano del intestino posterior, el mesénquima de tallo de conexión es invadido por el conducto alantoideo, que da lugar a los vasos umbilicales que se conectan con la circulación placentaria. Por lo tanto, a medida que se desarrolla el cordón umbilical, comprende una cubierta externa de epitelio amniótico y una coalescencia de mesénquima amniótico somato pleural con mesénquimas esplenopleúricas vitelino intestinales y alantóicos. Este último, con el que los vasos umbilicales están más íntimamente asociados, el tejido perivascular, se podría razonablemente suponer que se origina en el mesoblasto extraembrionario. Sin embargo, el cordón crece rápidamente en longitud y circunferencia a término y el aumento en el volumen de gelatina de Wharton es proporcional a este crecimiento(29).

Se ha demostrado que la mayor parte de MSC de cordón umbilical se encuentra ubicada en las regiones perivasculares, lo que supone que es el sitio anatómico en donde se lleva a cabo la proliferación de células precursoras impulsando un aumento en el volumen de gelatina de Wharton.

5.4.2. Composición de la gelatina de Wharton

La gelatina de Wharton (WJ) se clasifica como un tejido conectivo. Algunos consideran la WJ es un tejido conjuntivo simple en contraste con el líquido o tejido conectivo esquelético, pero es más común clasificarlo como un tejido conectivo mucoso, o mucoso(29).

Normalmente, otras células también están presentes en la matriz de tejidos conectivos incluyendo alguna forma de tipo de células fagocíticas y también aquellas que proporcionan elementos vasculares y nerviosos. La WJ del cordón humano es única entre los tejidos conectivos, ya que contiene sólo Células Mesenquimales que comprenden los miofibroblastos funcionales del tejido y sus precursores(29).

McElreavey et al. fue el primero en aislar células del cordón umbilical humano, y junto con Takechi, et al. reportaron células parecidas a fibroblastos que contenían microfilamentos, y eran positivas para vimentina y desmina. La distribución celular en la WJ se describió como más densa en el área perivascular. Además, las células periféricas tenían procesos

citoplasmáticos más largos y más numerosos que los de las regiones perivasculares. Estos autores, junto con otros más tarde, observaron que la región perivascular parecía servir a la función de una adventicia, que no está presente en los vasos del cordón umbilical humano, aunque puede encontrarse en otras especies(29).

Una matriz de tejido conectivo comprenderá un componente de fibra, más comúnmente colágeno, y una sustancia fundamental. El colágeno I es la proteína predominante en la gelatina de Wharton; en un estudio realizado por Gogiel et al. mostraron que la WJ contiene principalmente pequeños proteoglicanos de condroitina / dermatán sulfato con predominio de la decorina sobre el biglycan. Se informó que el 95% de la gelatina de Wharton es matriz extracelular que comprende colágeno (3.6), glicoproteína (0.3) ácido hialurónico (0.31) glucosaminoglucano sulfatado (0.14) y proteínas plasmáticas difusibles (1.2) lo que constituye todo el peso húmedo(29).

5.4.3. MSC de la gelatina de Wharton

La WJ del cordón umbilical (UC) contiene tejido conectivo mucoide y diferentes tipos de células con morfología fibroblastoide, de éstas, una población celular, que desde el 2004 despertó el interés de la comunidad científica que investiga en células madre son las Células Estromales mesenquimales multipotentes obtenidas de la WJ, las cuales pueden ser expandidas en cultivo y derivadas a distintos tipos celulares (*Figura 3*)(12,18). La obtención de las MSC-WJ tiene diversas ventajas con respecto a las MSC obtenidas de otras fuentes como Médula Ósea o tejido adiposo ya que su procedimiento no es invasivo y provienen de tejido considerado como desecho biológico (cordón umbilical), por lo que no representa ningún riesgo para la madre o el recién nacido, igualmente no presentan dilemas éticos.

La investigación preclínica y clínica sitúa las MSC-WJ del UC humano como una fuente cada vez más valiosa para la terapia celular y medicina regenerativa. Éstas poseen características compartidas de SC, entre las cuales se encuentran: alta tasa de proliferación y regeneración clonal mediante divisiones asimétricas (autorrenovación) y alto grado de potencialidad para diferenciarse en distintos tipos celulares (18).

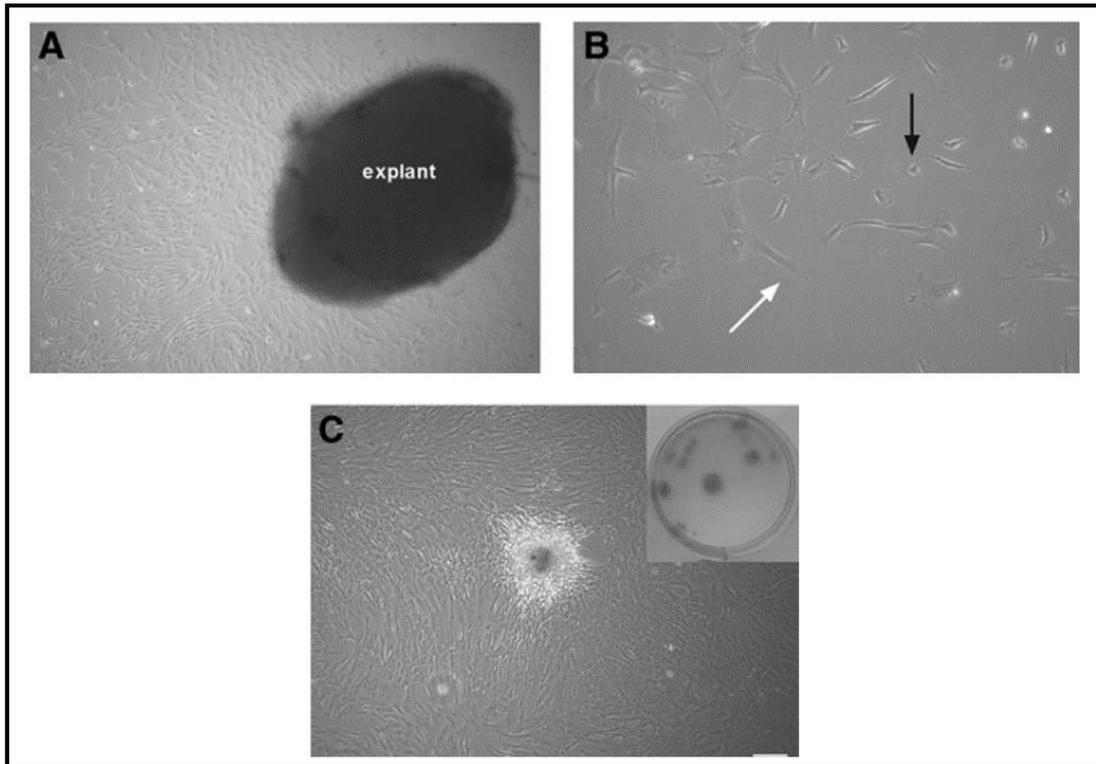


Figura 3. Características morfológicas de WJ-MSC aisladas por método de explante. (A) Imagen de fase de un explante adjunto con crecimiento celular; (B) WJ-MSC que muestra una morfología heterogénea de células similares a fibroblastos (flecha blanca) y células pequeñas, a menudo triangulares (flecha negra); (C) formación de colonias en cultivos densos al 100% de confluencia. Tomado de: Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem cells and development* (12).

5.5. Técnicas

- **Explante celular**

Se insertan fragmentos de cordón umbilical apropiadamente en placas de cultivo de tejido de 10 cm a intervalos de 0,5 cm, después se añade medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% (vol / vol) de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 unidades / ml) y estreptomycin (100 μ g / ml) y se cultivan los tejidos a 5% de CO₂ y humedad saturada de 37 ° C. Después de 4 horas se agrega cinco mililitros de medio DMEM se añadieron y se realiza un recambio del medio cada 3-4 días(30,31).

- **Adherencia celular primaria**

Se realiza una adherencia celular primaria, el crecimiento se observa bajo un microscopio de contraste de fase invertida, luego se utiliza una coloración con Azul de Trypan para calcular la cantidad de células primarias cultivadas y la cantidad de células recogidas de cada fragmento de cordón umbilical (las células que no se tiñen con Azul de Trypan se consideraron células viables)(32).

- **Citometría de flujo**

La citometría de flujo (CMF) constituye una técnica de avanzada, automatizada, objetiva y altamente sensible, muy útil para el estudio del inmunofenotipo de las células (33,34). La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de laser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Estos parámetros están relacionados con características intrínsecas de la célula, como su tamaño y la complejidad de su núcleo y citoplasma, así como con su capacidad antigénica (inmunofenotipo)(35).

- **Estudio del cariotipo**

Para determinar que no haya anomalías tanto estructurales como numéricas en los cromosomas se hace necesario un estudio de estos al cual se le denomina cariotipo, los cromosomas son visibles solo en la etapa metafásica de la mitosis(36).

- **Determinación de HLA**

La tipificación molecular del alelo HLA se realiza para proporcionar la coincidencia de alelos HLA de clase I y clase II varios problemas en la terapia transfusional, el tipeado de HLA se realiza mediante PCR(37).

- **Determinación de Mycoplasma**

El Mycoplasma es un contaminante común de las muestras de cultivo de tejidos. Su presencia puede cambiar muchas de las reacciones celulares, como alterar la tasa de crecimiento celular, inducir cambios morfológicos o transformación celular, la contaminación no es obvia, ni macroscópicamente ni microscópicamente por ende los métodos más empleados son Enzimo Inmuno Ensayo (ELISA)(38), Tinción de ADN mediante fluorocromos, PCR y cultivo microbiológico(39).

- **Inducción de Malignidad y Tumorigénesis**

La evaluación de la inducción de malignidad y tumorigénesis se hace necesario en estudios que pretenden demostrar científicamente la seguridad de las células madre debido a que éstas tienen gran potencial de convertirse en tratamientos novedosos para distintas enfermedades crónicas.

El modelo vivo más usado para este ensayo es el ratón de laboratorio NMRI nu/nu o CB-17/lcr-Crl quienes presentan como principal característica un sistema inmune suprimido(40,41). Sin embargo, también ha sido realizado en ratones inmunocompetentes obteniendo así resultados más cercanos al comportamiento de las MSC en el organismo de un ser humano(42).

Con respecto al procedimiento del ensayo, varios estudios revisados hasta la fecha son muy homogéneos en el paso a paso del mismo coincidiendo en un esquema básico de punción del animal, evaluación óptica del individuo y finalmente sacrificio de éste para análisis histológico. Los sitios de punción para realizar el trasplante en el individuo son variados pudiendo usar la vena de la cola del ratón(42) hasta la parte dorsal del cuello(43). La dosis suministrada es muy variable pero usualmente está entre 1×10^6 y 2×10^6 (40,43).

Los tiempos de observación suelen ser largos llegando incluso a sobrepasar los dos años(41), pero en algunos estudios se ha logrado obtener resultados en periodos más cortos como 120 días(44) o incluso entre 12-41 días(41). La evaluación histopatológica del tejido puede ser realizada con una simple tinción de hematoxilina-eosina pero también se pueden usar otros

métodos como el FACS o el ISH los cuales permiten determinar que, en el caso de formación de tumor, el origen sea las células madre implantadas en el individuo(41,43).

5.6. Buenas Prácticas de Manufactura

Es un sistema para garantizar que los productos que se generan, se controlan con los más altos estándares de calidad. Está diseñado para minimizar los riesgos involucrados en cualquier producción farmacéutica que no pueda eliminarse a través de la prueba del producto final. Las GMP cubren todos los aspectos de la producción, los materiales de partida, las instalaciones y el equipo, hasta la capacitación y la higiene personal. Los procedimientos detallados y escritos son esenciales para cada proceso que pueda afectar la calidad del producto terminado; es por ello que deben existir sistemas que proporcionen pruebas documentadas de los procedimientos correctos en cada paso del proceso de fabricación(45).

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1. Tipo de estudio

Descriptivo experimental.

6.2. Población de estudio

6.2.1. Universo

Cordón umbilical humano recolectado de mujeres entre 18 y 35 años, en estado de gravidez no complicada de 38 a 40 semanas de gestación.

6.2.2. Muestra

Células Estromales Mesenquimales multipotentes, aisladas de Gelatina de Wharton del cordón umbilical obtenidas de partos o cesáreas de mujeres entre 18 y 35 años, en estado de gravidez no complicada de 38 a 40 semanas de gestación que contratan servicio de criopreservación de sangre de cordón umbilical con Stem Medicina Regenerativa y/o mujeres gestantes que manifiesten su deseo de donar el tejido posterior al parto o cesárea entre octubre y diciembre de 2018.

