

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**GENERACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS DE PLACENTA
PARA USO CLÍNICO**

Almudena de Laiglesia Lorenzo

Tesis Doctoral

Madrid 2017

Almudena de Laiglesia Lorenzo

TÍTULO: GENERACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS DE PLACENTA PARA USO CLÍNICO

Directores:

Prof. Enrique Gómez Barrena. Catedrático de Traumatología y Cirugía Ortopédica. UAM. Hospital Universitario La Paz.

Dra. Rosa M^a Gonzalo Daganzo. Doctora en Ciencias Biológicas (UAM). Investigadora del Servicio de Hematología. Responsable de Garantía de Calidad de la Unidad de Producción Celular del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda.

Tutor:

Prof. José Rafael Cabrera Marín. Profesor asociado de Hematología. UAM.

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

2017

Reconocimientos:

Para la realización de este trabajo se ha contado con ayuda económica procedente de los siguientes proyectos:

- Plan I+D+i SAF2012-40149-C02-01 (2013-2016): “Estudio preclínico para evaluar células mesenquimales humanas de placenta que promuevan regeneración ósea y desarrollar un nuevo producto celular bajo condiciones GMP”.
IP: Profesor Gómez Barrena. Participantes: IDiPAZ (Laboratorio de Fisiopatología Ósea y Biomateriales), IIS Hospital 12 de Octubre (Laboratorio de Medicina Regenerativa), IIS Hospital Puerta de Hierro (Laboratorio de Investigación del Servicio de Hematología) y Fundación Jiménez Díaz (Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo).
- Proyecto Fundación Mutua Madrileña FMMA AP 117862013 (2013-2015): “Regeneración ósea con células mesenquimales humanas de placenta”.
IP: Profesor José Rafael Cabrera Marín. Participantes: IIS Hospital Puerta de Hierro (Laboratorio de Investigación del Servicio de Hematología), IDiPAZ (Laboratorio de Fisiopatología Ósea y Biomateriales), IIS Hospital 12 de Octubre (Laboratorio de Medicina Regenerativa).
- Proyecto Fundación Astellas (2015-2016): “Regeneración ósea con células mesenquimales humanas de placenta”.
IP: Profesor José Rafael Cabrera Marín. Participantes: IIS Hospital Puerta de Hierro (Laboratorio de Investigación del Servicio de Hematología).

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Profesor Rafael Cabrera, al que aprecio y admiro, y del que tantas cosas he aprendido a lo largo de los años de trabajo compartido, por su apoyo y por la confianza depositada en mí.

A la Dra. Rosa M^a Gonzalo Daganzo, por introducirme en el campo de la investigación, por enseñarme todo lo que sé en el campo de los cultivos celulares, por su disponibilidad y su paciencia infinita, por su apoyo y sus ánimos a lo largo de la realización de este trabajo.

Al Profesor Gómez Barrena, por su apoyo y sus consejos durante el periodo de elaboración de esta tesis doctoral.

A las Dras. Nuria Vilaboa, Gema Vallés y Laura Saldaña, del Laboratorio de Fisiopatología Ósea y Biomateriales del Instituto de Investigación del Hospital de La Paz, por la ayuda prestada para la realización de este trabajo

A la Dra. Ana Isabel Flores de la Cal, del Laboratorio de Medicina Regenerativa del Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre, por compartir sus células de decidua y todo su conocimiento adquirido sobre ellas.

A todo el personal del Servicio de Hematología del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, y especialmente a la Dra. Carmen Regidor por su apoyo y sus consejos a lo largo de todos estos años, y al personal de Investigación, la Dra. Trinidad Martín Donaire y Rocío Sánchez, por todo lo que me han enseñado y ayudado durante la realización de este trabajo.

Y por supuesto, a mi familia, especialmente a mis padres y a mi marido, de los que siempre he recibido un cariño y un apoyo incondicional, y que han estado disponibles en todo momento, y a mi hijo Juan.

INDICE

ÍNDICE DE GRÁFICOS	9
ÍNDICE DE IMÁGENES	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE TABLAS	13
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	14
1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	16
2. INTRODUCCIÓN	19
2.1 CÉLULAS MESENQUIMALES.....	20
2.1.1 Concepto y antecedentes	20
2.1.2 Definición y nomenclatura.....	22
2.1.3 Aislamiento y cultivo	23
2.1.4 Potencial terapéutico	24
2.1.4.1 <i>Inmunomodulación</i>	25
2.1.4.2 <i>Reparación tisular</i>	27
2.1.4.3 <i>Aplicación en Traumatología</i>	27
2.2 Médula ósea como fuente de CME	30
2.3 Placenta como fuente de CME	31
2.4 Cultivo de CME para aplicaciones clínicas	34
3. OBJETIVOS	38
4. MATERIALES Y MÉTODOS	40
4.1 MATERIALES	41
4.1.1 Células mesenquimales	41
4.1.1.1 <i>CME de MO (CME-MO)</i>	41
4.1.1.2 <i>CME de decidua (CME-D)</i>	41
4.1.2 Equipos.....	41
4.1.3 Materiales de Laboratorio	42
4.1.4 Biomateriales	42
4.1.5 Reactivos	43
• <i>Medios de cultivo y suplementos</i>	43
• <i>Reactivos para Citometría de flujo</i>	44
• <i>Reactivos y materiales para controles de calidad</i>	45
• <i>Medios de diferenciación</i>	45

•	<i>Tinciones</i>	45
4.2	MÉTODOS.....	46
4.2.1	Aislamiento de CME	46
•	<i>Aislamiento de CME-MO</i>	46
•	<i>Aislamiento de CME de Decidua</i>	46
4.2.2	Tripsinización de células en cultivo	47
4.2.3	Mantenimiento de CME en cultivo	48
4.2.4	Criopreservación de CME.....	48
4.2.5	Descongelación de CME.....	49
4.2.6	Contaje de CME	49
4.2.7	Evaluación morfológica de CME.....	50
4.2.8	Caracterización de CME mediante citometría de flujo	50
4.2.9	Ensayos de diferenciación.....	52
4.2.9.1	<i>Diferenciación osteogénica</i>	52
4.2.9.2	<i>Diferenciación adipogénica</i>	52
4.2.9.3	<i>Diferenciación condrogénica</i>	53
4.2.10	Evaluación de diferenciación	54
4.2.10.1	<i>Evaluación de diferenciación osteogénica</i>	54
4.2.10.2	<i>Evaluación de diferenciación adipogénica</i>	55
4.2.10.3	<i>Evaluación de diferenciación condrogénica</i>	55
4.2.11	Ensayo de proliferación con CFU-f.....	56
4.2.12	Cultivo de CMM con biomaterial: Ensayo de viabilidad con alamar blue.....	56
4.2.13	Controles de calidad.....	58
•	<i>Test de mycoplasma</i>	58
•	<i>Test de endotoxinas</i>	59
•	<i>Análisis microbiológicos</i>	60
•	<i>Análisis de cariotipo</i>	60
•	<i>Análisis de viabilidad</i>	60
4.3	PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	62
4.3.1	FASE I: FASE DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO.....	62
4.3.2	FASE II: FASE DE ESTUDIO EN CONDICIONES EQUIPARABLES A GMP (GMP-LIKE).....	65
4.3.3	FASE III: FASE DE PRODUCCIÓN DE UN PRODUCTO DE TERAPIA CELULAR EN CONDICIONES GMP	66
4.4	UNIDAD DE PRODUCCIÓN CELULAR.....	68
5.	RESULTADOS.....	69

5.1	FASE I: INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO.....	70
5.1.1	Obtención de CME-D	70
5.1.2	Generación de “stock” de trabajo de CME-D	70
5.1.3	Cultivo a pequeña escala, comparativo entre	71
	CME-MO y CME-D.....	71
5.1.4	Caracterización por inmunofenotipo	75
5.1.5	Escalado de cultivo comparativo.....	77
5.2	FASE II: ESTUDIOS EN CONDICIONES EQUIPARABLES A GMP (“GMP-LIKE”).....	79
5.2.1	Comparación con cultivo a escala clínica	79
5.2.2	Producción de 3 lotes de CME-D.....	81
5.2.3	Ensayos de diferenciación.....	82
5.2.3.1	<i>Diferenciación osteogénica</i>	82
5.2.3.2	<i>Diferenciación adipogénica</i>	83
5.2.3.3	<i>Diferenciación condrogénica</i>	83
5.2.4	Controles de calidad	83
5.2.4.1	<i>Estudio del inmunofenotipo por citometría de flujo</i>	83
5.2.4.2	<i>Estudios microbiológicos</i>	84
5.2.4.3	<i>Estudio de cariotipo</i>	84
5.3	FASE III: PRODUCCIÓN DE PRODUCTO DE TERAPIA CELULAR EN CONDICIONES GMP.....	86
5.3.1	Producción de dos lotes de CME-D para uso clínico	86
5.3.2	Ensayos de diferenciación.....	87
5.3.2.1	<i>Diferenciación osteogénica</i>	87
5.3.2.2	<i>Diferenciación adipogénica</i>	88
5.3.2.3	<i>Diferenciación condrogénica</i>	88
5.3.3	Controles de calidad	89
5.3.3.1	<i>Estudio del inmunofenotipo por citometría de flujo</i>	89
5.3.3.2	<i>Estudios microbiológicos</i>	90
5.3.3.3	<i>Estudio de cariotipo</i>	90
5.3.4	Ensayo con biomateriales	90
5.3.5	Estudio de estabilidad del producto celular	94
6.	DISCUSIÓN.....	95
7.	CONCLUSIONES.....	101

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Rendimiento tras cultivo comparativo a pequeña escala, número de células al inicio y tras finalizar el cultivo	75
Gráfico 2 Resultados de estudio de citometría de flujo: Positividad de las CME obtenidas tras cultivo a pequeña escala en diferentes condiciones para los distintos antígenos de superficie	76
Gráfico 3 Incremento del número de CME tras el cultivo, en distintas condiciones de cultivo	78
Gráfico 4 Resultados de estudio de citometría de flujo de 3 lotes de CME-D	84
Gráfico 5 Unidades de Fluorescencia en las distintas condiciones y en los distintos puntos	93
Gráfico 6 Unidades de fluorescencia en las condiciones en las que se incluyó biomaterial (detalle de Gráfico 5).....	93

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1 Placenta humana a término. A: cara fetal, placa coriónica y cordón umbilical cubiertos por el amnios. B: cara materna, cotiledones recubiertos por la decidua	32
Imagen 2 Tinción May-Grünwald Giemsa de placa p6.....	72
Imagen 3 Fotos de microscopía placa p6, Tinción May-Grünwald Giemsa. A1: condición A, 4x; A2: condición A, 10x; B1: condición B, 4x; B2: condición B, 10x; C1: condición C, 4x; C2: condición C, 10x; D1: condición D, 4x; D2: condición D, 10x; E1: condición E, 4x; E2: condición E, 10x.	74
Imagen 4 Tinción May-Grünwald Giemsa. Condición E, CME-D, 20x	74
Imagen 5 Imagen de placa p6 frente a frasco de cultivo T25.....	77
Imagen 6 Frascos de cultivo T25 de las 5 condiciones de cultivo tras su finalización	77
Imagen 7 Comparativa del tamaño de los frascos de cultivo T25 y los CellSTACK (1272 cm ²).....	79
Imagen 8 Imagen de los CellStack con los cultivos estándar con SBF (A) y estándar GMP con LP (B)	80
Imagen 9 Depósitos extra e intracelulares de calcio, teñidos (rojo) con Alzarin Red. A: 10x, B: 20x, C: 20x	82
Imagen 10 Actividad Fosfatasa alcalina, CME teñidas con SIGMA FAST. A: 4x, B: 10x, C: 20x	82
Imagen 11 Imagen de microscopía confocal. TP-PRO: tinción de núcleos; osteocalcina: positividad para osteocalcina en verde; fusión: imagen de fusión de las previas.....	87
Imagen 12 Control negativo de osteocalcina.	87
Imagen 13 Imagen de microscopía confocal. TP-PRO: tinción de núcleos; FABP4: positividad para grasa en verde; fusión: imagen de fusión de las previas.	88
Imagen 14 control negativo de FABP4	88
Imagen 15 Imagen de microscopía confocal. TO-PRO: tinción de núcleos; ANTIGENO AGRECAN: positividad para cartílago en verde, muy escasa; fusión: imagen de fusión de las previas.	89
Imagen 16 Control negativo de ANTÍGENO AGRECAN.....	89
Imagen 17 Placa p48 con biomateriales.....	91
Imagen 18 Placa p48 con biomateriales, una vez añadida la suspensión celular y las CME-D como controles positivos para la curva patrón	91
Imagen 19 Placa p48-1 tras incubación con Alamar Blue	91

Imagen 20 Placa p48 tras incubación con Alamar Blue, se observan los biomateriales en los pocillos.....92

Imagen 21 Placa p96 para lectura en el espectrofotómetro92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Funciones atribuidas a las CME, de Viswanathan et al, 2014. ⁵	21
Figura 2 Esquema de placa p48 para ensayo Alamar Blue con biomateriales	57
Figura 3 Esquema de placa p48-1 para el ensayo de Alamar Blue con biomateriales	58
Figura 4 Esquema de las condiciones de cultivo sembradas en cada placa p6 (el último pocillo queda vacío).....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características inmunofenotípicas de las CME (ISCT)	51
Tabla 2 Planteamiento experimental en 3 fases.....	62
Tabla 3. Condiciones de cultivo para estudio comparativo de cultivo CME a pequeña escala.....	63
Tabla 4 Rendimiento tras la cultivo de CME-D para generación de “stock” de trabajo	71
Tabla 5 Resultados tras cultivo comparativo a pequeña escala	75
Tabla 6 Porcentaje de CME positivas por citometría de flujo para los antígenos estudiados tras cultivo a pequeña escala en diferentes condiciones.....	76
Tabla 7 Resultados tras cultivo comparativo a mayor escala (mediana de los triplicados).....	77
Tabla 8 Rendimiento tras cultivo a escala clínica.....	80
Tabla 9 Datos de rendimiento de la producción de 3 lotes de CME-D en condiciones “GMP-like”	81
Tabla 10 Rendimiento de cultivo de CME-D en condiciones GMP, 2 lotes	86
Tabla 11 Porcentaje de células viables. Mediana de 3 contajes con cámara Neubauer y azul tripán	94

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Células presentadoras de antígenos (<i>antigen presenting cells</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CME	Células mesenquimales estromales
CME-D	Células mesenquimales estromales de decidua
CME-MO	Células mesenquimales estromales de médula ósea
CMM	Células madre mesenquimales
CMN	Células mononucleadas
CFU-f	Unidades formadoras de colonias fibroblastoides (<i>colony forming units-fibroblast</i>)
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DMEM	Medio de cultivo, <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DP	Duplicación de la población celular
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
FA	Fosfatasa alcalina
FGF	Factores de crecimiento de fibroblastos (<i>fibroblast growth factors</i>)
GMP	Normas de correcta fabricación (<i>Good Manufacturing Practice</i>)
HA	Hidroxiapatita
HLA (CMH)	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (<i>human leucocitary antigen</i>)
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón

Ig	Inmunoglobulina
IGFs	Factores de crecimiento similares a la insulina (<i>insulin-like growth factors</i>)
IL	Interleukina
ISCT	Sociedad internacional de terapia celular (<i>International Society for Cellular Therapy</i>)
LB	Linfocitos B
LP	Lisado plaquetario
LT	Linfocitos T
L Treg	Linfocitos T reguladores
MO	Médula ósea
NK	Células Natural Killer
PBS	Tampón fosfato salino
PD-1	Vía de muerte programada (<i>Programmed death</i>)
PDGF	Factores de crecimiento derivados de las plaquetas (<i>Platelet derived growth factors</i>)
PG	Prostaglandina
PRP	Plasma rico en plaquetas
SBF	Suero bovino fetal
TCP	Fosfato tricálcico
TD	Tiempo de duplicación celular
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Las células mesenquimales estromales (CME) son células con características únicas: facilidad para su aislamiento y expansión, escasa inmunogenicidad⁶⁵ -lo que podría permitir su empleo en el contexto alogénico-, propiedades antiinflamatorias/inmunomoduladoras y capacidad de diferenciación. Varios estudios han demostrado que, en caso de lesiones tisulares, las CME son capaces de migrar específicamente hacia el tejido dañado, y de repararlo^{35,38}. Además de sus propiedades regenerativas, las CME poseen propiedades tróficas que las hacen adicionalmente atractivas para posibles aplicaciones terapéuticas, ya que secretan un amplio espectro de factores bioactivos con actividad paracrina, propiciando un ambiente biológico favorable alrededor de los tejidos lesionados, que podría acelerar los procesos de regeneración y cicatrización⁴⁰.

Las CME de médula ósea (MO) de grado clínico o grado GMP (*Good Manufacturing Practice*, normas de correcta fabricación), se han empleado con éxito en diversos proyectos de investigación, así como en ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)¹⁹, y se están evaluando junto con biomateriales en ensayos clínicos fase I-II para regeneración ósea (proyecto REBORNE, *Regenerating Bone defects using New biomedical Engineering approaches*). A través del acoplamiento de células y biomateriales para promover la regeneración ósea, se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, su viabilidad y eficacia en la restauración de los tejidos óseos patológicamente alterados³⁹. Las CME son además capaces de diferenciarse en osteoblastos maduros u osteoprogenitores⁷, siendo por lo tanto adecuadas para terapia celular en los procesos de reparación y regeneración ósea.

Una de las limitaciones para la aplicación de esta terapia es que las CME-MO disminuyen, tanto en número como en capacidad proliferativa, con la edad del donante, debido al proceso de senescencia. Por lo tanto, a mayor edad, menor número de CME-MO obtenidas mediante aspiración de MO, con una proporción de CME "óptimas" escasa, lo que supone un inconveniente para la terapia celular, en casos de pacientes de edad avanzada que precisen tratamientos con CME en principio de origen autólogo⁵⁰.

En este sentido, la utilización de CME alogénicas constituiría una opción prometedora, y la búsqueda de nuevas fuentes de CME se ha convertido en un área de interés.

Recientemente se han aislado y caracterizado morfológica, fenotípica y funcionalmente unas células de la placenta humana a término, tanto procedentes de membranas fetales como maternas, y se ha demostrado que esas células son de tipo mesenquimal, de acuerdo con su fenotipo y su capacidad de proliferación y diferenciación⁵⁷⁻⁶⁰. Las células de origen materno, aisladas a partir de la decidua, denominadas CME-D (células mesenquimales estromales de decidua), constituyen una población celular

homogénea y no expresan marcadores embrionarios, pero sí dos factores de transcripción implicados en la pluripotencialidad de las células madre embrionarias: Oct4, 1-Rex, y el factor de transcripción involucrado en la organogénesis GATA-4. Poseen por tanto un fenotipo intermedio entre las CME embrionarias y las adultas. Además, se ha demostrado la alta capacidad de las CME-D de proliferación, manteniendo no obstante estabilidad de sus características fenotípicas, genómicas y funcionales, lo que sugiere que pueden ser expandidas a gran escala sin comportar riesgos para los potenciales pacientes en lo que se refiere a la seguridad a medio-largo plazo. Se ha demostrado también su capacidad de diferenciación a células de las tres capas embrionarias. Todas estas propiedades, sumadas a la ausencia de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH o HLA) de clase II y de moléculas co-estimuladoras de Linfocitos T, sugieren que las CME-D podrían constituir un producto seguro para utilización en aplicaciones clínicas en humanos ¹ .

Para ello debe aún demostrarse que las CME-D pueden generarse mediante expansión a escala clínica bajo normas GMP, lo que implica el cultivo empleando medios de grado clínico, libres de productos xenogénicos y en condiciones ambientales estériles, con controles de calidad adecuados. Se debe evaluar también la influencia de diferentes variables en el rendimiento final del producto celular, en sus características fenotípicas y genómicas, así como la capacidad funcional del producto final y su potencial toxicidad clínica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CÉLULAS MESENQUIMALES

2.1.1 CONCEPTO Y ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de las células madre embrionarias pluripotentes (ESC, *embryonic stem cells*) derivadas del blastocisto embrionario, las células *stem* o células madre se han definido de acuerdo a dos características fundamentales:

- su capacidad de autorrenovación, por su alta tasa de proliferación y su regeneración clonal mediante divisiones simétricas
- su potencialidad para diferenciarse a diversos tipos celulares mediante divisiones asimétricas.

El interés de estas células en el campo de la terapia celular y la medicina regenerativa ha crecido a lo largo de los años sobre todo en base a esa capacidad de diferenciación a diversos tejidos.

Entre las células madre se distinguen dos tipos:

- las células pluripotentes, como las células embrionarias, capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares que proceden de las tres capas embrionarias y de la línea germinal
- las células multipotentes, con capacidad de diferenciación algo más restringida, y también denominadas células *stem* o células madre adultas.

La utilización de células de origen embrionario y los métodos empleados para generar células pluripotentes inducidas implican problemas éticos y de seguridad para su traslado a la utilización en clínica, por lo que el interés científico se centra fundamentalmente en la utilización de células madre adultas, con menores implicaciones de este tipo.

De entre éstas, las células madre mesenquimales (CMM) o células mesenquimales estromales (CME), han sido las más ampliamente empleadas tanto para investigación básica como para su utilización preclínica y clínica, dadas sus propiedades biológicas y su relativa facilidad de aislamiento.

Los estudios de Friedenstein y colaboradores de los años 60 y 70² fueron los primeros en describir una subpoblación celular presente en la médula ósea con potencial osteogénico. Esta población de células se caracterizaba por su adhesión a recipientes de cultivo celular (adhesión al plástico) y su morfología fibroblastoide, lo que sugería un origen estromal en la médula.

En su descripción inicial, destacaba su capacidad de formar colonias en cultivo (CFU-f), y su multipotencialidad, con la capacidad de células aisladas de estas colonias de diferenciarse *in vitro* hacia tejidos de linaje mesodérmico.

La denominación de “célula mesenquimal” data de 1991³, y en años siguientes se definieron con mayor detalle tanto las células como su capacidad de diferenciación a múltiples líneas celulares.⁴

Dada la relativa facilidad para su cultivo y expansión, sumada a la multitud de funciones que se les atribuyen, han ido adquiriendo un protagonismo creciente en el campo de la terapia celular.

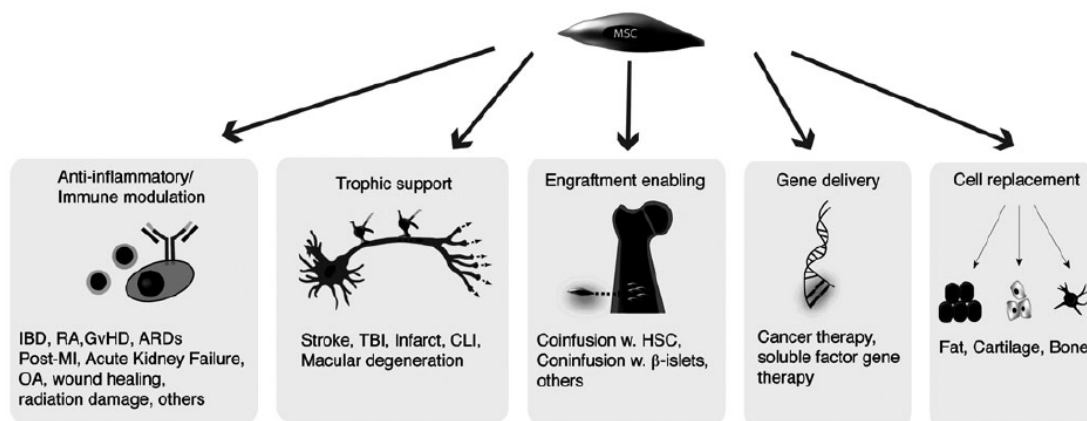


FIG. 1. Multiple modes of action attributed to MSCs include IBD, inflammatory bowel disease; RA, rheumatoid arthritis; GvHD, graft versus host disease; ARDs, acute respiratory distress syndrome; MI, myocardial infarction; OA, osteoarthritis; TBI, traumatic brain injury; CLI, critical limb ischemia; HSC, hematopoietic stem cells; MSC, mesenchymal stromal cell.

Figura 1 Funciones atribuidas a las CME, de Viswanathan et al, 2014.⁵

Entre sus propiedades destacan⁵:

- en la médula ósea, un efecto favorecedor de la hematopoyesis
- actividad inmunomoduladora /inmunosupresora tanto mediante contacto directo como mediante actividad paracrina, con inhibición de la proliferación y de la funcionalidad de linfocitos T y B, así como inhibición de la maduración de NK y macrófagos
- secreción de citoquinas antiinflamatorias
- reparación de tejidos dañados mediante secreción de factores tróficos y/o mediante diferenciación celular directa

Por todo ello, han sido empleadas para numerosas indicaciones, destacando en el campo de la hematología, y más concretamente en el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) por su capacidad de inmunomodulación y por la mejoría del prendimiento del tejido hematopoyético¹⁹.

En el campo de la medicina regenerativa se han empleado para reparación tisular a diversos niveles^{30,31}.

2.1.2 DEFINICIÓN Y NOMENCLATURA

En los años 1990, se generalizó la denominación de las células mesenquimales como células madre o *stem* (células madre mesenquimales, CMM), aunque algunos investigadores omitieron posteriormente el apelativo de célula madre o *stem* en estudios preclínicos y clínicos, dada la ausencia de datos concluyentes que apoyaran su denominación como tal, prefiriendo referirse a dichas células como células mesenquimales estromales (CME) dado su origen.