6.3. Metodología

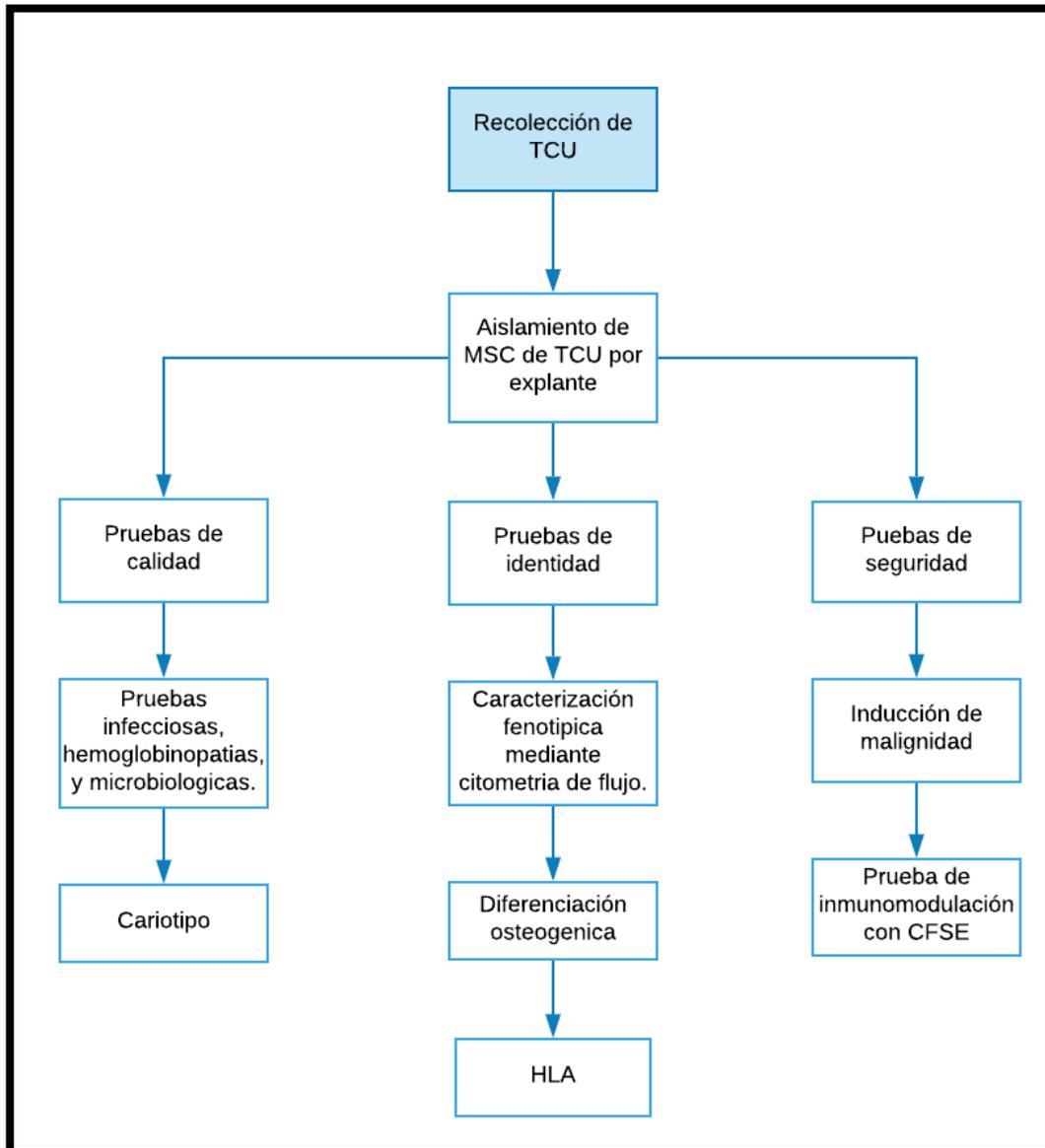


Figura 4. Plan técnico de trabajo.

6.3.1. Técnicas y procedimientos

✓ Selección de donantes

Para este estudio, se recolectaron 11 muestras de tejido de cordón umbilical obtenidas mediante donación altruista de mujeres gestantes sanas entre 38 y 40 semanas de gestación que contrataron servicio de criopreservación de sangre de cordón umbilical con Stem Medicina Regenerativa y aquellas que manifestaron su deseo de donar el tejido en las ciudades de Bogotá D.C., Cali y Barranquilla junto a los municipios de Facatativá y Ubaté (Cundinamarca). Todas las mujeres participantes conocieron previamente los objetivos por

los cuales se realizó el estudio y se firmó el consentimiento informado el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Riesgo de Fractura el día 08 de mayo de 2018, según Acta 002-05 y número de radicado 30707 en la ciudad de Bogotá (Anexo 1). Las IPS donde se realizó el muestreo fueron aquellas vinculadas a las EPS de los padres donantes.

Criterios de Inclusión:

- Participación voluntaria y con consentimiento informado correctamente diligenciado y firmado.
- Mujeres entre 18 y 35 años de edad
- Serología negativa para Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Hepatitis B o C y sífilis
- Ausencia de eclampsia, embarazos ectópicos, abortos o embarazos de alto riesgo según la valoración del ginecoobstetra.
- Ausencia de diabetes gestacional.
- Ausencia de resultados positivos para TORCH (Toxoplasma, Sífilis, Rubéola, Citomegalovirus, Herpes).
- Ausencia de enfermedades congénitas en embarazos previos.

Criterios de Exclusión:

- Mujeres con abuso de drogas, con historial de múltiples parejas e inestabilidad mental.
- Antecedentes de abortos espontáneos, edad gestacional temprana y mujeres gestantes mayores de 40 años.
- Presencia o historia previa de enfermedad maligna.
- Enfermedades de etiología desconocida como Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Crohn y enfermedades de origen autoinmune o del tejido conectivo (lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide).
- Presencia de síntomas de infección en el neonato
- Antecedentes maternos y/o paternos de enfermedad genética conocida.
- Cordones umbilicales con una longitud menor a 20 cm.
- Cordones umbilicales delgados (<1cm)

✓ Muestreo

El total de muestras de tejido de cordón umbilical fueron obtenidas entre octubre y diciembre de 2018. Cada procedimiento de recolección se llevó a cabo en el hospital y/o clínica de elección de los padres donantes y fue autorizado el ingreso por parte del centro médico del personal externo encargado de la recolección.

1. Recolección

- a. **Sangre de la madre:** De cada donante se tomaron muestras de sangre por venopunción, en condiciones de total esterilidad y en dos tubos, uno con anticoagulante EDTA para separar células nucleadas y uno seco para realizar pruebas infecciosas. Se realizó este procedimiento una vez canalizada la madre, antes de administrar la solución salina y se procuró llenar $\frac{3}{4}$ partes del tubo.
- b. **Antes del parto:** Se colocó todo el instrumental necesario en la sala de parto, pinzas, charola, gasas, guantes, iodopovidona y tubos Falcón con el medio de transporte.
- c. **Toma de sangre del cordón umbilical:** Inmediatamente después del alumbramiento el obstetra pinzó el cordón umbilical a ± 10 cm de distancia del ombligo y realizó un corte dejándolo listo para la recolección. Utilizando un tubo con anticoagulante EDTA el proveedor de atención médica tomó una muestra de sangre de cordón para posterior análisis de hemoglobinopatías y la determinación del Rh y grupo sanguíneo. Este procedimiento se realizó antes de ser expulsada la placenta.
- d. **Toma de tejido de cordón umbilical:** Después de extraída la sangre de cordón umbilical y de expulsada la placenta se procedió a aislar un segmento de 25 cm de cordón (lo ideal es que sea la parte más próxima a la placenta). Después de ubicado el segmento, con técnica aséptica se limpió el cordón con iodopovidona para descontaminarlo. El tercer paso fue realizar el corte del fragmento de cordón y colocarlo dentro del tubo cónico de 50 ml el cual contenía la solución de transporte (PBS+2%PSA). Se invirtió el tubo para asegurar que la solución cubriera todo el cordón y para verificar que estuviera libre de fugas de líquido. *Figura 5.*

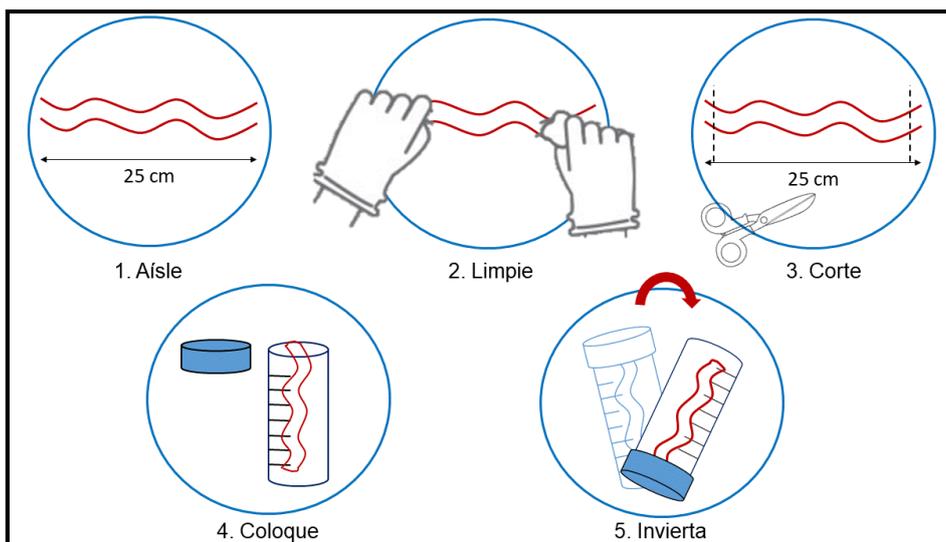


Figura 5. Procedimiento para la toma de muestra de TCU. 1. Aislamiento de fragmento de TCU de 25 cm, 2. Descontaminación de muestra con iodopovidona, 3. Corte del fragmento, 4. Fragmento de TCU dentro del medio de transporte y 5. Inversión del tubo.

Los pasos mencionados anteriormente se realizaron con ayuda del grupo especialista: médicos gineco obstetras, instrumentadoras quirúrgicas y enfermeras encargados del parto y/o cesáreas de las donantes.

2. Transporte

Después de la recolección todas las muestras fueron transportadas al banco de células STEM Medicina Regenerativa en un tiempo no mayor a 48 horas a 10°C y fueron almacenadas hasta su procesamiento a 4°C

✓ Aislamiento de células nucleadas (MSC) de tejido de cordón umbilical por método de explante

a. Desinfección del cordón

1. Se revisaron las condiciones de llegada del tejido de cordón, se verificó que el tubo no tuviera daños y el contenido de la solución de transporte.
2. A un segundo tubo con 20 ml solución de iodopovidona al 10% se pasó el tejido y se incubó por 4 minutos a temperatura ambiente dentro de la cabina de bioseguridad.
3. Completado el tiempo, se tomó con una pinza estéril el cordón y se pasó a un tercer tubo con PBS +1%, se agitó muy bien el tubo para eliminar los restos de yodo.

4. En un cuarto tubo con PBS+1% PSA se almacenó el tejido a 4°C hasta su procesamiento.

5. Se registró en la bitácora, fecha y responsable del lavado

b. Procesamiento del Tejido

6. Se verificó la identificación de la muestra y se asignó un código de trabajo.

7. Se lavó el cordón umbilical con solución de yodo durante 4 minutos, posteriormente se retiró el exceso con PBS.

8. Se midió la longitud y el diámetro del mismo. Además, se observaron las características físicas del cordón (color, aspecto, presencia de coágulos o hematomas) y se diligenció el dato en la bitácora de resultados.

9. Se cortó un fragmento de cordón y se almacenó a -80°C, identificándolo con código de muestra correspondiente.

10. Se cortó transversalmente el tejido para retirar los vasos (las 2 arterias y la vena), con ayuda de las pinzas, teniendo cuidado de no hacer cortes profundos.

11. Se lavó con PBS nuevamente para limpiar la sangre presente en el tejido.

12. Se retiró la mayor cantidad de gelatina de Wharton con ayuda de las pinzas y se cortaron fragmentos pequeños de aproximadamente 2 a 5 mm. Posteriormente se pesó la gelatina obtenida.

13. Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos y/o en cajas T75 (se distribuyeron homogéneamente en la superficie de la caja) 5 fragmentos por pozo. Las cajas se incubaron durante 30 min para permitir que el tejido se adhiriera al plástico, pasado el tiempo se agregó 2 ml de medio DMEM-LG en cada pozo y 7 ml en las cajas T75. Fueron incubadas en un ambiente de 5% de CO₂ y a 37°C durante 2 semanas o hasta alcanzar una confluencia >80% para proceder a realizar el pase celular. Se inspeccionaron las cajas cada 3 o 4 días y se realizó lavado y cambio de medio de cultivo.

c. Primer cambio de medio de cultivo día 3

16. Se preparó el volumen necesario de medio de cultivo para el cambio y se colocó en el baño serológico a 37°C.

17. Se retiraron las cajas de la incubadora y se revisaron bajo el microscopio evidenciando las condiciones de las células o contaminación. Además, se observaron las características morfológicas de las células mesenquimales las cuales son fusiformes y el % de confluencia; al comprobar su presencia se procedió a realizar el cambio del medio.

18. Utilizando una pipeta se extrajo el volumen de medio de cultivo de la caja, evitando despegar las células adheridas al plástico.

19. Luego se agregaron 2 ml y 7 ml de medio de cultivo a 37°C en las cajas de 6 pozos y en las cajas T75 respectivamente. Las cajas fueron incubadas nuevamente.

d. Segundo cambio de medio y posteriores

23. Se realizó el primer lavado con PBS y se agitó manualmente antes de descartar el PBS. Los lavados se realizaron de 1 a 3 dependiendo la suciedad de las cajas.

Nota: Se utilizó 1ml de PBS para cajas de 6 pozos, 2 ml para las cajas T25, 5ml para cajas T75 y 10 ml para las cajas T150.

19. Luego se agregó el medio de cultivo a 37°C y se regresaron las cajas en la incubadora.

Nota: La cantidad de medio que se agregó a cada una de las cajas fue el doble de ml de PBS utilizado para el lavado.

✓ Pruebas de identidad

a. Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo

La identificación de los marcadores de superficie se llevó a cabo en Stem Medicina Regenerativa con un citómetro de flujo BD FACS Canto II usando el Kit de Análisis de MSC Humanas (BD Stemflow™), y los anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos: CD90 FITC, CD105 PerCP-Cy™5.5 (Endoglin), CD73 APC.

b. Determinación de HLA

La determinación de HLA de baja resolución se realizó en el Campus biomédico de la Clínica Universidad de La Sabana mediante extracción de ADN y posterior ejecución de la técnica de PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa a partir de viales de 2×10^6 células conservados en tubos eppendorf a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. La lectura del gel de agarosa se realizó en el equipo Bio Rad Gel DocTM XR + controlado por el software Image LabTM.

c. Diferenciación osteogénica

• Preparación de medio de cultivo

El medio se preparó cada semana para evitar cambios en el pH. Para las MSC en tercer pase, se prepararon 20 ml para 3 pozos con 2 cambios por semana. Para la preparación del medio se utilizó medio DMEM bajo en glucosa suplementado con lisado de plasma rico en plaquetas al 20% (LPRP), beta glicerol, ácido ascórbico y dexametasona.

• Inducción a la diferenciación osteogénica

a. Se sembraron las Células Madre Mesenquimales de los 3 lotes obtenidos, cada uno en placas de 6 pozos hasta obtener entre el 80- 100 % de confluencia.

b. Se realizó el cambio de medio DMEM suplementado por medio de diferenciación osteogénica en 3 de los 6 pozos, en los tres pozos restantes se adiciono medio DMEM bajo en glucosa sin suplementar con el objetivo de mantener la celularidad estable (pозos control).

c. Se incubó a 37°C con 5% de CO_2 durante 4 semanas, realizando cambio de medio y observación de las placas 2 veces por semana.

d. A la semana 4 se realizaron las tinciones de los pozos control y en los pozos con medio de diferenciación osteogénica se realizó tinción de Von Kossa para la identificación de depósitos de calcio y Fosfatasa Alcalina para la demostración histoquímica de la actividad de la enzima.