En 2005, debido a la heterogeneidad de las poblaciones celulares descritas como células mesenquimales en los trabajos científicos publicados, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular -International Society for Cellular Therapy (ISCT)-, propuso una serie de criterios para clarificar la nomenclatura de estas células en trabajos subsiguientes.

Propusieron que se sustituyera la denominación de células madre mesenquimales por la de células mesenquimales estromales pluripotentes, reservando el término “madre” (“*stem*”) a aquellas células que demostraran tanto capacidad de autorrenovación a largo plazo como capacidad para diferenciarse a múltiples tipos de tejido *in vivo*. En cualquier caso, se mantuvieron las siglas MSC, válidas tanto para *mesenchymal stromal cells* como para *mesenchymal stem cells*, dada la generalización de su uso en la literatura científica⁷.

Se reconoció pues la existencia de células madre mesenquimales en el documento elaborado por la ISCT, pero se puntualizó que no todas las células adherentes al plástico aisladas de las distintas fuentes podían considerarse células madre. El término estromal se consideró más correcto dado que, independientemente de la fuente, las células mesenquimales parecen pertenecer al compartimento estromal del tejido del que son aisladas en todos los casos. Además, la denominación “células mesenquimales estromales multipotentes” no conlleva potencial biológico o terapéutico implícito.⁶

Posteriormente, dada la multitud de trabajos publicados y la heterogeneidad de las poblaciones celulares descritas, el Comité de células mesenquimales y células *stem* del ISCT, propuso 3 criterios mínimos para definir estas CME multipotentes de origen humano⁷:

- Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo;

- Inmunofenotipo homogéneo, en el que más del 95% de la población de CME exprese los antígenos de superficie CD105, CD73 y CD90 analizados por CMF, y que esta misma población no exprese (<5% positividad) marcadores de células hematopoyéticas entre otros (CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA clase II);
- Capacidad de diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condroblastos en condiciones estándar de diferenciación *in vitro*.

2.1.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO

En la mayoría de estudios publicados en los que se hace referencia a las células mesenquimales, el origen de éstas es la médula ósea (MO), que es la fuente de la que se aislaron inicialmente por Haynesworth⁸, aunque se ha demostrado a lo largo de los años que CME con características superponibles se encuentran en multitud de tejidos, habiéndose aislado del compartimento estromal no solo de médula ósea, sino también de tejido adiposo, cordón umbilical, placenta, hígado, riñón, corazón y bazo.

En el caso de la MO, generalmente su aislamiento se realiza a partir de aspirados medulares, obtenidos habitualmente mediante punción de la parte superior de la cresta iliaca posterosuperior, aunque alternativamente también se pueden obtener de los compartimentos medulares de esternón, tibia y fémur. El material aspirado es posteriormente cultivado en placas o frascos de cultivo celular, con un medio basal suplementado clásicamente con suero bovino fetal (SBF). Las CME, de acuerdo con la definición previamente descrita, son aquellas con adherencia al plástico en el cultivo, constituyendo entre el 0,001% y el 0,01% del total de las células mononucleadas de la MO. Al mantener el cultivo durante varios días, con los sucesivos recambios de medio se van eliminando las células hematopoyéticas no adherentes, quedando una población homogénea de CME adheridas al plástico. Al microscopio, se observa una población de células con una morfología fusiforme, similar a la que presentan los fibroblastos que, a lo largo de los días del cultivo, van formando colonias que progresivamente van creciendo y uniéndose entre ellas, hasta cubrir la totalidad de la superficie de cultivo. Una vez que esto ocurre, se puede tripsinizar el cultivo para proceder a subcultivos, o pases sucesivos, con la siembra de las CME obtenidas tras este cultivo primario en nuevas superficies de cultivo.

Sin embargo, la expansión de CME mediante cultivo no es ilimitada: tras un número de divisiones las células entran en el estado denominado de senescencia y dejan de proliferar.

En general, el número de divisiones celulares para una célula somática en cultivo es limitado, fenómeno que se conoce como el “límite de Hayflick”, que fue el primer autor en describirlo hace más de 50 años.⁹

Cuando las CME llegan al estado de senescencia, adquieren una morfología más ancha, en “huevo frito”. Múltiples estudios han determinado que estas células, mantenidas de forma prolongada en cultivo, pueden ver mermadas sus propiedades, perdiendo progresivamente su multipotencialidad, su capacidad de diferenciación, y posiblemente afectándose también de alguna manera su actividad inmunomoduladora.

Para valorar la senescencia de las células en los trabajos científicos, se emplean distintos términos, por una parte, se habla de pases en el contexto del cultivo, aunque muchas veces este término no permite una valoración objetiva ya que el número de pases en un cultivo depende de muchos factores, fundamentalmente de la densidad de siembra, que puede no ser homogénea en los distintos trabajos. La medida de la duplicación de la población celular (DP) parece más objetiva y podría permitir la comparación entre distintas publicaciones, aunque se hace referencia a una población celular que puede no ser completamente homogénea. La senescencia en el caso de las CME de MO adulta no parece ocurrir antes de que se produzcan 30 DP¹⁰.

Por otra parte, la senescencia no depende sólo del tiempo de cultivo o de las condiciones del mismo, sino del origen de las propias CME. De hecho, el envejecimiento celular va en paralelo al envejecimiento del organismo, por lo que en donantes de mayor edad, las CME tienen menor capacidad de proliferación, mientras que las células de origen embrionario pueden no presentar signos de senescencia a pesar de cultivos mucho más prolongados. Este fenómeno se denomina senescencia replicativa.¹¹ Así pues, la capacidad de proliferación, medida con las CFU-f, disminuye de forma marcada con cada pase en el caso de CME adultas, y también se ve mermada su capacidad de diferenciación, fundamentalmente adipogénica.¹²

En cuanto a la estabilidad de las células, estudios en cultivos prolongados de CME humanas han demostrado la ausencia de alteraciones genéticas, por lo tanto con escaso riesgo de tumorigénesis de cara a su empleo en la clínica. Desde este punto de vista, se postula también que el empleo de células alogénicas reduciría aún más el riesgo de tumorigénesis, ya que las células serían eliminadas por parte del organismo receptor, evitando transformaciones no deseadas a medio o largo plazo.¹³

2.1.4 POTENCIAL TERAPÉUTICO

Las CME son una herramienta emergente y prometedora en el campo de la terapia celular.

En la MO, forman parte del estroma medular, favoreciendo la hematopoyesis¹⁴, por lo que favorecen el injerto en el contexto del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

Tanto su actividad inmunomoduladora como su capacidad reparadora y regeneradora, con capacidad de diferenciación a distintas líneas celulares de linaje mesodérmico (incluyendo condrocitos, osteoblastos y adipocitos¹⁵) han sido las funciones en las que se ha basado la mayor parte de la investigación científica, tanto a nivel básico como a nivel preclínico y clínico.

2.1.4.1 INMUNOMODULACIÓN

Las CME han demostrado tener capacidad inmunosupresora sin restricción HLA, y por ello se han empleado en la clínica en múltiples escenarios, fundamentalmente en casos de patología autoinmune/autoinflamatoria como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, glomerulonefritis, enfermedad de Crohn, encefalomiелitis, lupus¹⁶, esclerosis sistémica¹⁷, síndrome de Sjögren¹⁸, pero también en casos de reacciones aloinmunes, como en el contexto del TPH, en pacientes que desarrollan enfermedad injerto contra huésped (EICH) en su forma aguda^{19,20,21} o crónica^{22,23}, y en profilaxis²⁴.

Su capacidad de inmunomodulación depende en primer lugar de que las propias CME no producen una alorreactividad significativa, ya que expresan de forma poco intensa antígenos de HLA de clase I, y no expresan antígenos de clase II. Además, tampoco expresan moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 y CD86.

Las CME de MO inhiben la proliferación de células diana que entran directamente en contacto con ellas mediante la producción de indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO) en presencia de IFN gamma. La IDO producida por las CME juega un papel clave en la inducción de LTreg y en la inhibición de la diferenciación a Th17.

Las CME activadas modulan además la respuesta inmune mediante activación de la vía PD-1 (muerte programada), mediante estimulación de la apoptosis de LT a través de la vía FAS, y mediante el aumento de expresión de CD39 y el aumento de la producción de adenosina por parte de las células con las que entran en contacto²⁵.

Las CME también producen de forma constitutiva moléculas como TGF- β , IL10, HLA-G5, prostaglandina E2 (PGE2) y galactinas, lo que les confiere la capacidad de evitar el rechazo y de producir la supresión de linfocitos activados por un estímulo alogénico de forma paracrina^{26,27,28}. La producción de IL-6 también inhibe la diferenciación de los monocitos y favorece la secreción por parte de éstos de IL-10, lo que tiene

un efecto inmunomodulador, antiinflamatorio, y promueve de forma independiente la inducción de linfocitos Treg.²⁹

Actúan a varios niveles y sobre distintas poblaciones celulares:

- Inhiben la proliferación de linfocitos T activados, mediante varios mecanismos, por contacto celular directo, pero también mediante liberación de citoquinas, tanto por parte de las propias CME como de forma inducida por éstas, por otras poblaciones celulares, incluyendo los propios LT o las células NK (*natural killer*). Además, inducen la proliferación de linfocitos T reguladores (LTreg)
- Inhiben la actividad de los linfocitos B (LB), mediante una inhibición directa de su proliferación y una reducción en la producción de IgM, IgA e IgG, sin inducir apoptosis (mediante “detención” en la fase G0/G1).
- Inhiben la actividad de las células NK, tanto mediante contacto celular directo como mediante la liberación de TGFβ1 y PGE2.
- Las células presentadoras de antígenos (APC) también se ven modificadas en presencia de CME, generándose APC con baja expresión de IL-2, TNF-α y HLA clase II, y en cambio elevados niveles de expresión de IL-1β e IL-10, con actividad antiinflamatoria, lo que favorece la actividad de células Th2 productoras de IL-4 y la proliferación de Treg.
- Inhiben la apoptosis de los neutrófilos de forma mediada por IL-6, sin afectar su actividad fagocítica, la expresión de moléculas de quimiotaxis ni de adhesión, produciendo una disminución de la inflamación sin afectar a la capacidad anti-infecciosa.

Las CME constituyen por lo tanto una herramienta muy atractiva como agentes inmunomoduladores por su capacidad de inmunosupresión de la respuesta inflamatoria sin una excesiva merma en la capacidad antiinfecciosa de las células efectoras.

Poseen además la capacidad de activar a las CME progenitoras del receptor, de manera no restringida por el sistema mayor de histocompatibilidad, lo que permitiría que la respuesta antiinflamatoria se perpetuase incluso tras la eliminación de las CME administradas.

2.1.4.2 REPARACIÓN TISULAR

Múltiples estudios tanto clínicos como preclínicos han mostrado la capacidad reparadora de las CME a distintos niveles^{30, 31, 32, 33}. Se han empleado para mejorar la función miocárdica tras cardiopatía isquémica, en casos de daño renal, cirrosis hepática avanzada³⁴, cistitis hemorrágica, neumomediastino³⁵ y otras. Además se ha demostrado el papel de CME en la reparación de tejidos musculo-esqueléticos^{36,37}, siendo especialmente atractivas en este campo por su capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica.

Las CME actúan a distintos niveles también en el campo de la reparación tisular:

- Mediante diferenciación directa a distintos tejidos
- Mediante acción paracrina favorecedora de la diferenciación celular, por secreción de citoquinas con acción inmunomoduladora que condiciona una supresión de la actividad inflamatoria en las zonas dañadas. En este sentido, se ha demostrado que las CME favorecen la reparación del intestino tras dosis altas de radioterapia en ratones, promoviendo la regeneración tisular de forma mediada por IL-6.³⁸

2.1.4.3 APLICACIÓN EN TRAUMATOLOGÍA

Las CME son especialmente atractivas para el campo de la traumatología y la cirugía ortopédica, ya que se suma a su actividad inmunomoduladora y reparadora su capacidad intrínseca de diferenciarse a osteoblastos y a condrocitos.

Los defectos óseos debidos a trauma y a resorción ósea patológica y fisiológica constituyen un problema de salud global. La reparación ósea tras una fractura requiere la formación de nuevo hueso que depende a su vez de una serie de procesos modulados por factores tanto locales como sistémicos. Comprende las fases de hematoma, inflamación, angiogénesis, condrogénesis, osteogénesis y remodelado óseo. Para que se produzca la regeneración ósea son fundamentales la perfusión sanguínea suficiente, la disponibilidad *in situ* de células osteogénicas y la protección del espacio de regeneración frente a la invasión por tejido fibroso.

La formación del hematoma secundaria al daño vascular que se produce en una fractura se acompaña de una respuesta inflamatoria, en la que se liberan citoquinas como IL-1, IL-6 y TNF- β , que favorecen la formación de hueso endocrinal y el remodelado óseo. Factores de crecimiento de la familia del TGF- β y factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), así como factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs), orquestan eventos cruciales

para la condro-osteogénesis, incluyendo quimiotaxis, proliferación y diferenciación del componente celular mesenquimal y osteoprogenitor, y la osificación de la matriz extracelular.

La angiogénesis, clave para la resolución de la fractura, también es regulada a nivel molecular, de forma dependiente a la estimulación de VEGF, por parte de los osteoblastos.

Las fracturas de huesos largos pueden requerir meses hasta su consolidación, existiendo además el riesgo de pseudoartrosis y de retraso de consolidación, así como de discapacidad permanente asociada a la mala consolidación, a la rigidez articular, a la atrofia muscular o a la parálisis simpática refleja que se produce en algunos casos. Cuando se produce una “no-uniión” atrófica, probablemente el mecanismo subyacente implica una alteración en la capacidad biológica de regeneración ósea.³⁹

A pesar de los avances en técnicas quirúrgicas para el tratamiento de fracturas, este sigue siendo un problema que ocasiona morbilidad y discapacidad para los pacientes⁴⁰.

Aunque las CME son escasas en el hueso adulto, están involucradas en la formación del callo de fractura y tienen un papel relevante en la curación de fracturas y la formación de nuevo hueso.

Hasta el momento, el “*gold standard*” para el tratamiento de estos problemas son los autoinjertos óseos, por sus capacidades osteogénica, osteoinductiva y osteoconductiva. Éstos tienen como principales inconvenientes la ausencia de disponibilidad de la cantidad de hueso requerida en caso de defectos óseos grandes o en casos de pacientes pediátricos y los riesgos quirúrgicos relacionados con la obtención del injerto, como sangrado, infección, dolor crónico, etc. En cuanto a los aloinjertos, sus propiedades pueden verse mermadas debido a cambios que se producen en el proceso de esterilización y almacenaje y que pueden producir una pérdida de su capacidad de osteointegración⁴¹. La integración de los injertos óseos dependerá además de la estabilidad mecánica tras el implante y del estímulo de remodelación ósea que se produzca.

Además, sus propiedades biológicas variarán, dependiendo de múltiples factores como el procesamiento al que haya sido sometido, de las condiciones locales y de la situación general del receptor.

Habitualmente, se emplean tanto los auto como los aloinjertos en combinación con biomateriales, que constituyen una herramienta desarrollada en las últimas décadas para su aplicación en traumatología, tratando de imitar la matriz extracelular del hueso, tanto en su composición como en su estructura tridimensional. De esta forma se combinan la capacidad osteogénica del hueso con las propiedades conductivas del material, que permite cubrir defectos de mayor tamaño.

En cuanto al empleo de CME en este campo, en el año 2002 Horwitz y colaboradores describieron cómo, en niños previamente sometidos a TPH por osteogénesis imperfecta, la infusión de CME-MO de los donantes de MO sin acondicionamiento previo, producía una mejoría clínica en estos pacientes. Se

observó un aumento en su tasa de crecimiento, mediado probablemente por la generación de osteoblastos normales a partir de las CME, de las que demostraron prendimiento en piel y hueso de los pacientes⁴².

Se han empleado CME en diversas patologías en el campo de la traumatología: tras lesiones por trauma, en patología oncológica, en casos de necrosis avascular y en pacientes con pseudoartrosis, con buenos resultados aunque con metodologías poco comparables entre estudios⁴³. En los últimos años, se ha estudiado el empleo de las CME en conjunción con biomateriales, ya que las características de éstos permiten su empleo como soporte para las CME, permitiendo su proliferación y/o diferenciación local en el lugar de la lesión.

Los más empleados para este fin son materiales porosos, basados en hidroxiapatita (HA) o en fosfato tricálcico (TCP), aunque también se han empleado esponjas de colágeno o de polímeros biodegradables como vehículo para las CME. Se ha demostrado experimentalmente la capacidad de las CME de adherirse y proliferar sobre partículas de fosfato tricálcico bifásico, formando constructos tridimensionales, con una tendencia a su diferenciación osteoblástica⁴⁴. En casos de cirugías mínimamente invasivas, existe también la opción de utilizar formulaciones inyectables de partículas de fosfato cálcico que pueden ser resuspendidas en hidrogel.

De esta manera, la combinación de biomaterial con CME podría ser una alternativa a los auto o aloinjertos, reduciendo así la morbilidad de estas intervenciones.

En este sentido, Quarto y colaboradores emplearon CME cultivadas en una matriz porosa de HA para el tratamiento de pseudoartrosis y observaron que los implantes estaban integrados tras 7 meses, demostrando años después, mediante angiografía, la vascularización del área reparada⁴⁵. También Marcacci y colaboradores estudiaron, en defectos diafisarios, el empleo de hidroxiapatita porosa como vehículo para CME expandidas, obteniendo buenos resultados, con resolución de los defectos tras 5-7 meses y con buena integración del biomaterial años después de la cirugía⁴⁶. También se han empleado, como vehículo para las CME, gránulos de fosfato tricálcico para el tratamiento de necrosis avascular de la cadera inducida por esteroides⁴⁷.

Por otra parte, se ha sugerido que no todas las células mesenquimales tienen la misma capacidad de diferenciación o de inducción osteogénica. Se ha sugerido en algunos trabajos que la expresión de determinadas moléculas como MCAM/CD146+, CD271, *mesenchymal stem cell antigen-1* (MSCA-1), CD56, SSEA-4, STRO-1, y PDGF-RB; CD140b, podrían constituir un marcador de una mayor capacidad en este sentido. Sin embargo, hasta el momento no se ha podido definir un patrón concreto de expresión antigénica o de secreción de citoquinas específico que pueda ayudar a diferenciar y, en su caso, seleccionar las CME con mayor capacidad osteogénica.⁴⁸

2.2 MÉDULA ÓSEA COMO FUENTE DE CME

La mayor parte de los estudios realizados con CME y mencionados previamente emplean células procedentes de médula ósea (MO).

Para obtener estas células es necesario realizar un aspirado de MO al donante. Se trata de una técnica mínimamente invasiva y que se puede realizar de forma rápida, pero que en ocasiones es molesta para el donante y que requiere anestesia local y/o sedación.

En estos aspirados, la cantidad de células mesenquimales es menor del 0,01%⁴⁹. Para cualquier uso terapéutico de las CME, es necesario un número mínimo de células, pudiendo requerirse cantidades importantes para alcanzar mejores resultados clínicos. En los aspirados de MO su proporción es del orden de 0,001 - 0,00001 %, aunque van disminuyendo con la edad del donante a partir de los 30 años, de forma que en individuos de más de 60 años constituyen del orden del 0,00025-0,00005% de la celularidad obtenida tras aspirar MO. Además, no solo la cantidad sino también la capacidad de proliferación y diferenciación de las CME disminuye con la edad del donante^{50,51}.

Lo más sencillo sería el uso de células de médula ósea fresca autóloga, sin expansión *ex vivo*, ya que de esta manera no es necesaria su obtención anticipada y no son susceptibles de rechazo inmune. Sin embargo, la eficacia de esta técnica será probablemente escasa, debido a la pequeña proporción de CME en la MO adulta, por lo que se administraría al paciente un muy pequeño número de células con capacidad para la estimulación de la osteogénesis, máxime en pacientes de mayor edad.

Por este motivo, es imprescindible el proceso de expansión *in vitro* para la obtención de un número adecuado de células⁵².

El empleo de CME expandidas tendría, por lo tanto, la ventaja de aportar un número de células potencialmente osteogénicas conocido y en cualquier caso mayor que con la administración de MO no procesada. Además es posible criopreservar las CME sobrantes para usos posteriores. Las CME almacenadas de esta manera mantendrían teóricamente su potencial proliferativo y de diferenciación, aunque algunos estudios sugieren que en el proceso de expansión las CME pueden ver mermada su capacidad osteogénica *in vivo*⁵³.

El uso de CME autólogas no conllevaría riesgos de rechazo inmune ni de aloinmunización. Los principales inconvenientes de esta estrategia son, por una parte, la necesidad de realizar una extracción medular al paciente, y, por otra parte, la no disponibilidad inmediata, ya que tras la extracción se debe realizar el proceso de expansión *ex vivo*.

La utilización de CME alogénicas de MO implica varias ventajas, entre las que destacan el poder emplear donantes más jóvenes, pero sobre todo el poder disponer de un “stock” de células criopreservadas y listas para su empleo, pudiendo disponer de múltiples dosis de una única fuente para el tratamiento de uno o varios pacientes, sin necesidad de esperar a la expansión de las CME autólogas una vez que se establece la indicación para el tratamiento. La limitación principal de esta estrategia sería que, pese a su baja capacidad inmunógena, las CME podrían ser rechazadas por el *sistema* inmune de un receptor en ausencia de inmunosupresión, reduciéndose de esta forma la supervivencia de las CME administradas. Además, el paciente podría sensibilizarse, salvo si se trata de un paciente inmunosuprimido, de forma dosis-dependiente, pudiéndose ver aún más limitado el potencial efecto terapéutico con administraciones repetidas de CME procedentes del mismo donante, por lo que la eficacia dependería de la capacidad de la CME de liberar citoquinas en un corto período de tiempo, antes de su eliminación por parte del organismo receptor. Por otra parte, esta estrategia implica la extracción de MO a donantes altruistas.

En cuanto a la vía de administración, las CME alogénicas administradas por vía sistémica se han empleado en casos de EICH en el contexto del TPH, con eficacia demostrada; sin embargo, en pacientes no inmunosuprimidos, en el contexto de la reparación ósea, parece poco probable que puedan alcanzar el foco de fractura en cantidad significativa, ya que son rápidamente eliminadas en las primeras 48 horas tras su infusión. Si por el contrario se emplean localmente, en el foco de fractura, su eficacia es mayor ya que su acción local y paracrina se desarrolla en el lugar de la administración.

La fuente ideal de CME sería por lo tanto una fuente alogénica fácilmente disponible, con escasa inmunogenicidad, de la que se pudieran obtener un número elevado de células tras un corto periodo de expansión *ex vivo*.

2.3 PLACENTA COMO FUENTE DE CME

La placenta constituye una fuente de CME muy atractiva, ya que se trata de un tejido de gran tamaño que se puede obtener de forma aséptica e inocua. Además presenta muy bajo riesgo de infecciones víricas e implica muy pocos problemas éticos, ya que se trata de un tejido que habitualmente se desecha tras el alumbramiento.

Además, las CME de placenta han demostrado en algunos estudios tener un índice de proliferación mayor que las CME de MO⁵⁴ y son escasamente inmunogénicas^{55,56}, lo que hace de la placenta una fuente ideal de CME para uso alogénico.

La placenta es un órgano fetomaterno en el que coexisten tejidos fetales y maternos, por lo que se pueden teóricamente aislar CME tanto de origen fetal como materno. Entre las capas de origen fetal se encuentran el amnios, el corion (corion liso, corion frondoso, vellosidades coriónicas), y el cordón umbilical, y en la cara materna de la placenta se encuentra la decidua, de origen materno, mediante la cual la placenta se ancla al endometrio.⁵⁷

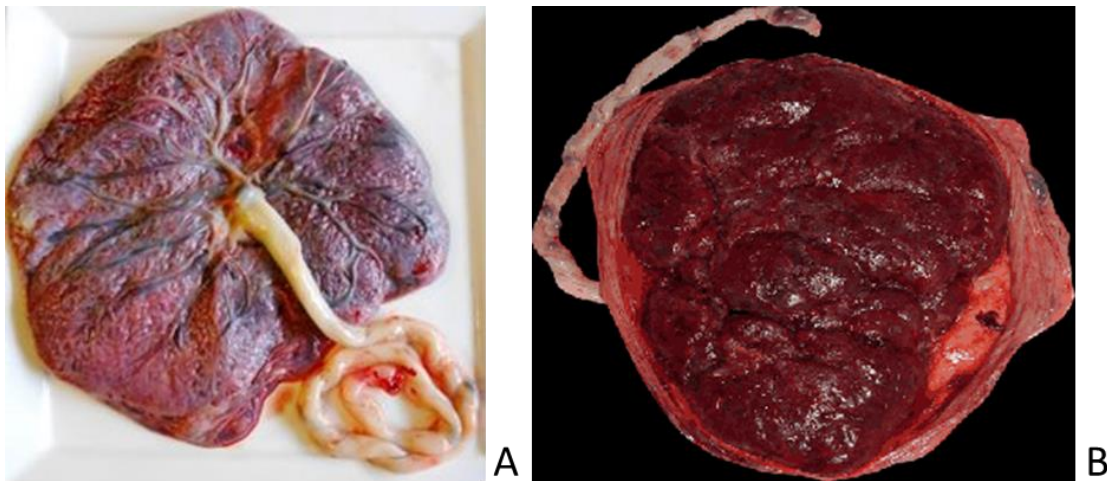


Imagen 1 Placenta humana a término. A: cara fetal, placa coriónica y cordón umbilical cubiertos por el amnios. B: cara materna, cotiledones recubiertos por la decidua

Las CME se han conseguido aislar de todas las capas que conforman la placenta: epitelio amniótico, membrana amniótica, membrana coriónica, vellosidades coriónicas, decidua y placenta total, así como del cordón umbilical, obteniéndose células con características inmunofenotípicas, morfológicas y con capacidad de diferenciación compatibles con CME en todas las capas. Comparadas entre sí, las CME que parecen tener una menor capacidad de proliferación son aquellas procedentes de la membrana amniótica que, además, presentan una morfología menos homogénea⁵⁸. Sin embargo, aquellas que se aíslan de las capas del corion y de la decidua son las que mayor capacidad de proliferación y diferenciación han demostrado⁵⁹. Se pueden obtener también a partir de placenta completa, mediante un procedimiento técnicamente más sencillo que el que implica la separación de las distintas capas, pero con este procedimiento la población celular que se obtiene es poco homogénea, por lo que no se recomienda.