• Tinción de Von Kossa y Fosfatasa Alcalina

Se realizó tinción de Von Kossa después de 4 semanas de someter las células en medio de diferenciación osteogénica. Esta se llevó a cabo con nitrato de plata al 5% y exposición de las células a luz UV durante 3 horas. La tinción de fosfatasa Alcalina se realizcon el Kit comercial 86R de Sigma Aldrich donde las células fueron fijadas con citrato-acetona-formaldehído al 37%, lavadas con agua desionizada y coloreadas con sal de diazonio,

solución FRV alcalina Base de Fast Red Violet LB 5 mg/mL y solución de naftol AS-BI fosfato 4 mg/mL. La contratincción se llevó a cabo con solución de hematoxilina de Gill N°3 y fueron observadas bajo microscopio invertido.

✓ **Pruebas de calidad**

d. Pruebas infecciosas, hemoglobinopatías y pruebas microbiológicas

Los estudios de las pruebas infecciosas realizadas a las madres donantes se remitieron a Delta laboratorio, el análisis de hemoglobinopatías se realizó en Pregon Colombia a partir de sangre de cordón umbilical y los cultivos microbiológicos para aerobios y anaerobios, hongos, Mycoplasma y endotoxinas de los lotes llevados a cultivo se realizaron en Idime a partir de sobrenadante de medio de cultivo. Las pruebas mencionadas anteriormente fueron contratadas por Stem Medicina Regenerativa y costeadas en su totalidad por Cryo Holdco Latam.

e. Cariotipo

El estudio cromosómico en cariotipo convencional y alta resolución se remitió al Centro De Diagnóstico de Genética Humana Y Reproductiva Genetix a partir de células en medio de cultivo. Las células fueron cultivadas para posteriormente adicionar colchicina y detenerlas en metafase antes de la tripsinización. Luego las células fueron cosechadas con solución hipotónica y fijadas con solución Carnoy; a las láminas portaobjetos se les realizó tinción de Bando G. Se realizó la lectura entre 4-15 metafases y el cariograma para descartar cualquier tipo de anormalidad tanto numérica como estructural en los cromosomas.

✓ **Pruebas de seguridad**

f. Capacidad inmunomoduladora con técnica con CFSE

Este ensayo se desarrolló en Stem Medicina Regenerativa con el objetivo de determinar si las Células Madre Mesenquimales (CMM) tienen la capacidad de suprimir la respuesta inmune de células mononucleares. La obtención de células mononucleares se realizó a partir de sangre anticoagulada con EDTA mediante gradientes de densidad con Ficoll Hypaque con una concentración de 1×10^6 cel/ml, posteriormente se realizó marcaje de las células con éster de

succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) usando el kit Cell Trace™ CFSE Cell Proliferation Kit, for flow cytometry de Thermo Fisher Scientific (*Figura 6*).

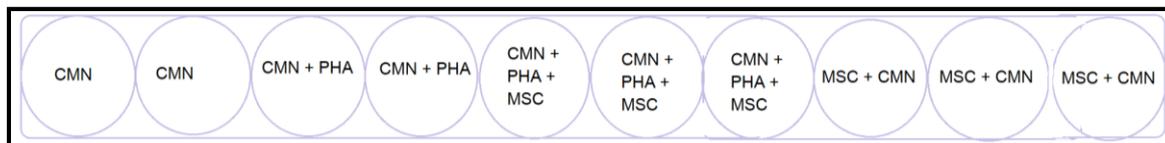


Figura 6. Esquema del montaje de ensayo de inmunomodulación con CFSE.

g. Inducción de malignidad

Los procedimientos realizados se llevaron a cabo en el Instituto Nacional de Salud (INS) bajo la supervisión y asesoría científica del personal del INS. El objetivo de este ensayo fue verificar la formación de malignidad inducida por células estromales Mesenquimales multipotentes de gelatina de Wharton en ratones BALB/c. El procedimiento hizo uso de 5 ratones Balb/c hembras, 3 lotes de Células Madre Mesenquimales obtenidas de Gelatina de Wharton y Línea transformada HeLa. Este servicio fue subcontratado por Stem Medicina Regenerativa y costado por Cryo Holdco Latam.

• Procedimiento

1. Se obtuvieron 5 ratones BALB/c de 6 semanas de vida con un peso promedio de 20 g, a los cuales se les realizó acondicionamiento previo durante 4 días.
2. Se determinó el peso de cada individuo y las características físicas.
3. Semarcaron los ratones de la siguiente manera (apoyado por equipo del bioterio).
 - a. Lote 1 CMSCTGWCUE-001 (1 línea en la cola)
 - b. Lote 2 CMSCTGWCUE-002 (2 líneas en la cola)
 - c. Lote 3 CMSCTGWCUE-003 (3 líneas en la cola)
 - d. Control positivo (4 líneas en la cola)
 - e. Control negativo (5 líneas en la cola)

• Inoculación

A los ratones 1,2 y 3 se les administró por vía intraperitoneal 0,5 ml de células MSC 1×10^6 suspendidas en Solución salina isotónica con 5% de Albúmina Humana. (*Figura 7*). Al

control negativo se le administró 0,5 ml de Solución salina isotónica con 5% de Albúmina Humana y al control positivo se le administró 0,5 ml de células HELA 1×10^6 suspendidas en solución salina.



Figura 7. Inoculación de las MSC al ratón Balb/c por medio de punción intraperitoneal. Tomada el 13 de marzo de 2019 en Instituto Nacional de Salud.

4. Se realizó seguimiento a los animales un día a la semana, tomando nota de la apariencia física, peso, cambios en la postura, presencia de diarrea, hemorragia, color y brillo del pelo, entre otros durante 30 días.
5. Se realizó eutanasia del animal mediante anestesia para realizar evaluación macroscópica del hígado y cuello uterino.

7. RESULTADOS

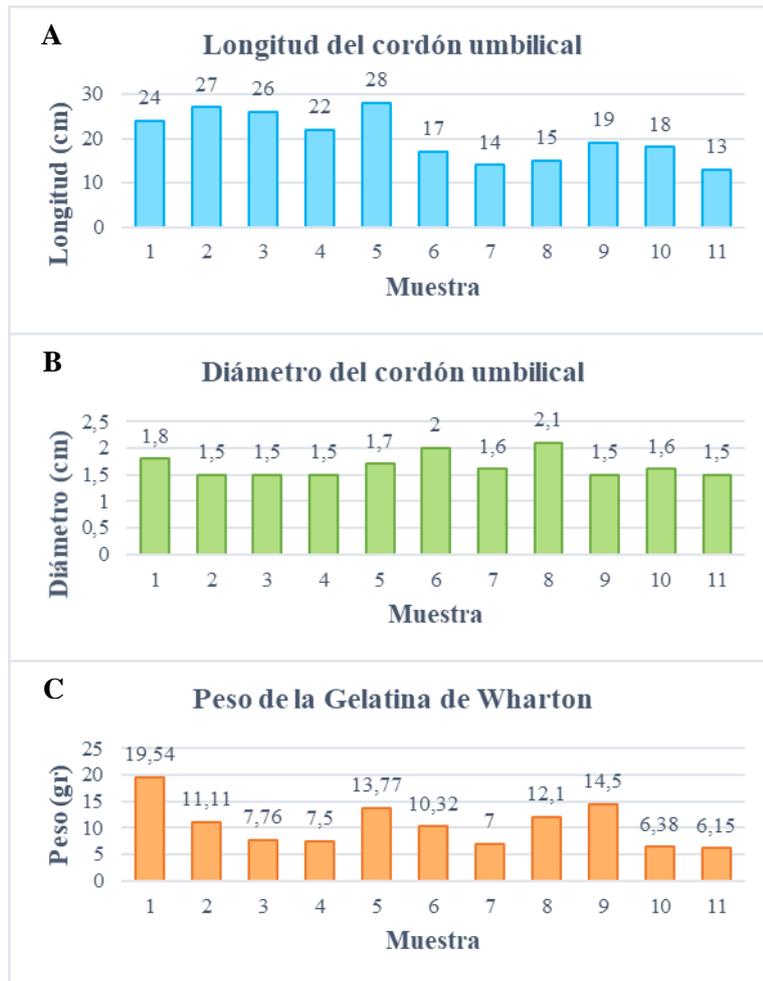
7.1. Obtención y selección de las muestras

Entre octubre y diciembre de 2018 se recolectaron 11 cordones previa firma del consentimiento informado por parte de los padres, 11/11 cordones recolectados cumplieron con los criterios de inclusión relacionados a la Historia Clínica y la valoración por el médico en donde las madres fueron consideradas clínicamente sanas. Los cordones fueron transportados al laboratorio de Stem Medicina Regenerativa antes de cumplidas 24 horas del nacimiento del bebe. 5/11 (45,5%) presentaban color blanco, 4/11 (36,3%) color rosado, 1/ 11 (9%) color amarillo y 1/11(9%) color blanco y rosado (*ver figura 8*). De las 11 muestras recolectadas se obtuvo un promedio de longitud de cordón de 20,27 cm con un rango comprendido entre 13 -24 cm. El promedio de diámetro de los cordones fue de 1,6 cm en un rango comprendido entre 1,5-2,1 (*ver grafica 1*).

De acuerdo a los criterios de inclusión iniciales, longitud ≥ 20 cm, diámetro ≥ 1 cm y peso de la gelatina de Wharton ≥ 7 grs, se demostró que 5/11 muestras (45.4%) no cumplieron los parámetros y por lo tanto fueron excluidas del estudio (*ver Tabla 2*).

Tabla 2. Descripción de las características físicas de las muestras de tejido de cordón umbilical recolectadas.

Muestra	Longitud (cm)	Color	Diámetro (cm)	Aspecto-Apariencia	Peso WJ (gr)
1	28	Rosado	1,7 cm	Semientorchado, presencia de coágulos	13,77 g
2	24	Blanco	1,8cm	Gelatinoso, con coágulos	19,54 g
3	26	Blanco	1,5 cm	Entorchado, con coágulos	7,76
4	27	Rosado	1,5 cm	Semientorchado, con hematomas y coagulos	11,11 g
5	22	Blanco/Rosado	1,5 cm	Plano, sin hematomas	7,5 g
6	14	Blanco	1,6 cm	Semientorchado, sin coágulos	7,0 g
7	17	Rosado	2,0 cm	Semientorchado, con coágulos	10,32 g
8	15	Amarillo	2,1 cm	Entorchado, con segmentos cristalinos	12,1 g
9	19	Rosado	1,5 cm	Entorchado, con coágulos	14,5 g
10	18	Blanco	1,6 cm	Semientorchado, sin coágulos	6,38 g
11	13	Blanco	1,5 cm	Entorchado, sin coágulos	6,15 g



Gráfica 1. Características físicas de las muestras de tejido de cordón umbilical. A) Longitud del cordón umbilical. B) Diámetro del cordón umbilical y C) Peso de la Gelatina de Wharton. Se presentan las diferencias encontradas al comparar las características iniciales de los 11 cordones recolectados, donde el 45,4% de las muestras presentaron valores inferiores a 20 cms de longitud y menores a 7 grs de WJ; motivo por el cual fueron descartadas del estudio.

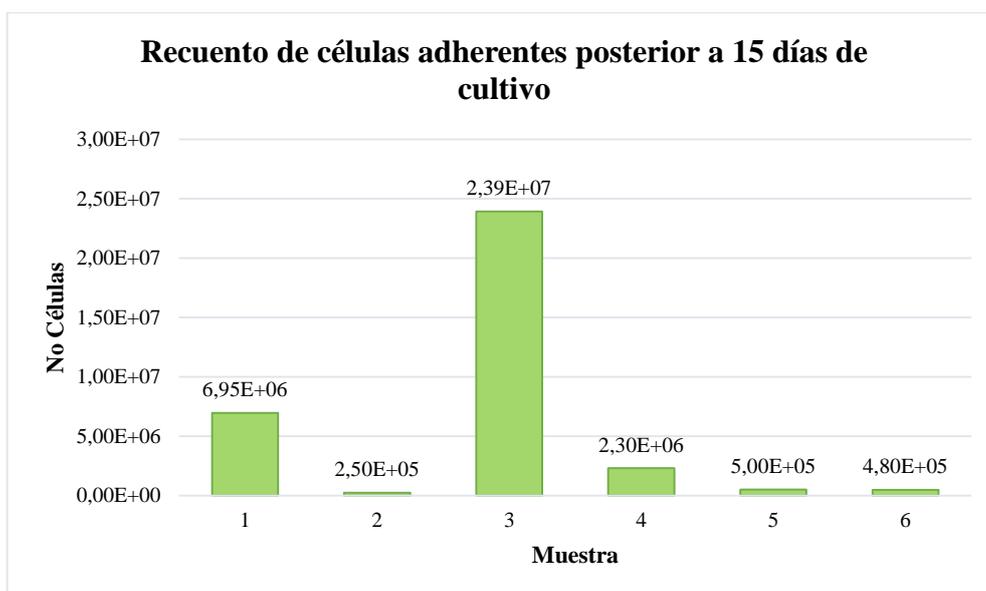


Figura 8. Aspecto físico de las muestras de cordón umbilical. A) Cordón umbilical de color rosado semientorchado, con coágulos y hematomas. B) Se observa un cordón umbilical de color blanco y rosa, plano y

sin hematomas. C) Cordón umbilical rosado y plano. D) Cordón umbilical semientorchado, blanco, con coágulos.

Las 6 muestras restantes fueron sometidas a cultivo en medio Mínimo Modificado de Dulbecco (DMEM) bajo en glucosa suplementado con LPRP 10%+1% PSA durante 15 días. El 50% de las muestras (3/6) que fueron sometidas a cultivo cumplieron con el criterio de crecimiento celular ($>2 \times 10^6$ células adherentes) y el 50% restante fueron desechadas por no cumplir con éste requisito (*Ver gráfica 2*). El tiempo de procesamiento desde la hora de parto y/o cesárea hasta la llegada al laboratorio para la muestra 1 fue de 24 h 54 min, para la muestra 2 de 20 h 05 min, para la muestra 3 de 19 h 46 min, la muestra 4 con un tiempo de procesamiento de 10 h 50 min, la muestra 5 se procesó a las 57,24 horas y la muestra 6 a las 22 horas. *Ver tabla 3*.