Las CME aisladas de la decidua, de origen materno, son células de origen adulto, pero han demostrado tener una capacidad proliferativa y de diferenciación equiparable, o incluso superior⁶⁰, a las de origen embrionario. Se ha demostrado que estas células tienen características inmunofenotípicas compatibles con CME y que presentan mayor capacidad proliferativa y de diferenciación que las CME obtenidas de otras fuentes adultas, pudiendo diferenciarse no sólo a tejidos mesodérmicos, sino también a tejidos de origen endodérmico y ectodérmico, como pulmón y tejido neural respectivamente, sin por ello presentar inestabilidad genética tras el cultivo¹. Se ha demostrado también su capacidad de diferenciación a tejido hepático y su capacidad de formar estructuras funcionales tridimensionales.⁶¹

Puesto que no expresan HLA clase II ni moléculas coestimuladoras para linfocitos T, podrían ser células escasamente inmunogénicas, lo que las haría susceptibles de ser empleadas en el contexto alógeno. De hecho, estas células probablemente juegan un papel en la tolerancia inmune maternofetal, ya que la placenta existe en un contexto en que la tolerancia inmune es crítica para el desarrollo del feto, y eso puede explicar el hecho de que las CME de decidua han demostrado una mayor capacidad supresora *in vitro*, en cultivos con linfocitos estimulados con aloantígenos, que las CME aisladas de la MO.

Si se compara la actividad inmunosupresora de las CME de placenta frente a las de médula ósea, se observa que, como se ha referido previamente, las CME de MO inhiben la proliferación de células diana que entran directamente en contacto con ellas a través de la vía PD-1, o mediante la producción de IDO en presencia de IFN gamma. Las CME MO también producen de forma constitutiva moléculas como TGF- β , IL10, HLA-G5, PG E2 y galactinas, lo que les confiere la capacidad de evitar el rechazo y de producir la supresión de linfocitos aloestimulados^{26,28}. La producción de IL-6 también inhibe la diferenciación de los monocitos y favorece la secreción por parte de éstos de IL-10, lo que tiene un efecto inmunomodulador y antiinflamatorio, y promueve de forma independiente la inducción de linfocitos Treg⁶². Por lo tanto, la actividad inmunosupresora de las CME de MO no es exclusivamente dependiente del contacto célula-célula.

En cuanto a las CME de decidua, también suprimen la alorreactividad de una manera contacto-dependiente, de forma mediada por IDO, PGE2, PD-L1, e IFN- γ ⁶³, inhiben la activación de LT efectores, probablemente a través de la vía FAS/FAS Ligando⁶⁴ y promueven la inducción y expansión de Treg (CD25highFOXP3+), también de forma mediada por el contacto entre las CME y las células inmunes implicadas. El hecho de que posean un efecto inmunosupresor más dependiente del contacto celular que las CME de MO podría ser de utilidad en un contexto clínico como la EICH en el TPH, ya que se produciría la inmunosupresión local en tejidos dañados, sin afectar los mecanismos de defensa frente a infecciones, lo que podría suponer una ventaja, sobre todo en el contexto de pacientes en tratamiento inmunosupresor sistémico.

Además, en este tipo de pacientes, es muy poco probable que se produzca una sensibilización con desarrollo de anticuerpos antiHLA relacionados con la administración de CME, que sí podrían hipotéticamente producirse en pacientes no inmunosuprimidos⁶⁵.

Por otra parte, podría tener cierta importancia el microambiente en el que se desarrollan las CME, y en este sentido la decidua basal es un tejido que a lo largo de la gestación se ve sometido a estrés oxidativo y a inflamación local. Por este motivo, tanto el perfil de secreción de citoquinas y de factores de crecimiento, como las capacidades de migración al lugar de inflamación y de reparación tisular podrían verse incrementadas en el caso de las CME-D frente a las CME de otras fuentes, como la MO, en la que no existe *a priori* un microambiente proinflamatorio⁶⁶.

En cuanto a su capacidad osteogénica, se ha demostrado que las CME-D son capaces de formar hueso en modelos animales cuando son trasplantadas junto con biomateriales (matriz de HA/TCP)⁶⁷. Se ha demostrado también, tras su administración directa en el hueso, sin biomaterial, que producen un incremento en la densidad ósea, tanto en hueso normal como patológico, y que además reducen la pérdida de hueso en relación con determinadas patologías (como el mieloma múltiple), mediante la inhibición de la formación de osteoclastos y la estimulación de la diferenciación de los osteoblastos del huésped. Probablemente este efecto se deba a la secreción de factores tróficos por parte de las CME, más que a la diferenciación de las propias CME.⁶⁸

Por todo ello, las CME-D parecen una alternativa a las CME-MO en determinados contextos terapéuticos, con ventajas importantes frente a estas últimas, tanto desde el punto de vista práctico (posibilidad de disponer de un stock de células criopreservadas de donantes alogénicos, obtenidas sin necesidad de realizar intervenciones sobre los donantes, obteniendo además un mayor número de células con un menor tiempo en cultivo), como desde el punto de vista del resultado de la actuación terapéutica (menor inmunosupresión sistémica en determinados contextos), sin menoscabo de su eficacia (inmunomodulación y capacidad de regeneración tisular).

Su administración en pacientes con EICHa refractario, aunque en pocos casos, ha mostrado ser seguro y con una eficacia similar a la reportada con CME de MO⁶⁹.

2.4 CULTIVO DE CME PARA APLICACIONES CLÍNICAS

En los comienzos de la investigación acerca del potencial terapéutico de las CME para los diversos usos mencionados anteriormente, se publicaron múltiples estudios experimentales, difícilmente comparables

entre ellos dada la heterogeneidad de técnicas empleadas para el aislamiento, identificación y expansión de estas células.

Para tratar de resolver este problema, en el año 2015 se publicó un documento que pretendía establecer las pautas de producción de CME de MO de acuerdo a normas de correcta fabricación (NCF o normas GMP), para su empleo en protocolos experimentales o clínicos⁷⁰.

En lo que se refiere a la selección del donante, si se emplea un producto autólogo no hay riesgo de transmisión de agentes infecciosos, lo cual supone una ventaja, pero el producto no podría ser preparado de forma anticipada, lo cual sí podría hacerse si se dispone de un donante alogénico, pudiéndose desechar en caso de contaminación microbiológica. En ambos casos, con CME de origen autólogo o alogénico, se podría emplear el producto tanto en fresco como tras su criopreservación y posterior descongelación en el momento de su uso.

En cuanto a los controles de calidad que deben realizarse al producto, destacan el estudio inmunofenotípico de las células, para comprobar que las células expandidas cumplen los criterios definidos por la ISCT, estudios funcionales (en función de la indicación para la que se pretendan emplear: estudios de inmunosupresión in vitro, capacidad de diferenciación, etc.), y estudios de viabilidad.

Idealmente, deberían emplearse para uso clínico células que hayan estado en cultivo el menor tiempo posible, evaluando la senescencia de las CME finalmente empleadas, mediante, por ejemplo, la determinación DP de la población celular final, para evitar inestabilidad genómica y reducir al mínimo el potencial de tumorigenicidad de las CME, aunque éste parece no existir en los estudios que se han realizado en humanos. Para evaluar esta estabilidad genómica, se propone además el estudio del cariotipo en las CME expandidas.

Para asegurar la trazabilidad, sería recomendable conservar una alícuota de las células finalmente empleadas para estudios posteriores en caso de que pudiera aparecer algún efecto adverso a medio-largo plazo en los pacientes tratados con CME.

En la Unión Europea existen requerimientos legales para la utilización de productos de terapia celular, tanto a nivel comunitario como localmente en cada país. Los productos de terapia celular considerados Medicamentos de Terapias Avanzadas (ATMP) según el RD 1394/2007 deben cumplir las Normas de Correcta Fabricación (NCF) o normas GMP y la Agencia Española del Medicamento debe otorgar la licencia para autorizar su producción en un laboratorio especial (salas blancas o sala GMP). Aunque estos requerimientos puedan parecer tediosos y supongan una elevada carga de trabajo burocrático, son clave para tratar de asegurar la calidad del producto finalmente empleado, para así garantizar en la

medida de lo posible, mediante el cumplimiento de estándares estrictos, la seguridad de los pacientes a los que van a ser destinados los productos de terapia celular⁷⁰.

Dada la escasez de CME en los tejidos fuente que se emplean habitualmente, es obligada la expansión *in vitro* para alcanzar una cantidad de células suficiente para su empleo como tratamiento. Dicha expansión se puede realizar con diversos medios de cultivo. La gran mayoría de los medios de cultivo empleados habitualmente incluyen suero bovino fetal (SBF) como suplemento. La utilización de SBF implica el riesgo de zoonosis, por contaminación con virus bovinos, priones, etc., debiendo ser sometido a técnicas de inactivación viral para evitarlo.

Existe también el riesgo de inmunogenicidad potencial por la posible presencia de residuos de origen bovino en el producto final, pudiendo producir respuestas inmunes humorales tras la administración repetida en algunos pacientes. Además, el SBF tiene una composición compleja, que puede redundar en variaciones significativas entre diversos lotes, con diferentes concentraciones o calidad de los componentes, lo que puede hacer que se obtengan resultados muy variables en función del lote empleado. Por todo esto, idealmente, el medio de cultivo empleado para la expansión de células de uso humano debería estar libre de productos xenogénicos y debería emplearse un producto con una menor variabilidad, para obtener unos resultados más homogéneos.

Para ello se han estudiado como alternativa al SBF multitud de suplementos de origen humano que pueden además tener capacidad antibacteriana intrínseca, lo que supondría una ventaja añadida.

Entre estos destacan el suero humano autólogo o alogénico, el plasma humano, el suero de cordón umbilical, y los derivados de plaquetas como lisado plaquetario humano (LP), o el plasma obtenido tras activación de plaquetas por trombina (tPRP, *thrombin-activated platelet releasate plasma*).

Las plaquetas constituyen una fuente de factores de crecimiento y citoquinas con actividad demostrada en reparación tisular y proliferación celular, por lo que todos los productos derivados de ellas son especialmente atractivos para el campo de la regeneración tisular. De todos los suplementos derivados de plaquetas y estudiados en el contexto del cultivo de CME, el LP y el PRP parecen ser aquellos con los que las células consiguen una mejor cinética de expansión, una mayor proliferación⁷¹, con un mayor número de DP, mayor incluso que el obtenido en cultivo con medios clásicos suplementados con SBF, manteniendo sus características morfológicas, inmunofenotípicas y funcionales en cuanto a diferenciación y capacidad inmunomoduladora⁷² tras el cultivo.

Se ha demostrado también que las CME-MO cultivadas con medios suplementados con LP mantienen su actividad inmunosupresora, comparable a la de las CME cultivadas con medios suplementados con SBF, mediante la inhibición de la proliferación de linfocitos T implicados en la reacción inmune inflamatoria,

pero no producen alteraciones en la actividad citolítica de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) activados, manteniendo por tanto activa e íntegra la función antiinfecciosa⁷³.

También se ha estudiado el cultivo de CME obtenidas de fuentes diferentes a la MO en medios suplementados con LP, obteniéndose resultados similares a los previamente descritos, es decir, comprobándose que las CME tras cultivo suplementado con LP mantienen una adecuada capacidad de expansión, con unas características inmunofenotípicas y funcionales (viabilidad, diferenciación, seguridad) sin alteraciones⁷⁴. El efecto positivo del LP sobre la proliferación de las CME parece estar mediado fundamentalmente por los PDGF, y entre ellos, de forma más significativa el PDGF-BB, y por el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factores necesarios aunque no suficientes por sí solos para estimular la proliferación de las CME en cultivo⁷⁵.

Desde el punto de vista de la regeneración ósea, el lisado plaquetario tiene un atractivo adicional como suplemento para el medio de cultivo de las CME, ya que contiene ciertos factores de crecimiento relacionados con la diferenciación y proliferación osteoblástica, con factores de la familia de TGF- β , como como las BMP (*bone morphogenetic proteins*) 2/4 y 6/7⁷⁶, IGF, factor de crecimiento de fibroblastos β , factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas, factor 4 plaquetario, IL-1 y osteonectina^{77, 40}.

El empleo de productos alogénicos de origen humano adulto para suplementar los cultivos, como son las plaquetas y sus derivados, puede también presentar algunos problemas.

La cuestión más importante en lo relativo a la seguridad del producto final es el potencial riesgo infeccioso que implica el empleo de hemoderivados alogénicos. Este problema puede resolverse mediante el empleo de productos destinados a terapia transfusional, por lo tanto extraídos a donantes evaluados según la normativa vigente, para múltiples agentes infecciosos. Para mejorar la seguridad, el producto puede además ser cuarentenado mediante un procedimiento similar al que se utiliza para el plasma fresco congelado. Al tratarse de un producto extraído a donantes diferentes, cabe la posibilidad de que la composición, y fundamentalmente la concentración de factores de crecimiento y citoquinas, varíe, pudiendo por lo tanto variar la eficacia como suplemento del medio de cultivo. En este sentido, se han comparado tanto la cinética de crecimiento de las CME como el rendimiento final tras el cultivo con varios lotes de LP procedente de aféresis de donante único y con varios lotes de LP procedente de "pool" de donantes, sin encontrarse diferencias significativas⁷⁵.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del proyecto es preparar un nuevo producto celular, células mesenquimales estromales de decidua (CME-D) a escala clínica y en condiciones GMP, y que sea apto para la utilización en potenciales aplicaciones clínicas, como la regeneración ósea.

Los objetivos concretos son:

1. Obtener CME-D desde tejido decidual, aislar las CME-D en condiciones asépticas, mantener en cultivo a pequeña escala, realizar subcultivos y criopreservar las CME.
2. Preparar varios lotes homogéneos de CME-D, con el objeto de:
 - 2.1. Caracterizar por inmunofenotipo las CME-D
 - 2.2. Comparar cultivos de CME-D frente a CME de médula ósea
 - 2.3. Estandarizar el cultivo de CME-D con lisado plaquetario
3. Realizar la puesta a punto del cultivo de CME-D en grado clínico.
 - 3.1. Comparar con protocolo estándar de cultivo a pequeña escala.
 - 3.2. Preparar protocolos normalizados de trabajo para la expansión de CME-D en grado clínico
4. Evaluar el producto celular final (en fresco y criopreservado)
 - 4.1 Rendimiento por lote de producción
 - 4.2 Evaluar la calidad del producto:
 - viabilidad
 - análisis microbiológico (esterilidad, Mycoplasma y endotoxinas)
 - inmunofenotipo
 - diferenciación
 - cariotipo
 - estudio con biomateriales

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 CÉLULAS MESENQUIMALES

4.1.1.1 CME DE MO (CME-MO)

Las CME-MO se obtuvieron en el Servicio de Hematología del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda a partir de aspirados de MO de donantes sanos realizados en quirófano tras obtención de consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital.

4.1.1.2 CME DE DECIDUA (CME-D)

Las placentas se obtuvieron del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital 12 de Octubre de Madrid, de madres sanas, tras obtención de consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital, después del alumbramiento en partos a término o tras cesárea, y fueron inicialmente procesadas en el laboratorio de medicina regenerativa del Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre

4.1.2 EQUIPOS

- Campana de flujo laminar de seguridad biológica, Telstar
- Nevera a 4°C y -20°C, Zanussi
- Congelador a -80 °C, Nuaire
- Tanque de nitrógeno líquido, Carburos Médica
- Microscopio óptico invertido con cámara fotográfica, Leica
- Microscopio confocal, Leica SP5
- Balanza, Denver Instrument
- Baño con control de temperatura, P Selecta
- Centrífuga de tubos, Eppendorf
- Incubadora a 37°C con atmósfera humidificada de CO2 al 5%, Thermo Fisher
- Citómetro, Beckman Coulter modelo FC-500
- Espectrofotómetro 570nm, Biorad
- Selladora de bolsas, Baxter
- Conector estéril, Terumo

- Extractores de plasma, Fenwal
- Centrífuga de bolsas, Thermo Scientific
- Termociclador Gene Amp2400, Perkin Elmer Applied Biosystem

4.1.3 MATERIALES DE LABORATORIO

- Pipeteador automático, Drummond
- Puntas de pipeta desechables
- Tubos Falcon de 10 ml, 50 ml, estériles, Corning
- Placas de cultivo p6, Corning
- Placas de cultivo p12, Corning
- Placas de cultivo p24, Corning
- Placas de cultivo p48, Corning
- Placas p96 de fondo plano, Corning
- Tubos 1,5 mL, Eppendorf
- Frascos de cultivo: T25 (25 cm²), T75 (75 cm²), T175 (175 cm²), T1272 (1272 cm²), Corning
- Cámara de Neubauer
- Cámara de isopropanol, Mr Frosty
- Bolsas de transferencia de 600 y 100-150 mL, Terumo
- Jeringas de 1, 2 y 10 mL y agujas estériles, Becton Dickinson
- Guantes estériles
- Solución desinfectante (etanol 70°C)
- Etiquetas
- Frascos de hemocultivos para aerobios, anaerobios y hongos, Becton Dickinson

4.1.4 BIOMATERIALES

- Polybone®, basado en fosfato tricálcico (β -TCP). Kyungwon Medical Co. β -TCP reabsorbible y polifosfato con estructura multiporosa (200-500 μ m) mayor del 75%.
- Engipore®, basado en hidroxiapatita (HA). Finceramica. Compuesto de HA biomimética con una porosidad muy elevada, cercana al 90% en relación con su volumen total. La porosidad está constituida por macroporos con un tamaño entre 200 y 500 μ m y los microporos entre los 80 y 200 μ m.

Ambos biomateriales de uso habitual en clínica.

4.1.5 REACTIVOS

- *MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS*

- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), Gibco
- Alpha MEM (Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification), Lonza
- DMEM sin rojo fenol, Lonza
- PBS, Lonza
- Antibiótico antimicótico: Antibiotic-antimycotic (10.000 U/mL penicilina sódica, estreptomycin 10.000 mcg/mL y 25 mcg/mL de anfotericina B en SSF 0,85%), Gibco
- Tripsina EDTA, Gibco
- Heparina sódica 1000 U/mL, Chiesi
- Kit ALAMAR-BLUE®, Molecular Probes
- Azul tripán, Gibco

- Suero bovino fetal (SBF), HyClone:

El SBF empleado se sometió antes de su utilización a la inactivación del complemento, mediante método térmico (1hora en baño a 56°C).

- Lisado plaquetario (LP):

Para la obtención del LP, se emplearon aféresis de plaquetas de donante único de alto rendimiento, en número de entre 5 y 10 aféresis de donantes diferentes con $3-5 \times 10^{11}$ plaquetas cada una, sin tener en cuenta el grupo ABO de los donantes. Alternativamente, se emplearon aféresis de donante único no empleadas para transfusión y que hubieran estado en agitación durante un máximo de 5 días a 22°C. En cualquier caso, las aféresis provinieron de donantes sanos que cumplieran la normativa de donantes de hemoderivados.

En el caso de disponer de todas las aféresis en el mismo día, se procedió a su procesamiento en las 24h siguientes. En caso de no disponer de todas las aféresis, se procedió a congelarlas tras su obtención para procesarlas una vez hubiera un mínimo de 5 disponibles.

Toda la técnica se realizó en condiciones estériles, en campana de flujo laminar y utilizando un conector estéril para los trasvases bolsa-bolsa. Las bolsas y tubos con LP para cultivo o muestras para análisis siempre se etiquetaron adecuadamente para su correcta identificación.

Se añadió a cada aféresis 5000 UI de heparina, procediendo inmediatamente después a su congelación a -80°C , durante un mínimo de 48 h. Pasado este tiempo, se descongelaron las aféresis en baño a 37°C para conseguir la liberación de los factores de crecimiento plaquetarios, trasvasando después el contenido a bolsas de 600 ml. Estas bolsas se centrifugaron a 900 g 30 min 3 veces, tras lo que se separó el sobrenadante de cada bolsa, de manera que se eliminaran los estromas plaquetarios, que quedan en el fondo de las bolsas. Tras la última centrifugación, se juntaron todos los sobrenadantes y se alicuotaron para su empleo como suplemento del cultivo.

Se extrajeron controles microbiológicos, muestras de retención y se guardaron tanto estas últimas como las alícuotas de LP a -80°C . La caducidad de las alícuotas conservadas a -80°C se considera de 3 años.

El LP almacenado, para su utilización en cultivo, tras su descongelación en baño a 37°C , se centrifugó a 700g durante 10 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante se recogió, pasándolo a un tubo limpio de 15 mL para su utilización posterior. El "pellet" restante, constituido por restos celulares, membranas de plaquetas, etc., se desechó.

A los medios de cultivo suplementados con LP se adicionó heparina sódica a concentración de 1uL/mL.

- Epidermal growth factor (EGF), Immunostep

El EGF empleado (Immunostep), se preparó partiendo de un vial comercial con $1,14\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para obtener una concentración final de $0,2\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$, adecuada para el stock para su uso posterior en cultivo, se realizó una dilución con PBS y HSA al 1%. La concentración final de EGF en cultivo es de 10ng/mL

- *REACTIVOS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO*

- Isotipo FITC, Beckman Coulter
- Isotipo PE, Beckman Coulter
- HLAII-FITC, Beckman Coulter
- HLAI-PE, Beckman Coulter
- CD105-FITC, Immunostep
- CD80-PE, R&D Systems
- CD90-FITC, R&D Systems
- CD34-PE, Beckman Coulter

- CD45-FITC, Beckman Coulter
 - CD73-PE, Beckman Coulter
 - CD31-FITC, Beckman Coulter
 - CD166-PE, Immunostep
 - CD45-FITC, Beckman Coulter
 - CD3-PE, Beckman Coulter
 - CD14-PE, Beckman Coulter
 - CD15-FITC, Beckman Coulter
- *REACTIVOS Y MATERIALES PARA CONTROLES DE CALIDAD*
 - Kit para test de Mycoplasma „Venor® GeM Classic. Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR”, Minerva Biolabs
 - Enzima BIOTAQ™ DNA Polymerasa, Boline
 - Endosafe® PTS™, Charles River
- *MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN*
 - Diferenciación osteogénica: StemXVivo® Osteogenic/Adipogenic Base Media, R&D Systems; StemXVivo® Osteogenic Differentiation Media, R&D Systems
 - Diferenciación adipogénica: StemXVivo® Osteogenic/Adipogenic Base Media, R&D Systems; StemXVivo® Adipogenic Supplement, R&D Systems
 - Diferenciación condrogénica: StemXVivo® Chondrogenic Base Media, R&D Systems; StemXVivo® Chondrogenic Supplement, R&D Systems
- *TINCIONES*
 - Tinción May Grünwald Giemsa, Thermo Fisher
 - Tinciones depósitos de calcio: Alzarin Red S, Sigma
 - Fosfatasa alcalina: kit SIGMA FAST BCIP/NBT, Sigma
 - Tinción de lípidos: Oil Red O, Sigma
 - Anticuerpo Anti- Mouse 488 para detección de osteocalcina, Invitrogene
 - Anticuerpo Anti-Goat 488 para detección de mFAP3 y condrocitos, Invitrogene
 - Anticuerpo osteocalcina humana (Human/Rat Osteocalcin Antibody), R&D Systems
 - Anticuerpo FABP4/A-FABP humano (Human FAB4/A-FABP Antibody), R&D Systems
 - TO-PRO 3 para detección de núcleos celulares, Invitrogene

4.2 MÉTODOS

4.2.1 AISLAMIENTO DE CME

- *AISLAMIENTO DE CME-MO*

Las CME-MO se obtuvieron a partir de aspirados de MO de donantes sanos en el Hospital Puerta de Hierro Majadahonda tras obtención de consentimiento informado aprobado por el Comité Ético de dicho centro.

Se extrajo la MO en condiciones estériles, en quirófano, bajo sedación profunda, mediante técnica aséptica, obteniéndose una cantidad de MO de unos 60 a 80mL por donante, empleada para la obtención de CME-MO de grado clínico. Para los experimentos realizados en este trabajo se emplearon CME-MO sobrantes, donadas para investigación.

Las células mononucleadas (CMN) de MO se aislaron por gradiente de densidad en Ficoll (densidad 1073 g/mL), se lavaron con PBS y, tras conteo en cámara de Neubauer, se sembraron a una densidad de 160.000 CMN/cm², es decir, 4.000.000 células por frasco de 25 cm², en medio de cultivo DMEM, o bien AlphaMEM, suplementado con SBF al 10% o alternativamente con LP al 5%, asociando penicilina/estreptomicina al 1%.