Las muestras que fueron óptimas para el cultivo fueron nombradas como Lote 1, 2 y 3 según el orden de procesamiento de las muestras. *Ver tabla 4*.



Gráfica 2. Recuento de células adherentes posterior a 15 días de cultivo. Se observa que las muestras 1, 3 y 4 tienen un recuento celular $> 2 \times 10^6$ células, al comparar las tres muestras se evidencia que la muestra 3 se expandió rápidamente alcanzando un valor de 23.925.000 células después de 15 días de cultivo. Las muestras restantes (2, 5 y 6) muestran un recuento celular inferior a lo estimado, por tanto, son excluidas del estudio.

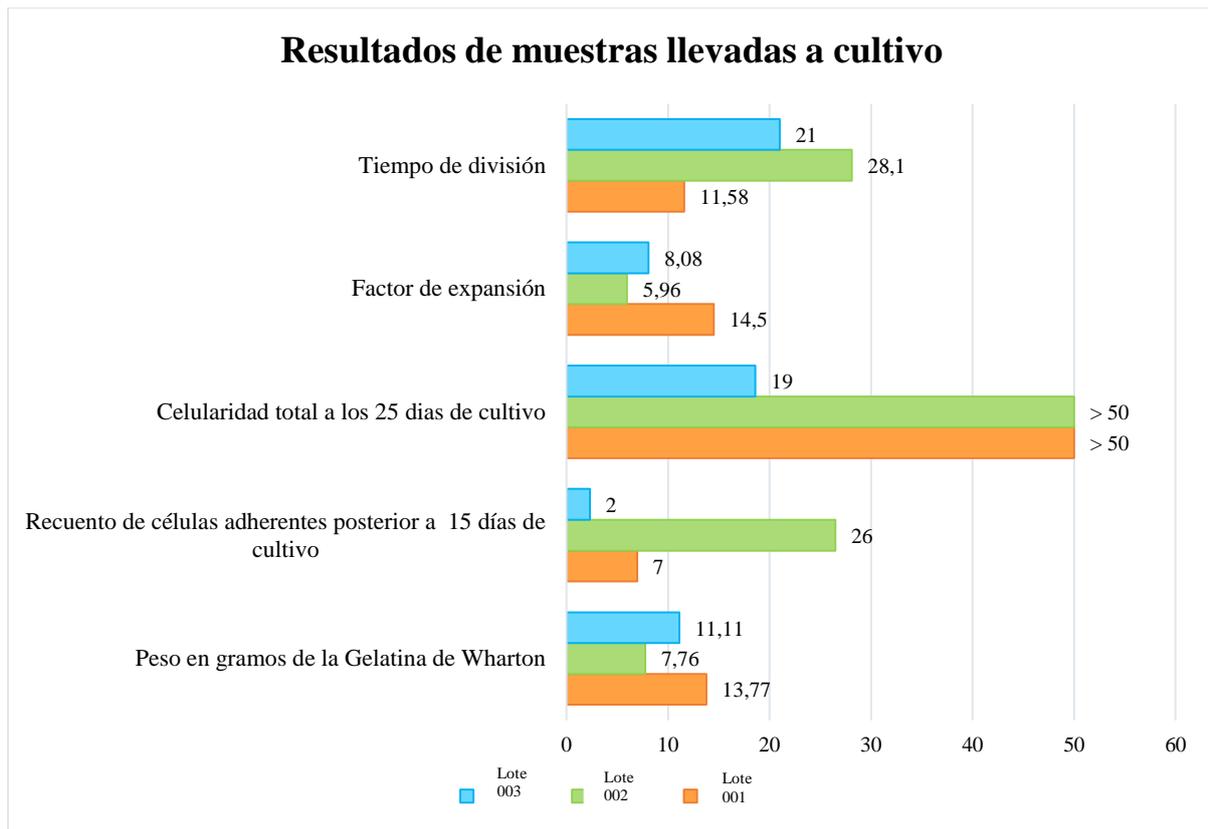
Tabla 3. Tiempo de procesamiento de las muestras llevadas a cultivo.

Número de muestra	Fecha de nacimiento	Fecha de procesamiento	Hora de parto	Hora de procesamiento	Tiempo de procesamiento en horas
1	1 octubre de 2018	2 de octubre de 2018	14:36	15:30	24:54
2	03 de octubre de 2018	04 de octubre de 2018	11:55	16:00	20:05
3	3 de octubre de 2018	4 de octubre de 2018	18:14	14:00	19:46
4	17 de octubre de 2018	17 de octubre de 2018	4:10	15:00	10:50
5	24 de octubre de 2018	26 de octubre de 2018	6:36	16:00	57:24:00
6	13 de noviembre de 2018	14 de noviembre de 2018	14:30	16:30	22:00

Tabla 4. Características de los lotes celulares. Lote 001, 002 y 003.

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

Se realizó cultivo celular por un promedio de 25 días en total, los lotes celulares debían obtener un recuento $\geq 50 \times 10^6$ células para ser congelados. El lote 3 no cumplió con este requisito por lo cual se descarta (*ver grafica 3*).



Gráfica 3. Datos de número de divisiones, factor de expansión, recuento de CMN y peso en gramos de la GW posterior a 25 días de cultivo de los tres lotes seleccionados inicialmente.

7.2. Caracterización morfológica de las MSC obtenidas de cultivo

Para evaluar el rendimiento y el crecimiento de las células MSC de GW de los lotes llevados a cultivo, las células se sembraron en DMEM bajo en glucosa suplementado con lisado de plasma rico en plaquetas (LPRP). Se observaron pequeñas colonias de células adherentes en forma de huso que emitían prolongaciones, después de 8 días de cultivo y una confluencia de 80% a los 15 días de cultivo para ambos lotes celulares (*Ver figura 9*).

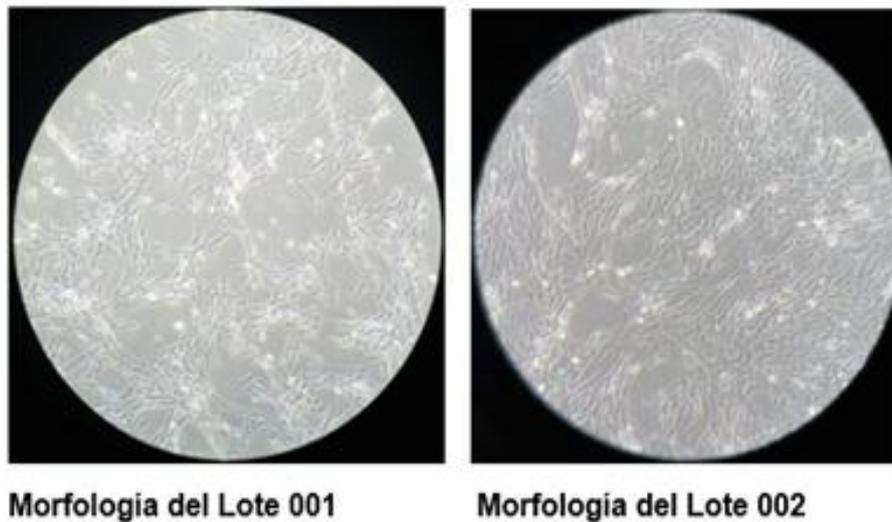


Figura 9. Morfología de los lotes celulares. Se observaron células adherentes con morfología de MSC después de 10 días de cultivo y una confluencia de 80% a los 15 días de cultivo para ambos lotes celulares (Lote 001-Lote 002).

7.3. Crio preservación de los lotes

Para el lote 1 se congelaron un total de 48 viales, con un recuento total mayor a 50×10^6 y una viabilidad de 96,03%, para el lote 2 se congelaron 77 viales se con un recuento mayor de 50×10^6 células con una viabilidad de 97,52%.

- **Identificación de los lotes**

La identificación de los lotes se realizó de acuerdo a las directrices de la Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios sobre la nomenclatura de las sustancias activas de los medicamentos en investigación de terapia avanzada que contengan células (Versión 2 fecha de publicación: 4 de septiembre de 2013) de la siguiente manera:

1. Clase de producto: C (células)
2. Tipo de células: MSC (Mesenquimales)
3. Estado de diferenciación: Estado de diferenciación Troncales T
4. Procedencia: Adultas A
5. Relación con el paciente: alogénicas A
6. Origen anatómico: gelatina de Wharton GW
7. Manipulación: Expandidas E.

Siguiendo las pautas descritas anteriormente, los lotes del estudio fueron renombrados a CMSCTAAGWE-Cryoholdco-001 y CMSCTAAGWE-Cryoholdco-002 antes Lote 001 y Lote 002 respectivamente. Se utilizaron 5 viales por cada lote celular, para realizar las pruebas de caracterización e identidad celular, perfil de seguridad, ensayo de inmunomodulación e inducción de malignidad.

✓ Pruebas de identidad

7.4. Fenotipificación

La identidad celular fue analizada por fenotipo y potencial de diferenciación: Las MSC de GW de los lotes seleccionados, fueron tipificadas utilizando marcadores de superficie, se observó la expresión de CD90, CD73 y CD105 en 99,4% para el Lote 001 y en 97,7% para el Lote 002, y ausencia para otros marcadores (característicos de otras líneas celulares) CD34 y CD45 en 2,4% y en 1,2% para el Lote 001 y Lote 002 respectivamente. Con base en este fenotipo, se comprobó la presencia de una población con características inmunofenotípicas de célula mesenquimal según los criterios establecidos por la ISCT (*Figura 10, 11*).

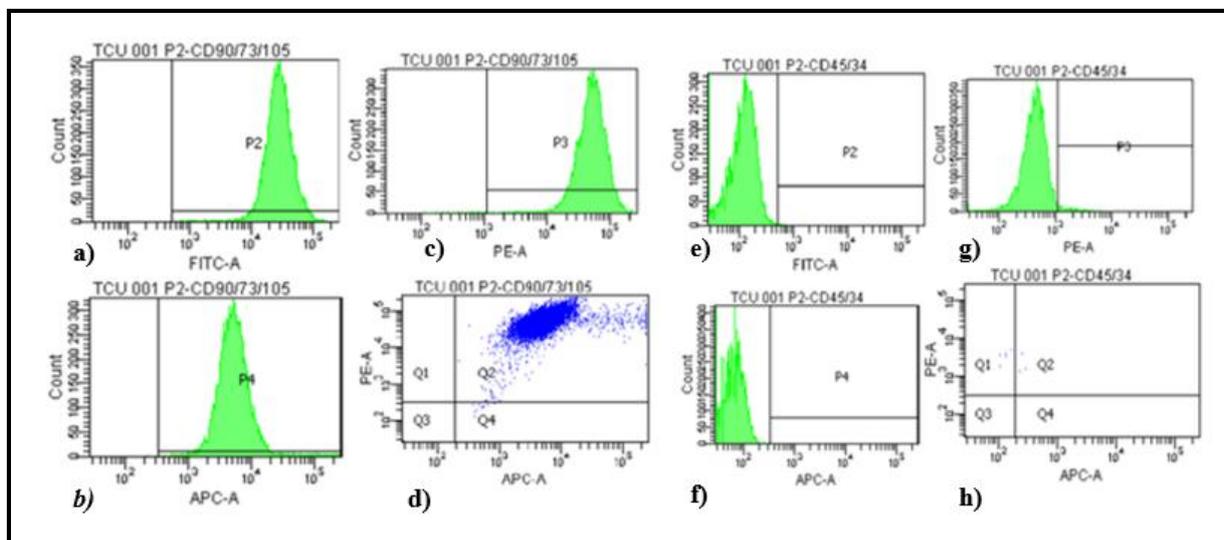


Figura 10. Citometría de flujo del lote 001. Resultados de citometría de flujo con diferentes fluorocromos: a) CD73/CD105/CD90 con FITC-A, b) CD73/CD105/CD90 con APC-A, c) CD73/CD105/CD90 con PE-A. Se observa en las tres figuras la positividad de los marcadores en puntos mayores a 10^3 , lo que genera una distribución de los eventos hacia la derecha. d) CD73/CD105/CD90 con APC –A en donde se muestra la distribución por cuadrantes de los eventos analizados siendo el cuadrante Q2 el cuadrante positivo para los tres

marcadores. E) CD45/CD34 con FITC-A, f) CD45/CD34 con APC-A, g) CD45/CD34 con PE-A, en éstas se muestra la negatividad de los marcadores en puntos menores a 10^2 , observándose una frecuencia de eventos en la parte izquierda del gráfico. h) Se observa la distribución por cuadrantes de los eventos analizados siendo el cuadrante Q2 el cuadrante positivo para los dos marcadores, el resultado indica que en la muestra analizada los marcadores CD45/34 son negativos.