El primer recambio de medio se realizó entre los días 3º y 7º de cultivo, tras agitar suavemente el frasco para despegar las células no adheridas y retirando todo el sobrenadante. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar 80-90% de confluencia, momento en el que se tripsinizaron para su posterior criopreservación y/o expansión.

- *AISLAMIENTO DE CME DE DECIDUA*

Las placentas utilizadas se obtuvieron de partos o cesáreas de madres sanas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, previa firma de consentimiento informado, aprobado por el Comité Ético de dicho centro.

El procesamiento de las placentas se realizó en el Laboratorio de Medicina Regenerativa del Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre, bajo la dirección de la Dra. Ana Isabel Flores de la Cal. Las membranas placentarias (amnios, corion y decidua parietalis) fueron disecadas y lavadas con PBS y

antibióticos (100 UI de penicilina y 100 µg/mL estreptomina), para eliminar los hematíes. Los tejidos placentarios se sometieron a digestión enzimática con tripsina a 37°C, descartándose las células obtenidas tras los primeros 10 minutos de digestión para excluir el residuo. Las suspensiones celulares obtenidas tras dos procesos de 30 minutos de digestión enzimática se sometieron a centrifugación a 400 x g durante 10 minutos, resuspendiéndose después en PBS con EDTA 2 mM y albúmina humana al 0.5%. Posteriormente se lisaron en una solución de cloruro de amonio al 0,8% durante 15 minutos, con el fin de eliminar los eritrocitos residuales.

Las células obtenidas se contaron en cámara de Neubauer y en contador automático y se sembraron a una densidad de $1,16 \times 10^5$ células/cm² en el medio de cultivo DMEM, suplementado con glutamina 2mM, piruvato sódico 0,1 mM, β-mercaptoetanol 55 µM, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina/estreptomina al 1%, SBF al 10% y EGF a una concentración de 10 ng/mL. Se mantuvieron en incubador a 37°C, 5% CO₂ y humedad 95%.

Las células no adherentes tras 5 días de cultivo se eliminaron mediante lavado. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar 80-90% de confluencia, momento en el que se tripsinizaron y se resembraron a una densidad 1×10^4 células/cm², o se criopreservaron¹ para su utilización posterior, en viales con un contenido de 100.000 CME por vial.

Dichos viales fueron remitidos al Hospital Puerta de Hierro para realizar los experimentos detallados en este trabajo.

Algunas de las CME de decidua se mantuvieron en cultivo de forma prolongada para evaluar su crecimiento.

4.2.2 TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO

Una vez que la monocapa presentó confluencia de 80-90%, se retiró el medio de cultivo. Se lavaron los pocillos o frascos de cultivo con PBS, dos veces. Se añadió la cantidad de tripsina-EDTA necesaria según la superficie a cubrir, dejándose actuar un mínimo de 5 minutos a 37°C, y comprobándose posteriormente al microscopio que las células de la monocapa se hubieran despegado. En caso de permanecer adheridas, se dejó actuar la tripsina otros 5 minutos. A continuación, se recogieron las células, bien con PBS o bien con medio de cultivo completo, con el fin de inactivar las enzimas presentes en el medio de tripsinización. Posteriormente, se realizó un lavado, centrifugando a 1500rpm durante 6 minutos, y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio completo.

Finalmente, se realizó un conteo manual según se describe en el apartado correspondiente, con el fin de ajustar la concentración para continuar el cultivo como se ha descrito anteriormente.

4.2.3 MANTENIMIENTO DE CME EN CULTIVO

Para el mantenimiento en cultivo de las CME tras el primer pase, tras conteo de las células tripsinizadas, se ajustó la concentración celular para sembrar 4.000 células/cm².

Las células se sembraron con el medio de cultivo completo escogido en cada caso, con un volumen dependiente de la superficie en cultivo. Se cambió el medio dos veces por semana, hasta la siguiente tripsinización.

A lo largo del cultivo, se observaron al microscopio las CME, al menos, dos veces por semana, para comprobar su proliferación y su morfología. Además, antes de cada cambio de medio se controló mediante observación directa el medio en el que se encontraban las células, para asegurar que no existían partículas en suspensión ni cambios en el pH que pudieran comprometer la calidad del cultivo.

4.2.4 CRIOPRESERVACIÓN DE CME

Antes de iniciar el proceso de criopreservación, se comprobó que la cámara de isopropanol que se fuera a utilizar se encontraba a 4°C.

Se preparó la solución de criopreservación (en una batea con hielo), compuesta de:

- 45% PBS a 4°
- 15% DMSO (a temperatura ambiente)
- 40% Albúmina a 4°

Primero se mezclaron el PBS y el DMSO, ya que con esta mezcla se produce una reacción que desprende calor, y se puso la mezcla en hielo -para evitar la desnaturalización de las proteínas de la albumina con el calor-. Finalmente se añadió la albúmina y se mantuvo la solución de criopreservación en hielo hasta su utilización.

Los criotubos se rotularon con los siguientes datos:

- identificación de la muestra
- cantidad de células
- volumen de congelación
- fecha

Se centrifugaron las células, a 2000 rpm sin freno durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogió posteriormente el sobrenadante con pipeta y se añadieron 800 µL de PBS (para 1 criotubo con un volumen de 1,6mL). Se puso el tubo en hielo, y se fueron añadiendo 800 µL de Solución de Criopreservación gota a gota y en agitación. Se añadió la muestra al criotubo. Por último, se colocó el criotubo en la caja de isopropanol y se llevó al congelador de -80°C. Tras 24h se pasaron los tubos desde el congelador de -80°C al tanque de nitrógeno líquido, anotando su ubicación en el archivo.

4.2.5 DESCONGELACIÓN DE CME

Las células criopreservadas, almacenadas en tanques de nitrógeno a una temperatura de -196°C, se descongelaron rápidamente en baño, a 37°C.

Una vez descongeladas se recogieron inmediatamente en cabina, en medio completo, y a continuación se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el “pellet” obtenido en 1 o 2 mL de medio de cultivo.

4.2.6 CONTAJE DE CME

Para contar las células viables en una suspensión celular se utilizó el método de exclusión con azul tripán. Para ello, se añadió a un volumen determinado de la suspensión celular (habitualmente 100 µL, aunque este volumen puede variar en función de la concentración celular estimada), 20 µL de una solución de colorante vital azul tripán al 0,4% en PBS. Se homogeneizó la muestra, cambiando después de punta. Se cargaron 20 µL de la muestra en una cámara de Neubauer y se procedió a contar las células en el microscopio. Se consideraron células viables aquellas que presentasen un perímetro circular con borde regular y sin tinción azul intracelular, y como células no viables aquellas teñidas de azul.

La cámara de Neubauer es una herramienta empleada para el recuento celular en medio líquido. Se trata de un portaobjetos de 1mm² de superficie, y con dos zonas ligeramente deprimidas, con una profundidad de 0,1mm, en las que hay marcada una cuadrícula de dimensiones conocidas, cuyos bordes son visibles por microscopía óptica. La cámara se cubre con un cubreobjetos que se adhiere por simple tensión superficial, dando cabida a un volumen de líquido conocido, en total los 20 µL cargados de la muestra en la que se mezcla la suspensión celular con el azul tripán. En base a la cantidad de células contadas, se puede calcular la concentración de células por unidad de volumen en la muestra inicial, gracias a la siguiente fórmula simplificada:

$$\text{Concentración (células/mL)} = M \times \text{índice de dilución} \times 10.000,$$

siendo M la media de las células contadas por cuadrado grande (que se constituye de 16 cuadrados pequeños) de la cámara.

El conteo automático se realizó en el contador automático Sysmex XT-2000i-1.

4.2.7 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE CME

Para evaluar la morfología de las CME en cultivo, se observaron al microscopio a lo largo del mismo, comprobando al menos dos veces por semana que las CME presentaban su característica morfología fibroblastoide y que proliferaban formando colonias que, con el paso de los días, iban confluyendo entre ellas hasta alcanzar la confluencia total sobre el plástico, ocupando el 80-90% de la superficie en cultivo.

Se realizó, tras la finalización de los cultivos a pequeña escala, tinción May-Grünwald-Giemsa para evaluación morfológica. Para realizar las tinciones de las placas o de los frascos de cultivo, en primer lugar se retiró todo el sobrenadante, lavando a continuación bien la placa o frasco de cultivo con PBS. Posteriormente, se dejó secar la placa o frasco de cultivo a temperatura ambiente. Una vez seco, se añadieron unas gotas de colorante May-Grünwald con una pipeta Pasteur, en cantidad suficiente para asegurar la cobertura de toda la superficie a teñir. Se incubó durante 30 segundos, añadiendo a continuación 1 mL de agua destilada, agitando después para mezclarla con el colorante, e incubando durante 3 minutos. Pasado este tiempo, se lavó añadiendo 2-3 mL de agua destilada y decantando.

Para la preparación del colorante Giemsa, se diluyeron 2-3 gotas de colorante por cada mL de agua destilada. Una vez preparado, se añadió la dilución a la placa o frasco de cultivo, en cantidad suficiente para cubrir toda la superficie a teñir, incubando durante 15 minutos. A continuación, se lavaron las placas o frasco de cultivos añadiendo 2-3 mL de agua destilada y decantando, repitiendo el proceso de lavado hasta 3 veces. Finalizado este proceso, se dejaron secar las placas o frasco de cultivos durante al menos seis horas, para observar después en el microscopio invertido.

4.2.8 CARACTERIZACIÓN DE CME MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la realización del inmunofenotipo por citometría de flujo, se separó una pequeña cantidad de células (1×10^6) en un tubo con un volumen de 200-300 μ L. Se lavaron las células con PBS, centrifugándolas a 1600 rpm durante 7 minutos. Se descartó posteriormente el sobrenadante, resuspendiendo el "pellet" obtenido en 1-1,5 ml de PBS. De esta suspensión celular, se añadieron 100 μ L a cada uno de los 8 tubos de citometría:

- Tubo 1. Isotipo FITC/PE
- Tubo 2. HLAII-FITC + HLAI-PE
- Tubo 3. CD105-FITC + CD80-PE
- Tubo 4. CD90-FITC + CD34-PE
- Tubo 5. CD45-FITC + CD73-PE
- Tubo 6. CD31-FITC + CD166-PE
- Tubo 7. CD45-FITC + CD3-PE
- Tubo 8. Sin anticuerpos

Se incubaron los tubos durante 20 minutos, en oscuridad, a temperatura ambiente. A continuación se lavaron añadiendo 2mL de PBS a cada tubo y centrifugando después a 1600 rpm 7 minutos, descartándose después el sobrenadante y resuspendiendo en 400 µL de PBS. Posteriormente se realizó la adquisición en el citómetro utilizando el un panel previamente elaborado de acuerdo a las características esperadas para las CME, que se detallan en la siguiente tabla.

Antígeno	Expresión > 95%	Positividad < 2%
HLAI	X	
HLAII		X
CD105	X	
CD90	X	
CD73	X	
CD166	X	
CD34		X
CD45		X
CD80		X
CD31		X
CD3		X
CD14		X
CD15		X

Tabla 1 Características inmunofenotípicas de las CME (ISCT)

En el caso de que alguno de los marcadores del panel establecido estuviera fuera del rango esperado, se marcarían dos tubos extra, con la siguiente combinación de anticuerpos:

- Tubo 9. CD45-FITC + CD14-PE
- Tubo 10. CD15-FITC + HLA I-PE

4.2.9 ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN

4.2.9.1 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

Para el ensayo se emplearon 2 placas p6, una para llevar a cabo el ensayo de diferenciación y la otra utilizada como control.

En primer lugar se prepararon CME-D en cantidad suficiente para llevar a cabo el ensayo, teniendo en cuenta que la placa p6 tiene una superficie de $9,5\text{cm}^2$ por pocillo, para sembrar a una densidad de 4 000 células/ cm^2 son por lo tanto necesarias 38 000 células por pocillo, y por lo tanto 228 000 células por placa p6.

Para preparar el medio de cultivo, se atemperó y se añadió antibiótico (penicilina/estreptomicina) al medio *StemXVivo*[®]Osteogenic/Adipogenic Base Media, en una concentración del 1%.

La placa p6 destinada al control negativo (placa CONTROL) se sembró a una densidad de 4.000 células/ cm^2 , con 1,5 ml de medio por pocillo, empleando medio de cultivo habitual (medio "GMP", suplementado con LP). Se mantuvo en cultivo siguiendo el protocolo habitual. El medio de la placa CONTROL se recambió cada 3-4 días y se mantuvo en cultivo hasta la finalización del experimento.