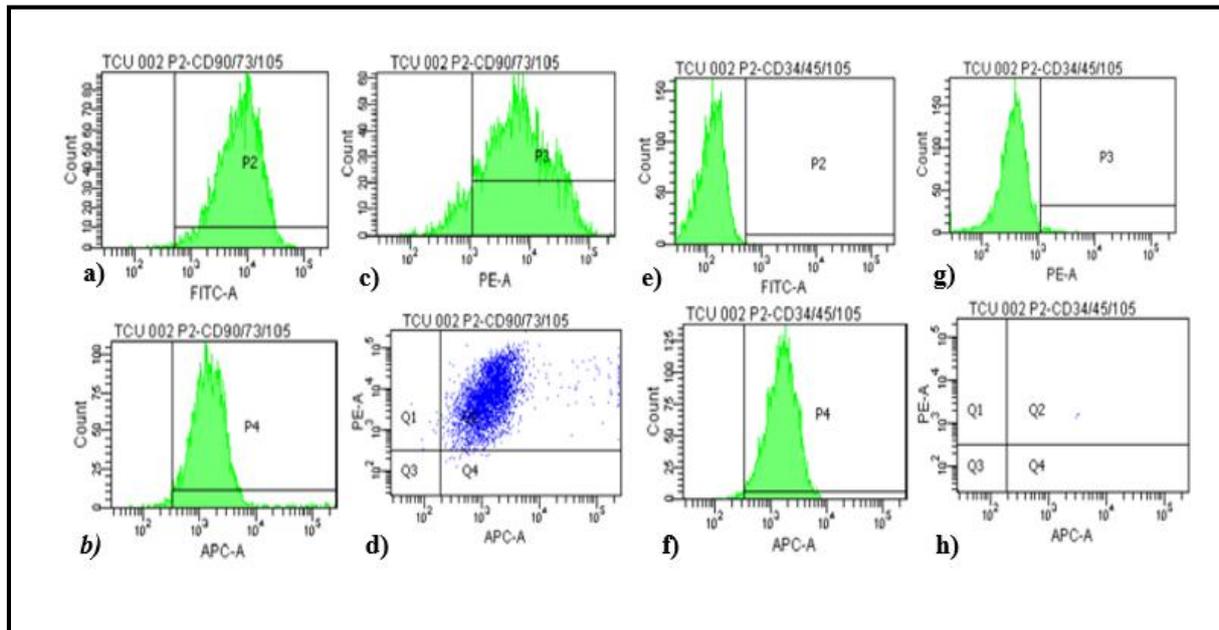


Figura 11. Citometría de flujo del lote 002. Citometría de flujo del lote 001. Resultados de citometría de flujo con diferentes fluorocromos: a) CD73/CD105/CD90 con FITC-A, b) CD73/CD105/CD90 con APC-A, c) CD73/CD105/CD90 con PE-A, se observa en las tres figuras la positividad de los marcadores en puntos mayores a 10^3 , lo que genera una distribución de los eventos hacia la derecha. d) CD73/CD105/CD90 con APC –A en donde se muestra la distribución por cuadrantes de los eventos analizados siendo el cuadrante Q2 el cuadrante positivo para los tres marcadores. E) CD45/CD34 con FITC-A, f) CD45/CD34 con APC-A, g) CD45/CD34 con PE- en éstas se muestra la negatividad de los marcadores en puntos menores a 10^2 , observándose una frecuencia de eventos en la parte izquierda del gráfico. h) Se observa la distribución por cuadrantes de los eventos analizados siendo el cuadrante Q2 el cuadrante positivo para los dos marcadores, el resultado indica que en la muestra analizada los marcadores CD45/34 son negativos.

7.5. Diferenciación osteogénica

Después de 3 semanas de cultivo bajo estímulos osteogénicos, las MSC mostraron características morfológicas osteogénicas típicas en ambos lotes celulares (*Ver figura 12*). La capacidad de las células para diferenciarse al linaje osteogénico se evaluó mediante cultivos

de diferenciación, osteoblastos teñidos de azul para actividad de fosfatasa alcalina (*Figura 13*) y depósitos de calcio teñidos oscuros para tinción de Von Kossa (*Figura 14*).

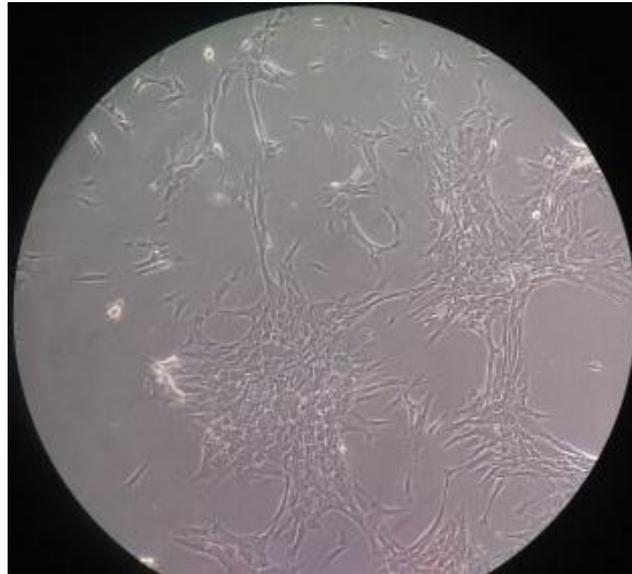


Figura 12. Semana 3 post sometimiento a medio de diferenciación osteogénica. Se observa un cambio en la morfología típica de las Células Mesenquimales.

- **Actividad de la fosfatasa alcalina**

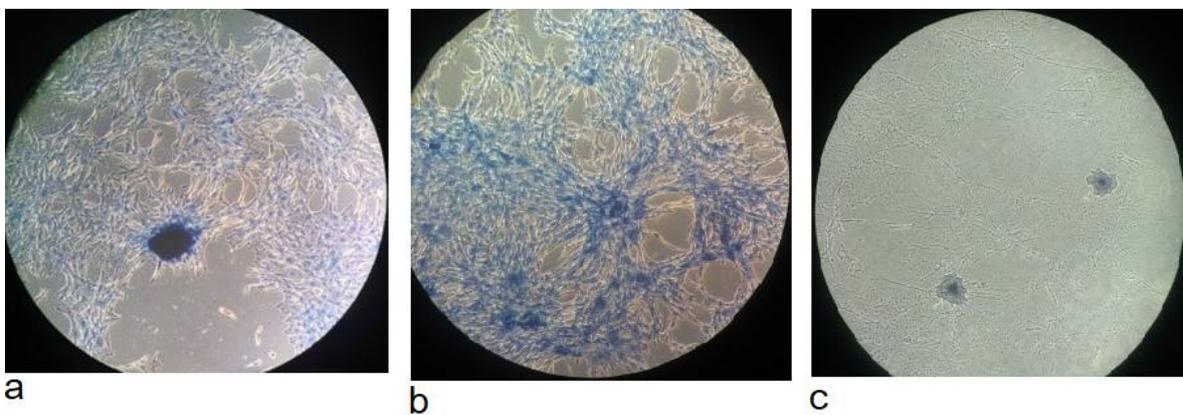


Figura 13. Coloración de fosfatasa alcalina posterior a 4 semanas después de inducir a las células a diferenciación ósea, a) Lote 001 b) lote 002 c) Control negativo (MSC sin medio de diferenciación ósea). Magnificación 10X.

- **Tinción de Von Kossa**

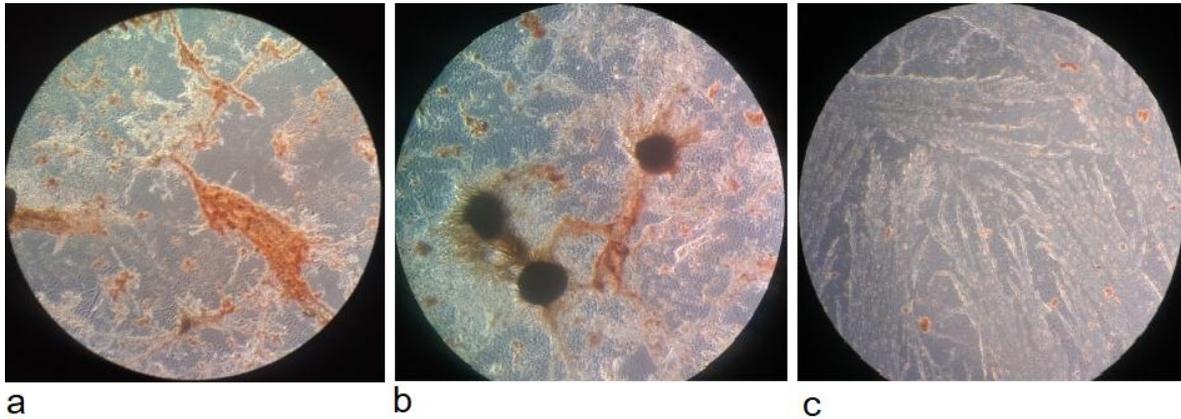


Figura 14. Coloración de Von Kossa posterior a 4 semanas después de inducir a las células a diferenciación ósea, a) Lote 001 b) lote 002 c) Control negativo (MSC sin medio de diferenciación ósea). Magnificación 10X.

7.6. HLA

Se identificaron los alelos en baja resolución de los HLA de los dos lotes.

- CMSCTAAGWE-Cryoholdco-001: HLA A*02, A*03, B*35 B*51 DRB1*04 DRB1*15
- CMSCTAAGWE-Cryoholdco-002: HLA A*03, A*26, B*76(15) B*39 (16) DRB1*16 DRB5*51

✓ Perfil de calidad

7.7. Cariotipo

Para descartar cualquier anomalía y efectos sobre la estabilidad genética de las células se determinaron los cariotipos en bandeado G de los dos lotes celulares cuyo recuento celular fue $\geq 50 \times 10^6$ células (CMSCTAAGWE-Cryoholdco-001 y CMSCTAAGWE-Cryoholdco-002), 2/2 (100%) de los cariotipos realizados mostraron patrones inalterados con un complemento cromosómico masculino normal en todas las metafases analizadas (*Figura 15*).

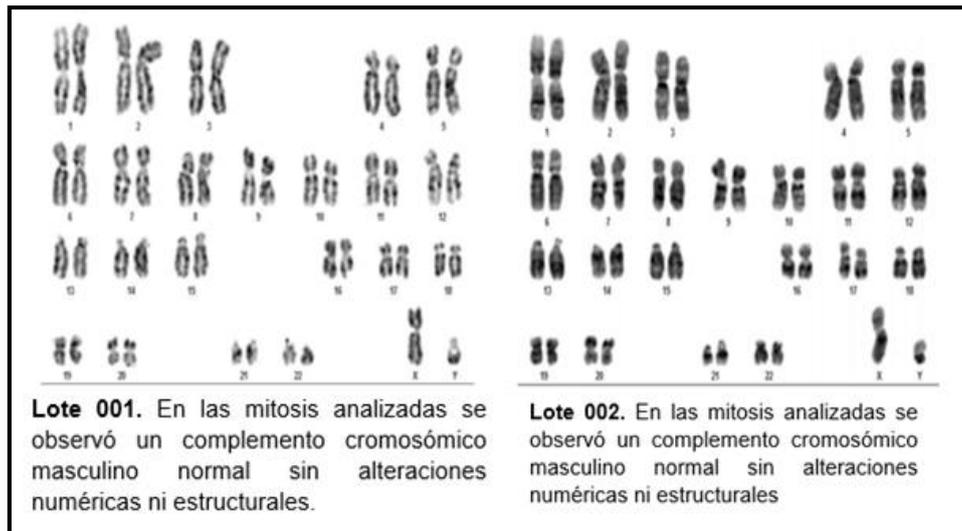


Figura 15. Análisis de bandas G de los lotes 001 y 002 de MSC de GW cariotipo normal $2n=23$, cromosomas autosómicos y sexuales.

7.8. Pruebas microbiológicas

Las pruebas microbiológicas se realizaron como control de calidad para evaluar el proceso de recolección y procesamiento de los lotes llevados a cultivo celular; éstas se hicieron a partir de sobrenadante de medio de cultivo. El resultado de la identificación microbiológica fue negativo para mycoplasma, endotoxinas, microorganismos aerobios, anaerobios y hongos para las muestras analizadas (CMSCTAAGWE-Cryoholdco-001 y CMSCTAAGWE-Cryoholdco-

✓ Perfil de seguridad

7.9. Inducción de malignidad

De las características físicas evaluadas, el peso fue la que presentó variaciones durante el tiempo del ensayo. En la *Tabla 5* se observan los resultados del peso de los 4 ratones BALB/C de 6 semanas de edad. El protocolo y todos los procedimientos en los ratones fueron aprobados por Comité de Cuidado Animal del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Los ratones fueron mantenidos en jaulas de policarbonato y las instalaciones contaban con temperatura controlada ($22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$), 40-65% de humedad y un ciclo de luz / oscuridad de 12 h, alimentados con una dieta de laboratorio estándar y se permitió el acceso agua potable.

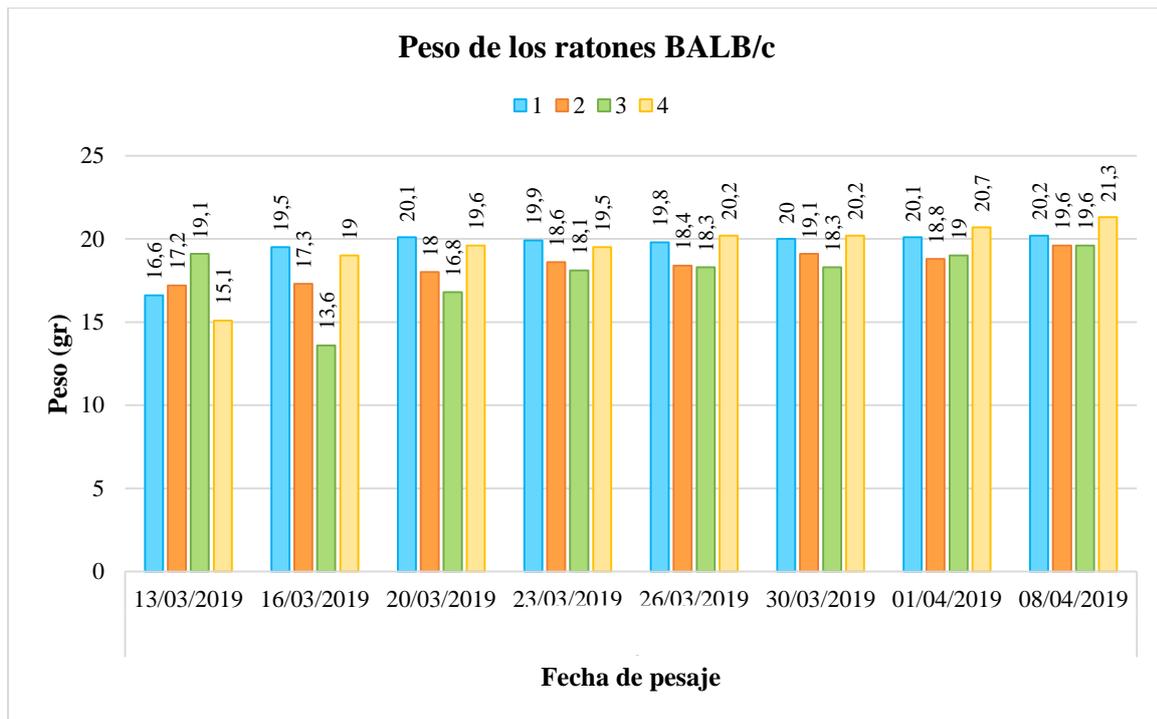
Tabla 5. Peso semanal de los ratones BALB/c.

	Ratón	PESO EN GRAMOS							
		13/03/19	16/03/19	20/03/19	23/03/19	26/03/19	30/03/19	01/04/19	08/04/19
Lote 001	1	16,6	19,5	20,1	19,9	19,8	20	20,1	20,2
Lote 002	2	17,2	17,3	18	18,6	18,4	19,1	18,8	19,6
Control +	3	19,1	13,6	16,8	18,1	18,3	18,3	19	19,6
Control -	4	15,1	19	19,6	19,5	20,2	20,2	20,7	21,3

Al día 30 de la inoculación, previo al proceso de sacrificio, se observó la formación de un abultamiento con consistencia semiblanda e indolora en el dorso del Ratón No. 3 (control positivo) próximo al tallo de la cola. Posterior a la eutanasia, mediante la valoración macroscópica de los órganos, se vislumbran las siguientes observaciones (*ver Figura 16*):

- ✓ Hígado: Este órgano en el Control positivo presenta formación de diminutos puntos amarillentos por toda la superficie del mismo, mientras que en el resto de individuos el color se mantiene rojo cobrizo, señas de un hígado sano.
- ✓ Ovario y Cuello Uterino: en el Control positivo, estos órganos presentan un tono más pálido comparado con sus pares en el resto de individuos. Unido a esto, la consistencia de estos órganos es blanda con aspecto gelatinoso, mientras que en los otros individuos estos órganos presentaban una mayor solidez.

Según el concepto de la veterinaria que acompañó el proceso, con respecto a la valoración del Cuello Uterino, el color de este órgano en Control positivo no obedece a cambios hormonales ya que, durante el control interno de los murinos a través de citologías seriadas, se concluyó que las ratones no estaban próximas ni durante el proceso de menstruación.



Gráfica 4. Peso de los ratones. La grafica esta distribuida por las fechas en las que se pesaron los ratones. La barra azul corresponde al peso en gramos obtenido en el ratón al que se inoculoel Lote 001: se observa un aumento de peso de 3,6 gr desde la primera medición a la ultima el 08 de abril de 2019; la barra naranja corresponde al ratón al que se inoculo el Lote 002: en éste se observa un aumento de peso de 2,4 gramos; la verde corresponde al ratón inoculado con células Hela en el que se observa una pérdida de 5,5gramos en tan solo 3 días, posterior a esto se observa una ganancia de peso 4,4 gramos respecto al peso de la medición dos y un total de ganancia de 6 gramos. La barra amarilla corresponde al ratón inoculado con solución salina, es decir el control negativo, en el que se observa una ganancia de 6,2 gramos.

Se infiere entonces que las MSC, tanto del Lote 001 y 0002, no inducen malignidad en ratones Balb/c inmunocompetentes de 6 semanas de edad en 30 días de exposición.

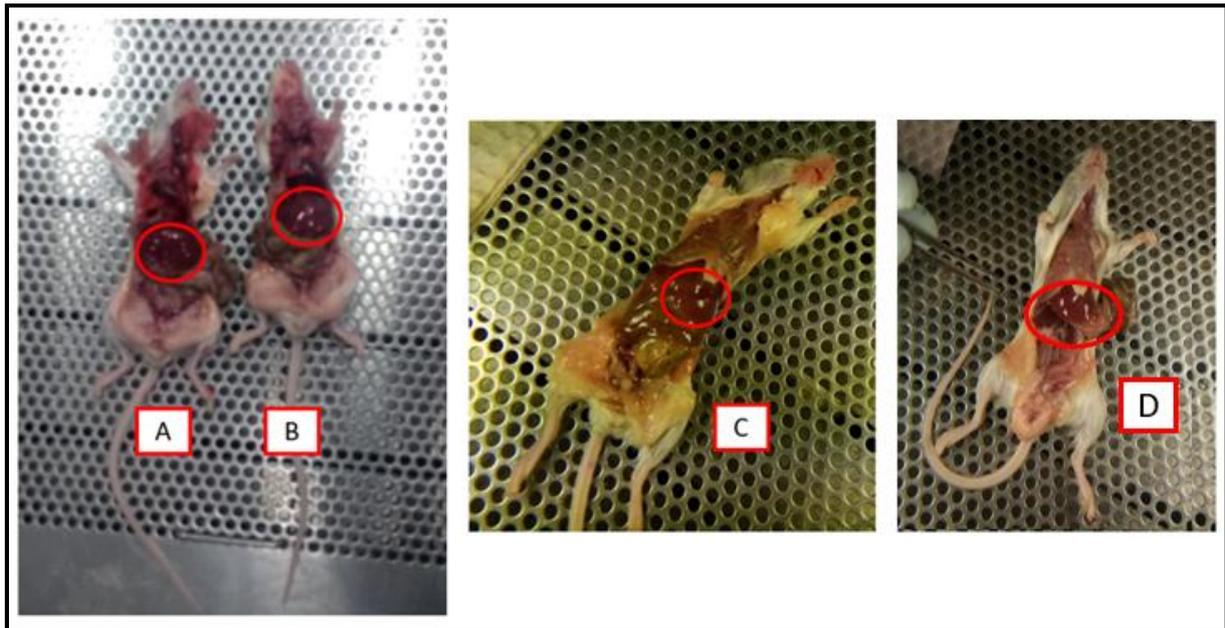
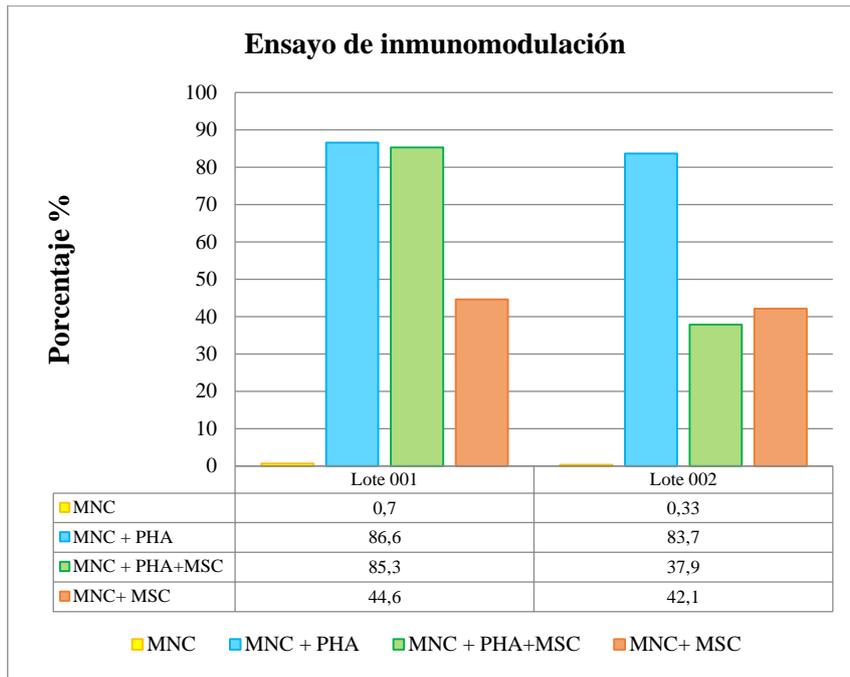


Figura 16. Comparación de las biopsias de los ratones. Hígado del Control positivo (A) frente al Control Negativo (B) y los Lotes 001 (C) y 002 (D). Se observa que el Hígado del Control positivo presenta un patrón puntiforme por toda la superficie del órgano lo cual, unido al abultamiento dorsal de este individuo, permite inferir que hubo inducción de malignidad. Al estar ausente estos fenómenos en el resto de individuos, el dictamen es más alentador.

7.10. Ensayo de inmunomodulación

Se realizó el ensayo de inmunomodulación con el fin de evaluar la capacidad de las MSC para inmunosuprimir células mononucleares. Se encontró que el lote CMSCTAAGWE-Cryoholdco-001 no disminuyó la proliferación de los MNC en presencia de PHA con un porcentaje de proliferación del control positivo del 85,3% y en la prueba con MSC de 1,3%. Para el lote CMSCTAAGWE-Cryoholdco-002, se observó una inhibición de la proliferación en un 45.2% en presencia del mitógeno, siendo el control positivo 83,7%. *ver figura 17 y grafica 5.*



Gráfica 5. Promedio de cada uno de los ítems del ensayo de inmunomodulación.

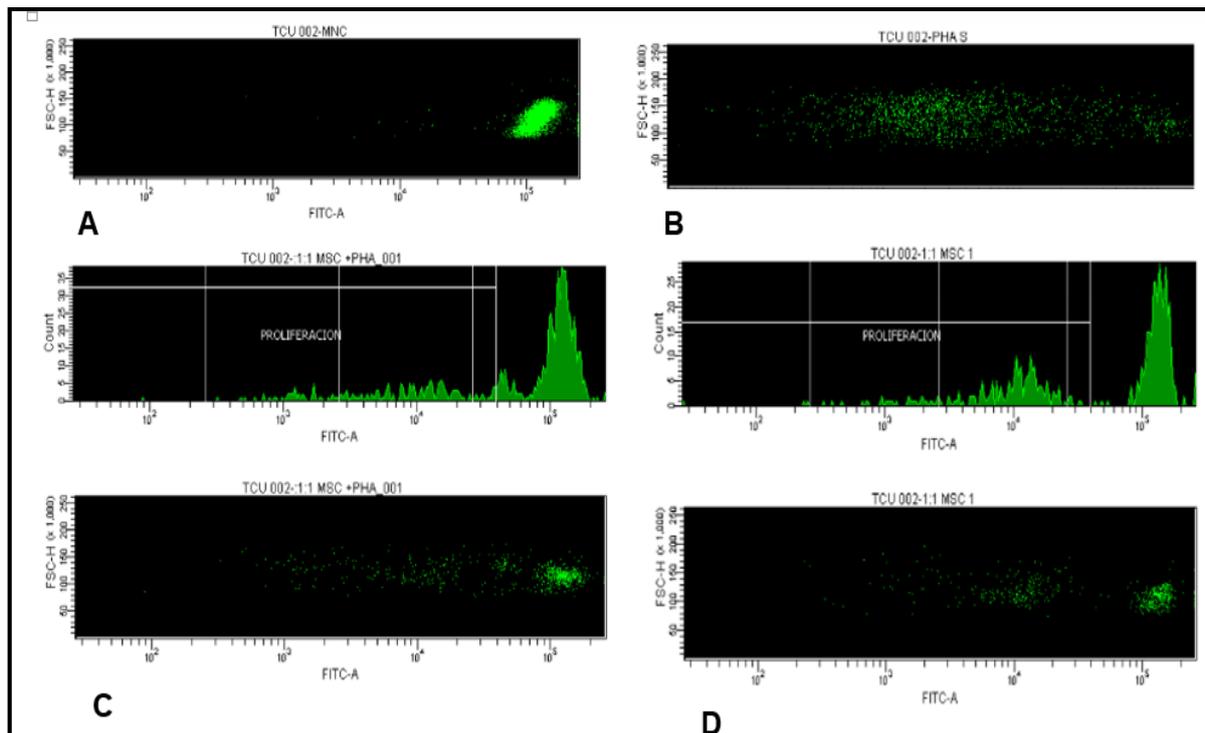


Figura 17. Resultados del ensayo de inmunomodulación del Lote CMSCTAAGWE-Cryoholdco-002. **A)** corresponde al control negativo, es decir CMN marcadas dando un promedio de proliferación de 0,33 %, **B)** control positivo CMN estimuladas con PHA con un promedio de proliferación de 83,7%, **C)** CMN con PHA más MSC se obtuvo un promedio de proliferación de 37,9%, es decir una inhibición de CMN de 45,2%. **D)** CMN sin PHA con MSC con un promedio de proliferación de 42,1%.

8. DISCUSIÓN

Con este estudio piloto, logramos alcanzar los objetivos propuestos ya que se obtuvo un lote de WJ-MSC del 9,09 % de las muestras recolectadas que siguen todos los parámetros de caracterización definidos a nivel mundial por la ISCT en cuanto a morfología e inmunofenotipo, unido a excelentes resultados en nuestras pruebas de inmunomodulación, estabilidad cromosómica e inducción de malignidad.

Los resultados en nuestras pruebas de seguridad son de beneplácito para futuros investigadores que deseen usar nuestro producto en sus trabajos, especialmente en el ámbito clínico, ya que queda la evidencia de la no-malignidad de nuestras células en modelos animales junto a una baja alteración cromosómica *in vitro*. Así mismo podemos garantizar la obtención de las WJ-MSC con Buenas Prácticas de Manufactura gracias al apoyo prestado por STEM Medicina Regenerativa, un laboratorio reconocido a nivel nacional que cuenta con varios años de experiencia en la investigación de células madre(46).

Para nuestro estudio logramos recolectar 11 cordones umbilicales gracias al intenso proceso de búsqueda de donantes y apoyo de las instituciones hospitalarias realizado entre 2017 y 2018. Del total de muestras, tres permitieron el aislamiento de las MSC debido a que cumplieron con los criterios de inclusión, principalmente longitud, peso de la Gelatina de Wharton y celularidad, perdiendo así 72,2% de las muestras totales. Los posibles factores que pudieron generar esta alta tasa de exclusión son error en el procedimiento e individualidad biológica del donante.

El error en el procedimiento pudo suceder en dos momentos críticos de nuestro estudio: la recolección de la muestra y la obtención de la Gelatina de Wharton. Este primer escenario está relacionado esencialmente con los cordones descartados por longitud ya que para el médico colaborador (quienes recibieron entrenamiento por STEM para la recolección de las muestras) era complejo tener presente nuestros criterios de inclusión cuando su prioridad es la vida del neonato y la madre bajo condiciones de estrés y presión que naturalmente genera el parto. Esto por supuesto repercutió en la obtención de la Gelatina de Wharton ya que la longitud se relaciona proporcionalmente al peso de este tejido.

El otro factor que consideramos responsable de esta alta tasa de pérdida de muestras es la individualidad biológica del donante, especialmente frente a aquellos cordones que presentaron baja celularidad. Esta individualidad biológica puede estar ligada al sexo del feto de la donante como lo describe un estudio del presente año (2019), manifestando que los cordones provenientes de fetos femeninos presentan menor longitud pero mayor celularidad, mientras que en los fetos masculinos esta relación se invierte ya que desde la diferenciación temprana de las células germinales se configuran características epigenéticas especiales que producen este efecto(47).

De las 3 muestras válidas según nuestros criterios de inclusión, se obtuvieron 2 lotes con más de 50×10^6 MSC las cuales cumplen con las características morfológicas establecidas por la ISCT y que han sido descritas ampliamente en diversos estudios como la forma de huso y la adherencia al plástico (24,48). Además, nuestras células presentan buenos tiempos de replicación si los comparamos con reportes de PDT en WJ-MSC cultivadas también en medio suplementado con plasma rico en plaquetas, logrando incluso estar por debajo de la media con un resultado de 11.5 horas (Lote 001) cuando ésta es de 20 horas (49).

Corroboramos entonces que el lisado de plasma rico en plaquetas es una alternativa mucho más eficiente que el suero fetal bovino (SFB) para la expansión celular, ya que con este último el PDT se puede duplicar, efecto que algunos autores han atribuido al alto contenido de glucosa y la diversidad de factores solubles liberados por las plaquetas que estimulan el crecimiento y división celular como el EGF *-factor de crecimiento epidérmico-*, PDGF *-factor de crecimiento plaquetario-* y VEGF *-factor de crecimiento endotelial vascular-* (49,50). Las ventajas de este componente van más allá de la eficacia en la proliferación de las MSC, ya que su origen humano permite que en futuros trasplantes de las células no se genere rechazo por xenocomponentes de origen bovino y disminuye el riesgo de convertir las WJ-MS C en vehículo de zoonosis.

Con respecto a la identidad de las células aisladas, éstas presentan los marcadores típicos de superficie de las MSC en las proporciones establecidas a nivel mundial teniendo entonces más del 95% de positividad para CD105, CD73 y CD90; y siendo negativas con menos del 2% para CD45 y CD34(24). Así mismo las MSC demuestran ser negativas para HLA de tipo II y positivas para tipo I, unido a la capacidad *in vitro* para diferenciarse en osteocitos (24,48,51). La baja expresión de HLA-II en las WJ-MS C obtenidas, evidencia la baja inmunogenicidad

de estas células. Sin embargo, es importante considerar que varios autores han descrito otros marcadores menos frecuentes que contribuyen a esa propiedad como lo son el HLA-G o el BH-71 (51,52).

En nuestro estudio también evaluamos la propiedad inmunomoduladora de las MSC cocultivando las células madre con células mononucleares humanas de sangre periférica, activadas y sin activar con PHA (fitohematoaglutinina), consiguiendo una disminución significativa de la proliferación de las mononucleares. De estos resultados hay que destacar que el Lote 001 solo inhibió la proliferación de las mononucleares sin presencia del mitógeno, mientras que en Lote 002 hubo inhibición en ambas condiciones (con y sin PHA), pero siendo más pronunciada la inhibición con el mitógeno.

El hallazgo en el Lote 002 está acorde a lo previamente descrito por varios autores quienes han resaltado que en presencia de linfocitos de sangre periférica activados con PHA, las WJ- MSC presentan mayor producción de IL-10 frente a las concentraciones en el secretoma de esta citoquina en presencia de linfocitos no activados, traduciéndose en mayor inhibición de la proliferación en cocultivos con PHA(53). Aunque aún no hay una explicación satisfactoria para este evento, los investigadores recalcan que esto podría ser una respuesta derivada del contacto directo de las MSC con los linfocitos. Es peyorativo destacar que nuestras células alcanzaron un valor de inhibición acorde al determinado por otros grupos de investigación teniendo una media de 40% de supresión en la proliferación de las mononucleares(20).

La propiedad inmunomoduladora de las WJ- MSC podría ser más compleja de lo que se cree ya que el panel de citoquinas producidas asociadas a las células madre y en relación con esta propiedad es muy extenso, teniendo así descrito un secretoma compuesto por IL1A, IL1B, IL8, IL32, IL33, entre otros(54). En la literatura se ha mencionado que la inmunomodulación afecta directamente la proliferación de linfocitos T CD4⁺ Th2 e incluso eosinófilos, estos último siendo vital en cuanto a futuros usos de las células como tratamiento para alergias(55).

Bajo este panorama, es válido mencionar que nuestras células evitarán la aparición de la enfermedad injerto-huésped en futuros trasplantes, ya que unido a su baja inmunogenicidad, la supresión de la proliferación de las células mononucleares reducirá la probabilidad de desencadenar una respuesta inmune de tipo celular. Unido a esto, el éxito del trasplante a largo plazo podría ser asegurado puesto que algunos estudios han planteado que el efecto

inmunomodulador no se ve afectado por el aumento en la relación de linfocitos frente a células madre, o lo que es lo mismo, la pérdida física progresiva de MSC(56).

Nuestras células estromales mesenquimales exhiben otra cualidad que ha sido muy bien descrita en la literatura y es la baja tasa de mutaciones a largo del tiempo, que en nuestro caso fue 4 pases. Esto es virtualmente importante para la creación de bancos de MSC ya que se puede garantizar el escalado en la producción de células sin que éstas pierdan su propiedades genotípicas y por tanto fenotípicas, incluso llevándolas a más de 20 pases(57,58). Cabe mencionar que a nivel morfológico las WJ-MSC tienden a ser más largas a medida que aumentan los pases lo que conlleva a la disminución de la densidad en el cultivo, sin embargo esto no repercute en sus propiedades inmunofenotípicas por lo que sustenta nuestro razonamiento de usar nuestras células en futuros procesos de banqueo y estudios clínicos o preclínicos (20).

El estudio de inducción de malignidad fue realizado con el objetivo de correlacionar esta estabilidad cromosómica *in vitro* de nuestras células frente a su posible malignidad *in vivo*. Al no hallar formaciones anómalas en los individuos analizados pasados 30 días de la inoculación, podemos determinar que nuestras células son seguras ya que su estabilidad cromosómica *in vitro* es congruente con la no formación de tumor *in vivo*. Ésto se alinea con lo expuesto por otros autores que tuvieron la oportunidad de hacer el estudio por más tiempo, e incluso evaluar otros parámetros relacionados a perfil tumorigénico como los niveles de hTERT, pero obteniendo resultados similares (20).

Con nuestro estudio logramos obtener un lote de MSC con óptimo perfil de calidad y seguridad que servirá de materia prima para futuras investigaciones básicas y/o clínicas que ahonden en la importancia que cobran las WJ-MSC en el área de la Medicina Regenerativa, de tal manera que se pueda continuar con el avance de este sector en el país para ofrecer a nuestra población tratamientos eficaces basados en células madre para enfermedades crónicas degenerativas.

9. CONCLUSIONES

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:

- Las células fueron plenamente aisladas de la Gelatina de Wharton por medio de explante demostrando así mayor capacidad proliferativa, ideal para futuros estudios de banco celular.
- El perfil inmunofenotípico del Lote está plenamente alineado con lo descrito por la ISCT, entidad rectora a nivel mundial sobre células madre, unido a una plena capacidad de diferenciación osteogénica lo que nos permite garantizar la identidad como MSC de las células obtenidas.
- El tiempo de duplicación de las MSC obtenidas está acorde a lo descrito en la literatura por lo que resulta viable implementar un proceso eficiente de escalado para futuras investigaciones.
- El Lote 002 es capaz de suprimir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica en los porcentajes esperados (>30%), lo que no solo garantiza la identidad y eficacia de las células, también su prometedor futuro para estudios enfocados en trasplantes celulares.
- La estabilidad cromosómica a 4 pases de las MSC es satisfactoria con ausencia de anomalías estructurales, hecho que garantiza seguridad en el uso de las células en futuras investigaciones.
- Las células no inducen malignidad en modelos murinos por lo que es razonable explorar la posibilidad de continuar el estudio en seres vivos hasta llegar a la prueba en humanos.
- Todos los procesos vinculados a este estudio piloto se realizaron bajo Buenas Prácticas de Manufactura gracias al soporte de STEM Medicina Regenerativa, siendo evidente en la no contaminación de los cultivos y la identidad perfecta de las células.

10. RECOMENDACIONES

1. Definir con mayor precisión la población donante evaluando diversos factores asociados al paciente frente a la celularidad y caracterización de las MSC derivadas de la Gelatina de Wharton como el sexo del feto, edad de gestación, tipo de parto o edad del donante.
2. Determinar la capacidad *in vitro* de nuestras WJ-MSC para diferenciarse en condrocitos y adipocitos para complementar las pruebas de caracterización del lote obtenido.
3. Evaluar el efecto inmunomodulador de las WJ-MSC sobre los linfocitos T CD4⁺ y caracterizar el secretoma producido en el co-cultivo en aras de determinar las citoquinas involucradas en este efecto y su concentración frente a variables como la presencia/ausencia de mitógeno y relación MSC:linfocitos T CD4⁺.
4. Complementar la prueba de estabilidad cromosómica con cariotipo a mayor número de pases, reevaluación del perfil inmunofenotípico de las WJ-MSC y capacidad *in vitro* de diferenciarse en los tres linajes con el fin de determinar el impacto de las mutaciones en las características de las células.
5. Realizar perfil tumorigénico con al menos una réplica de cada lote/dosis inoculado, un tiempo de exposición de mínimo 6 meses y al menos 3 diferentes dosis de inoculación WJ-MSC, acompañado de evaluación histopatológica de órganos de interés.
6. Evaluar biodisponibilidad de las WJ-MSC en el modelo murino en órganos principales como el hígado, riñones, cerebro y pulmones con el fin comprobar movilidad y eliminación de las WJ-MSC en un organismo vivo.
7. 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.

11. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto describe una investigación científica que se realizará en muestras de desecho biológico de cordón umbilical resultado del alumbramiento de mujeres en parto. Tiempo previo al parto y/o cesárea se solicitará donación del tejido y se realizará venopunción para obtener dos tubos de sangre periférica para la realización de pruebas infectocontagiosas. Esta investigación estará sujeta a todo lo dispuesto en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Tendrá en cuenta los artículos a los que hace alusión dicha resolución en el capítulo I de los aspectos éticos de la investigación en humanos; por las características del estudio, que lo clasifica como riesgo mínimo, todo participante firmará un consentimiento informado antes de tomar la muestra para el estudio (*Ver anexo 1*).

11.5. Procedimientos para garantizar aspectos éticos en la investigación

La manipulación de los animales será llevada a cabo siguiendo los lineamientos internacionales [Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América National Association for Biomedical Research, 2007; National Institute of Health, 1996, ARVO] y nacionales [Resolución nº 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989] con el fin de minimizar el sufrimiento animal. Todos los procedimientos serán llevados a cabo por personal calificado.

12. REFERENCIAS

1. Leung ST, Overschmidt B, Allickson J, Atala A, Taghizadeh RR, Cetrulo K, et al. Review of Processing Technology and Techniques for Perinatal Stem Cells Banking and Clinical Applications [Internet]. *Perinatal Stem Cells*. Elsevier Inc.; 2018. 337–355 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812015-6.00025-X>
2. Chung CG, James AW, Asatrian G, Chang L, Nguyen A, Le K, et al. Tissue Engineering and Regenerative Medicine T ISSUE E NGINEERING AND R EGENERATIVE M EDICINE Human Perivascular Stem Cell-Based Bone Graft Substitute Induces Rat Spinal Fusion. 2014;513–22.
3. Bartolucci J, Verdugo FJ, González PL, Larrea RE, Abarzua E, Goset C, et al. Safety and efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure: A phase 1/2 randomized controlled trial (RIMECARD trial [Randomized clinical trial of intravenous infusion umbilical cord mesenchymal . *Circ Res*. 2017;121(10):1192–204.
4. Gaafar T, Attia W, Mahmoud S, Sabry D, Aziz OA, Rasheed D, et al. Cardioprotective effects of wharton jelly derived mesenchymal stem cell transplantation in a rodent model of myocardial injury. *Int J Stem Cells*. 2017;10(1):48–59.
5. Nekanti U, Mohanty L, Venugopal P, Balasubramanian S, Totey S, Ta M. Optimization and scale-up of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Res* [Internet]. 2010;5(3):244–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2010.08.005>
6. Briddell R, Litkenhaus F, Carroll JE, Ali M, Girard KF, Fodor W, et al. Perinatal Stem Cells Isolated From Complete Umbilical Cord Tissue for Family Stem Cell Banking and Potential Therapeutic Use [Internet]. *Perinatal Stem Cells*. Elsevier Inc.; 2018. 257–269 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812015-6.00019-4>
7. Chatzistamatiou TK, Papassavas AC, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, Gontika I, et al. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton’s jelly’s mesenchymal stem cell (MSC) properties: An MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*. 2014;54(12):3108–20.
8. Lechanteur C, Briquet A, Giet O, Delloye O, Baudoux E, Beguin Y. Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: A large banking experience. *J Transl Med*. 2016;14(1):1–15.
9. Bárcia RN, Santos JM, Teixeira M, Filipe M, Pereira ARS, Ministro A, et al. Umbilical

- cord tissue–derived mesenchymal stromal cells maintain immunomodulatory and angiogenic potencies after cryopreservation and subsequent thawing. *Cytotherapy* [Internet]. 2017;19(3):360–70. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.11.008>
10. Shivakumar SB, Bharti D, Subbarao RB, Jang SJ, Park JS, Ullah I, et al. DMSO- and Serum-Free Cryopreservation of Wharton’s Jelly Tissue Isolated From Human Umbilical Cord. *J Cell Biochem*. 2016;16(February):2397–412.
 11. Arbosa A, Nicolaua F, Quetglas M, Ramis JM, Monjob M, Muncunill J, et al. Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunologia* [Internet]. 2013;32(1):3–11. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.inmuno.2012.11.002>
 12. Donders R, Bogie JFJ, Ravanidis S, Gervois P, Vanheusden M, Marée R, et al. Human Wharton’s Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2018;27(2):65–84. Available from:
<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2017.0029>
 13. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Rahman A, Mohit M, Janzamin E, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton ’ s jelly Published by : Society for In Vitro Biology Linked references are available on JSTOR for this article : Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton ’ s jelly. 2016;
 14. Fazzina R, Mariotti A, Procoli A, Fioravanti D, Iudicone P, Scambia G, et al. A new standardized clinical-grade protocol for banking human umbilical cord tissue cells. *Transfusion*. 2015;55(12):2864–73.
 15. Ding D-C, Chang Y-H, Shyu W-C, Lin S-Z. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. *Cell Transplant*. 2015;24(3):339–47.
 16. Rammal H, Harmouch C, Lataillade J-J, Laurent-Maquin D, Labrude P, Menu P, et al. Stem Cells: A Promising Source for Vascular Regenerative Medicine. *Stem Cells Dev*. 2014;23(24):2931–49.
 17. Franceschetti T, De Bari C. The potential role of adult stem cells in the management of the rheumatic diseases. *Ther Adv Neurol Disord*. 2017;23(2s):153 –156.
 18. Quezada Leyva Lidyce, León Ramentol CC, Fernández Torres S, Nicolau Pestana E.

- Stem cells: a revolution in regenerative medicine. *Medisan* [Internet]. 2017;21(5):574–81. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192017000500009
19. Arevalo J, Páez D. Cultivo de células madre mesenquimales a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias.; 2007.
 20. 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>
 21. Consuelo Macías-Abraham D, Lázaro del Valle-Pérez LO, Porfirio Hernández-Ramírez D, José Ballester-Santovenia DM. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales Phenotypical and functional features of the mesenchymal and endothelial stem cells. *Inmunol y Hemoter* [Internet]. 2010;26(4):256–75. Available from: <http://scielo.sld.cu>
 22. Nicodemou A, Danisovic L. Mesenchymal stromal/stem cell separation methods: concise review. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(4):443–60.
 23. Kim HJ, Park J-S. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Dev Reprod* [Internet]. 2017;21(1):1–10. Available from: http://www.ksdb.org/archive/view_article?pid=dr-21-1-1
 24. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
 25. Fuentes MF. Optimización del sistema de cultivo y caracterización de células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea humana. Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
 26. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2016;7(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0363-7>
 27. Hernández P. Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter*. 2009;25(1):1–15.
 28. Watson N, Divers R, Kedar R, Mehindru A, Mehindru A, Borlongan MC, et al. Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: A viable source for

- mesenchymal stromal cells. *Cytherapy* [Internet]. 2015;17(1):18–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.08.009>
29. Davies J, Walker J, Keating A. Concise Review : Wharton ' s Jelly : The Rich , but Enigmatic , Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Transl Med*. 2017;1620–30.
 30. Ventura Ferreira MS, Bienert M, Müller K, Rath B, Goecke T, Opländer C, et al. Comprehensive characterization of chorionic villi-derived mesenchymal stromal cells from human placenta. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):1–17.
 31. Naji A, Suganuma N, Espagnol N, Yagyu K, Nobuyasu B. Rationale for Determining the Functional Potency of Mesenchymal Stem Cells in Preventing Regulated Cell Death for Therapeutic Use. *Stem Cell Transl Med*. 2015;1011–20.
 32. Han YF, Tao R, Sun TJ, Chai JK, Xu G, Liu J. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. *Cytotechnology*. 2013;65(5):819–27.
 33. Suárez VM, Delvallepérez LO, Domínguez GD, Abraham CM. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter*. 2015;31(3):242–53.
 34. Barrera M, Drago E, Pérez J, Zamora A, Gómez F. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Inst Nac Enfermedades Respir*. 2011;46(6):1932–6.
 35. Agricultura VY. Aplicaciones De La Citometría De Flujo En Microbiología , Veterinaria Y Agricultura Applications of Flow Cytometry in Microbiology. 2007;12(2):1077–95.
 36. Ali M, Zayed A. Human Karyotype Prepared by : Islam Univ Gaza. (Training Course Manual):1–16.
 37. Yoon S. The HLA System: Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J*. 2007;48(1):11–23.
 38. Garner C, Hubbard M, Chakraborti P. Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. *Br J Biomed Sci*. 2014;57:295–301.
 39. Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of mycoplasma contamination in cell culture. *Cell J*. 2012;13(4):203–12.
 40. Meng M, Liu Y, Wang W, Wei C, Liu F, Du Z, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of multiple sclerosis. *Am J Transl Res*. 2018;10(1):212–23.

41. Wang M-Y, Nestvold J, Rekdal Ø, Kvalheim G, Fodstad Ø. A novel rat fibrosarcoma cell line from transformed bone marrow-derived mesenchymal stem cells with maintained in vitro and in vivo stemness properties. *Exp Cell Res* [Internet]. 2017;352(2):218–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28189639>
42. Jeltsch KS, Radke TF, Laufs S, Giordano FA, Allgayer H, Wenz F, et al. Unrestricted somatic stem cells: Interaction with CD34+ cells in vitro and in vivo, expression of homing genes and exclusion of tumorigenic potential. *Cytotherapy*. 2011;13(3):357–65.
43. Priest CA, Manley NC, Denham J, Wirth ED, Lebkowski JS. Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury. *Regen Med*. 2015;10(8):939–58.
44. Moviglia GA, Maximiliano R, Tahan V, Guionet A, Di Stilio P, Gutierrez L, et al. GMP method of human WJ MSC isolation, expansion and characterization. preclinical safety study. *Cytotherapy* [Internet]. 2017;19(5):S79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.02.130>
45. Connecting Pharmaceutical Knowledge. Good Manufacturing Practice (GMP) Resources | ISPE | International Society for Pharmaceutical Engineering.
46. Manuel J, Rojas D, Franco D. TEMPERATURA Y TIEMPO PRE- PROCESAMIENTO : FACTORES ESENCIALES PARA EL RENDIMIENTO CELULAR. 2018;18(2):7–24.
47. Balzano F, Bellu E, Basoli V, Dei Giudici S, Santaniello S, Cruciani S, et al. Lessons from human umbilical cord: gender differences in stem cells from Wharton’s jelly. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2019;234:143–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.12.028>
48. Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, Jafari N, Khalilian A, Rahmani Z, et al. Wharton’s jelly derived-mesenchymal stem cells: Isolation and characterization. *Acta Med Iran*. 2018;56(1):28–33.
49. 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. *N Biotechnol*. 2019;49:151–60.
50. Bharti D, Shivakumar SB, Park JK, Ullah I, Subbarao RB, Park JS, et al. Comparative analysis of human Wharton’s jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord. *Cell Tissue Res*. 2018;372(1):51–65.
51. 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.* 2013;14(6):11692–712.
52. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from maternal-origin placenta and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):1–7.
 53. Poltavtsev AM, Poltavtseva RA, Yushina MN, Volgina NE, Svirshchevskaya E V. Cytokine Production in Mixed Cultures of Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly and Peripheral Blood Lymphocytes. *Bull Exp Biol Med.* 2017;163(1):169–75.
 54. 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. *Stem Cells Dev.* 2018;28(3):196–211.
 55. Chan CK, Lin TC, Huang YA, Chen YS, Wu CL, Lo HY, et al. The modulation of Th2 immune pathway in the immunosuppressive effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells in a murine asthmatic model. *Inflamm Res.* 2016;65(10):795–801.
 56. Poltavtsev AM, Poltavtseva RA, Yushina MN, Pavlovich S V., Svirshchevskaya E V. Proliferation of Peripheral Blood Lymphocytes and Mesenchymal Stromal Cells Derived from Wharton's Jelly in Mixed and Membrane-Separated Cultures. *Bull Exp Biol Med.* 2017;163(4):542–9.
 57. Muniswami DM, Reddy LVK, Venkatesh K, Babu S, Sen D. Neuropotency and Neurotherapeutic Potential of Human Umbilical Cord Stem Cell's Secretome. *Regen Eng Transl Med.* 2019;
 58. 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.

13. ANEXOS

13.1. Anexo 1. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CREACIÓN DE UN BANCO ALOGÉNICO PILOTO DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES AISLADAS DE LA GELATINA DE WHARTON DEL CORDÓN UMBILICAL Y/O DE LA PLACENTA HUMANA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Luz Mabel Ávila

**COINVESTIGADORES: Laura Marcela Sierra Cruz, Richar Duvan Torres Beltrán,
Yessica Alejandra Triana, Heydy Dayana Vera Delgado, Jenniffer Ávila, Angela
Riveros y Benjamín Ospino.**

I. INFORMACIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN, PROCEDIMIENTO Y PARTICIPACIÓN DEL SUJETO

Justificación

La medicina regenerativa es un campo de la medicina que tiene como objetivo el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas de alto impacto en la calidad de vida de los pacientes a partir de células estromal mesenquimal multipotentes (MSC), las cuales se pueden obtener de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano y placenta humana; las células madre son células multipotentes, es decir que tienen el potencial de diferenciarse a otro tipo de células. Basados en lo anterior este estudio pretende ampliar el conocimiento de la población de células madre mesenquimales (MSC) presentes en el cordón umbilical humano, su mecanismo de acción, sus componentes, identificar subpoblaciones de MSC y utilizarlas en

investigación básica y clínica; por tal motivo resulta necesario la creación de un banco alogénico de MSC para poder almacenar correctamente estas células y asegurar así el adecuado avance de este campo de la medicina moderna.

Objetivo de la investigación

Obtener al menos un lote de células estromales Mesenquimales del recién nacido desarrollado mediante procedimientos que utilizan buena práctica de manufactura durante la obtención, procesamiento, expansión, caracterización y criopreservación de las células extraídas de la gelatina de Wharton del cordón umbilical y/o de la placenta humana.

Procedimiento y propósito

Al momento de la llegada a la clínica para el parto y/o cesárea, se le tomarán dos tubos con muestras de sangre mediante venopunción para realizar pruebas de enfermedades infectocontagiosas, al finalizar el proceso de alumbramiento o sea posparto se cortará un fragmento del cordón umbilical y un segmento de placenta, lo cual no genera ningún riesgo para usted ni el recién nacido, además de no implicar dolor alguno diferente al del parto. Usted y el bebé seguirán el proceso de normal para partos y/o cesárea establecido por el equipo médico del hospital.

El propósito del procedimiento es obtener un fragmento del cordón umbilical y de placenta, con estos fragmentos se procederá a obtener las células nucleadas, a partir de este momento se realizarán diferentes pruebas para determinar la calidad del producto, los criterios que se deben cumplir son los que exigen a nivel internacional la buena práctica de manufactura de células (GMP). Las MSC que cumplan todos los criterios GMP se criopreservan por 18 años para ser utilizadas en investigación básica y clínica.

Molestias o riesgos esperados

El procedimiento mencionado anteriormente no generará dolor o molestia alguna para usted y el bebé. De igual modo, tampoco pone en riesgo la vida de ninguno de los dos.

Beneficios

La participación en esta investigación no le generará ningún tipo de beneficio o retribución económica o de cualquier otra índole. El beneficio que obtiene con su participación es la satisfacción de contribuir con el desarrollo de investigación tanto básica como clínica utilizando estas células.

Procedimientos alternativos

Para esta investigación no se describe ningún procedimiento alternativo al ya mencionado anteriormente.

Inquietudes y aclaraciones

El equipo de investigación se compromete a resolver sus preguntas y aclaraciones a cualquier duda acerca del procedimiento, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y su participación. Usted tiene el derecho a que se le responda de forma clara todas las preguntas hasta que usted quede con plena satisfacción.

Si tiene cualquier pregunta acerca de su participación en este estudio por favor comuníquese con: Dra. Luz Mabel Avila. Teléfono: 3114747335

El presidente del comité de ética de Investigación es el Dr. Nelson F. Castañeda Alarcon teléfono 3132362684.

Participación

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Si por alguna causa en el transcurso del estudio decide abandonarlo no tendrá ninguna represalia por hacerlo.

Confidencialidad de la información

Los datos que usted suministre al equipo de investigación para la correcta identificación de la muestra (fragmento de cordón umbilical) serán manejados bajo total confidencialidad de tal modo que no podrán ser vendidos, divulgados o transferidos a ninguna entidad ajena a la investigación.

Eventos adversos

El procedimiento a realizar no generará ningún tipo de evento adverso.

13.2. Anexo 2. Hoja de seguridad del componente



CLASE DEL COMPONENTE:	Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton de Cordón Umbilical
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:	≤ -196 ° C
ATRIBUTOS:	LPRP 10% DMSO
GRUPO SANGUÍNEO:	O+
TIPO DE DONACIÓN:	Voluntaria, uso Alogénico
CÓDIGO:	CTMSCTAAGWE CryoHoldco
NÚMERO DE LOTE:	002
FECHA DE CADUCIDAD:	26 de octubre de 2018
FECHA DE DONACIÓN	A*02, 03 B*35, 52;Bw: 4;Bw 6
HLA:	B*35, 51; Bw: 4;Bw 6 DRB1*04, *15, DRB4* pos. (DR 53); DRB5* pos (DR51)
INMUNOFENOTIPO:	CD90/CD73/CD105: 97,7% CD45/CD34:1,2%
POTENCIAL INMUNOMODULADOR:	%
POTENCIAL OSTEOGENICO:	
CARIOTIPO:	46 XY Normal en las mitosis analizadas
PRUEBA IN VIVO TUMORAL:	negativa para formación de tumores en ratones BALB/c
PERFIL DE SEGURIDAD:	Este vial fue tamizado con resultados no reactivos para Anti-core Total Hepatitis B, <i>Toxoplasma gondii</i> , Citomegalovirus, Anticuerpos contra <i>Treponema pallidum</i> , Anticuerpos contra HLTV I y II, Anticuerpos contra VIH I y II, Anticuerpos para <i>Trypanosoma cruzii</i> (Enfermedad de Chagas) y Anticuerpos para Hepatitis B
 CTMSCTAA GWE -CryoHoldco - 002	



CTMSCTAAGWE
CRIOPRESERVADO
CELULAS MADRE
MESENQUIMALES MSC
LOTE: 002
FECHA DE OBTENCIÓN: 29
octubre 2018
FECHA DE CADUCIDAD: XX
XXXX XXXX
Bogotá, Colombia



RIESGO BIOLÓGICO

Usar exclusivamente
para el receptor designado

RECEPTOR DESIGNADO

PEREZ, PEPITO P
D.I: XXXXXXXXXXXXX

Fecha de nacimiento:



Bogotá, Colombia