Para la placa p6 destinada a la diferenciación (placa ÓSEA), las células se sembraron a la misma densidad, en 1,5 mL de medio *StemXVivo*[®]Osteogenic/Adipogenic Base Media por cada pocillo (en total 9mL de medio para toda la placa) y se mantuvieron en cultivo a 37°C en incubador siguiendo el procedimiento habitual. Se recambió el medio base cada 3-4 días, hasta que la confluencia de la monocapa llegó al 50-70%. Llegado este punto, se recambió el medio de la placa ÓSEA sustituyendo el medio BASE por el medio de diferenciación osteogénica. Para la preparación del medio de diferenciación osteogénica, se realizó una dilución 1:20 de medio *StemXVivo*[®]Osteogenic Differentiation Media en el *StemXVivo*[®]Osteogenic/Adipogenic Base Media.

Tras 2 o 3 semanas de cultivo en medio de diferenciación, tras observar cambios fenotípicos en las células, se llevaron a cabo las tinciones pertinentes para su evaluación (tinciones de depósitos de calcio, fosfatasa alcalina, osteocalcina).

4.2.9.2 DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

Para el ensayo se emplearon 2 placas p6, una para llevar a cabo el ensayo de diferenciación y la otra utilizada como control.

En primer lugar se prepararon CME-D en cantidad suficiente para llevar a cabo el ensayo, teniendo en cuenta que la placa p6 tiene una superficie de $9,5\text{cm}^2$ por pocillo, para sembrar a una densidad de 4 000 células/ cm^2 son por lo tanto necesarias 38 000 células por pocillo, y por lo tanto 228 000 células por placa p6.

Para preparar el medio de cultivo, se atemperó y se añadió antibiótico al medio *StemXVivo*[®]Osteogenic/Adipogenic Base Media, en una concentración del 1%.

La placa p6 destinada al control negativo (placa CONTROL) se sembró a una densidad de 4.000 células/cm², con 1,5 ml de medio por pocillo, empleando medio de cultivo habitual (medio "GMP", suplementado con LP). Se mantuvo en cultivo siguiendo el protocolo habitual. El medio de la placa CONTROL se recambió cada 3-4 días y se mantuvo en cultivo hasta la finalización del experimento. Para la placa p6 destinada a la diferenciación (placa ADIPO), las células se sembraron a la misma densidad, en 1,5 ml de medio *StemXVivo*[®]Osteogenic/Adipogenic Base Media por cada pocillo y se mantuvieron en cultivo a 37°C en incubador siguiendo el procedimiento habitual.

Se recambió el medio base cada 3-4 días, hasta que la confluencia de la monocapa llegó al 100%. Llegado este punto, se recambió el medio de la placa ADIPO sustituyendo el medio BASE por el medio de diferenciación adipogénica.

Para la preparación del medio de diferenciación adipogénica, se realizó una dilución 1:100 de medio *StemXVivo*[®]Adipogenic Differentiation Media en el *StemXVivo*[®]Osteogenic/Adipogenic Base Media.

Tras 2 o 3 semanas de cultivo en medio de diferenciación, tras observar cambios fenotípicos en las células, se llevaron a cabo las tinciones pertinentes para su evaluación (tinción Oil Red, FABP-4).

4.2.9.3 DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA

Para el ensayo de diferenciación condrogénica, para preparar el medio de cultivo, se atemperó y se añadió antibiótico al medio *StemXVivo*[®] Chondrogenic Base Media, en una concentración del 1%.

Para preparar el medio completo de diferenciación condrogénica se añadió *StemXVivo*[®] Chondrogenic Supplement al *StemXVivo*[®]Chondrogenic Base Media en una dilución 1:100.

Se emplearon 2 placas p24, una para llevar a cabo el ensayo de diferenciación (placa CONDRO) y la otra utilizada como control (placa CONTROL).

En primer lugar se prepararon CME-D en cantidad suficiente para llevar a cabo el ensayo, teniendo en cuenta que la placa p24 tiene una superficie de 0,15cm² por pocillo, para sembrar a una densidad de 4000 células/cm² son por lo tanto necesarias 600 células por pocillo. Se sembraron 6 pocillos en cada placa, necesitándose por lo tanto 3600 células por placa p24. Las CME se sembraron con medio de diferenciación condrogénica completo, con un volumen de 320 µL por pocillo, recambiándose cada 2-3 días. En la placa control se empleó medio de cultivo habitual (medio "GMP", suplementado con LP). Se mantuvo en cultivo siguiendo el protocolo habitual. El medio de la placa CONTROL se recambió cada 3-4 días y se mantuvo en cultivo hasta la finalización del experimento.

4.2.10 EVALUACIÓN DE DIFERENCIACIÓN

4.2.10.1 EVALUACIÓN DE DIFERENCIACIÓN OSTEÓGENICA

- Tinción de depósitos de calcio

Para evaluar los depósitos de calcio en las células sometidas a diferenciación osteogénica y en las células empleadas como control negativo, inicialmente se fijaron las células en paraformaldehído al 4%, en PBS 1 X, a pH 7,4, durante 90 minutos en las placas p6. Posteriormente, se lavaron con 1% de albúmina en solución salina. Se tiñeron a continuación con 0,1% de Alzarin Red S (Sigma) en agua destilada con pH 4,1-4,3 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron con 1% de albúmina en solución salina.

Se evaluó la tinción con microscopio de contraste de fases, observándose en rojo los depósitos de calcio.

- Tinción Fosfatasa alcalina

Para evaluar la actividad Fosfatasa alcalina en las células sometidas a diferenciación osteogénica y en las células empleadas como control negativo, inicialmente se fijaron las células en paraformaldehído al 4% en la placa p6 durante 90 minutos. Se diluyó una tableta del kit SIGMA FAST BCIP/NBT en 10mL de agua destilada. A continuación se tiñeron las células con la SIGMA FAST 10 minutos, a temperatura ambiente.

Se evaluó la tinción en microscopio de contraste de fases, manteniendo las muestras siempre húmedas. La tinción azulada indica actividad fosfatasa alcalina.

- Inmunofluorescencia:

Para la evaluación de la diferenciación osteogénica mediante inmunofluorescencia, inicialmente se fijaron las células en paraformaldehído al 4% durante 25 minutos a 4 °C.

A continuación, se realizaron 3 lavados en PBS, de 5 minutos cada uno. Se realizó después un lavado con NH₄Cl 10 mM durante 10 minutos y a continuación un nuevo lavado con Tritón 0,1% durante 10 minutos. Posteriormente se bloqueó la muestra con BSA al 5% durante 30 minutos y se incubó a 4°C, con el anticuerpo primario a una concentración de 15 µg/mL, diluido en BSA al 1%, durante una noche.

A la mañana siguiente se realizaron tres lavados en PBS y posteriormente se incubaron las células con el anticuerpo secundario (Anti- Mouse 488 para detección de osteocalcina) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizaron de nuevo tres lavados con PBS y se marcaron los núcleos con TO-PRO 3 (dilución 1/500 en PBS), durante 30 minutos. Finalmente, se realizó un último lavado en PBS y se montaron las muestras en PBS/glicerol.

Para la visualización de las muestras se empleó un microscopio confocal Leica SP5, con objetivo 10 X con apertura numérica 0,4 y zoom de 2.

Los canales se adquirieron secuencialmente con los siguiente parámetros de excitación y emisión: (488 nm, 500-540 nm) para Alexa 488, (633 nm, 645-750 nm) para Topro-3.

4.2.10.2 EVALUACIÓN DE DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

- Tinción de grasa: Oil Red O

Se realizó la tinción siguiendo instrucciones del fabricante: el colorante se reconstituyó añadiendo a los 60 mg de colorante 20 mL de isopropanol al 100%, obteniendo así la solución de “stock” de Oil Red, estable durante 1 año. Para elaborar la solución de trabajo de Oil Red se mezclaron 3 partes de la solución de “stock” con dos partes de agua, tras mezclar y dejar reposar durante 10 minutos se procedió a su filtrado a través de papel de filtro, obteniéndose una solución de trabajo estable durante 2 horas.

Para realizar la tinción se fijaron las células, para lo cual se eliminó todo el medio, lavando las células dos veces con PBS. A continuación se añadió formalina al 10% a la superficie a teñir, dejando en incubación entre 30 y 60 minutos. Posteriormente, se desechó la formalina y se lavaron las células con agua dos veces. Se añadió isopropanol al 60% y se incubaron durante 5 minutos, tras los cuales se desechó el isopropanol, cubriendo la superficie de cultivo con la solución de trabajo de Oil Red O. Se incubó durante 10 a 20 minutos, tras los que se desechó la solución y se lavaron de nuevo las células con agua 3 veces, hasta desaparecer el exceso de pigmento. Se añadió hematoxilina, incubando durante un minuto tras lo que se eliminó la hematoxilina, lavando a continuación de nuevo 2 a 5 veces las células.

Se cubrieron las células para evitar que se desecaran, observándolas después al microscopio. Con esta tinción, las gotas de grasa se tiñen de rojo y los núcleos de las células de azul.

- Inmunofluorescencia:

La técnica empleada para evaluación por inmunofluorescencia es la misma que la descrita en el apartado anterior (4.2.10.1) pero empleando como anticuerpo secundario Anti-Goat 488, para mFAP3.

Los canales se adquirieron secuencialmente con los siguiente parámetros de excitación y emisión: (488 nm, 500-540 nm) para Alexa 488, (633 nm, 645-750 nm) para Topro-3.

4.2.10.3 EVALUACIÓN DE DIFERENCIACIÓN CONDROGÉNICA

- Inmunofluorescencia:

La técnica empleada para evaluación por inmunofluorescencia es la misma que la descrita en el apartado anterior (4.2.10.1) pero empleando como anticuerpo secundario Anti-Goat 488 para condrocitos.

Los canales se adquirieron secuencialmente con los siguiente parámetros de excitación y emisión: (488 nm, 500-540 nm) para Alexa 488, (633 nm, 645-750 nm) para Topro-3.

4.2.11 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON CFU-F

El ensayo de proliferación con CFU-f tiene como objeto establecer la capacidad clonogénica de las CME en cultivo.

Se realizó a día 0 y en cada uno de los pases (tripsinización y sub-cultivo) de los cultivos de CME-D en condiciones GMP, además del día de la colecta del lote.

En el día 0: se sembraron 200 CME en frascos de cultivo T-25 de 25 cm², en 4 mL de medio de cultivo completo. Este ensayo se realizó siempre por triplicado, identificando cada uno de los frascos de cultivo (#1, #2 y #3). Se recambió el medio de cultivo dos veces por semana. Una vez transcurrido el periodo de cultivo (12 a 22 días aproximadamente), los 3 frascos T-25 se enviaron al laboratorio de Control de Calidad, fuera de la sala de cultivos de la Unidad. Se retiró el medio de cultivo a todos los frascos, se lavaron con 10 mL de PBS y se dejaron secar durante un mínimo de 24 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó una tinción May-Grünwald-Giemsa como se ha descrito previamente (cf. 4.2.7), para a continuación leer al microscopio, contando las agrupaciones mayores de 50 células, que aparecen teñidas de color morado intenso.

Los datos se expresaron en nº de CFU-F-s por millón de CME.

Cada vez que se realizó un sub-cultivo de las CME, se inició una nueva siembra con 200 CME por cada frasco de cultivo T-25, siguiendo la misma metodología descrita previamente. Los frascos de cultivo sembrados se nombraron # 4, # 5 y # 6, y para el siguiente pase, de realizarse, #7, #8 y #9.

4.2.12 CULTIVO DE CMM CON BIOMATERIAL: ENSAYO DE VIABILIDAD CON ALAMAR BLUE

Inicialmente, se sembraron CME en cantidad de 3×10^6 en 3 frascos de cultivo T-175, con medio de cultivo con LP 5%, y se expandieron para su estudio posterior con biomateriales

Para preparar los biomateriales para el ensayo de viabilidad y proliferación, se cortaron, tanto el Engipore como el Polybone, con cuchilla estéril, en cuadrados homogéneos con un tamaño menor al de un pocillo de placa p48, de manera que el biomaterial pudiera quedar dentro del pocillo para el ensayo.

En el día 0 del ensayo, en placa p48 se añadió 1mL de medio a cada pocillo que contiene el material (se añadió cada material a 5 pocillos, de manera que dos de ellos sirvieran de control negativo (sin células), y en los otros 3 pocillos con material se añadieron las células como se describe a continuación.

En el día 1 del ensayo, se tripsinizaron las CME-D en cultivo, según protocolo habitual. Posteriormente se lavaron y, tras el contaje, se ajustaron a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/mL, en medio completo. Tras retirar el medio de cultivo de los pocillos con biomaterial, salvo los pocillos control

negativo, se añadieron 100 μ L de la suspensión celular, muy lentamente sobre los biomateriales. Se incubaron las placas a 37°C en incubador durante 10 minutos. A continuación se recogió el medio sobrante para añadirlo de nuevo sobre el biomaterial, de manera que éste quedara impregnado de la suspensión celular. Se incubaron de nuevo las placas a 37°C en incubador. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 0,9 mL de medio completo y se mantuvieron las placas en incubación a 37°C durante 3 días.

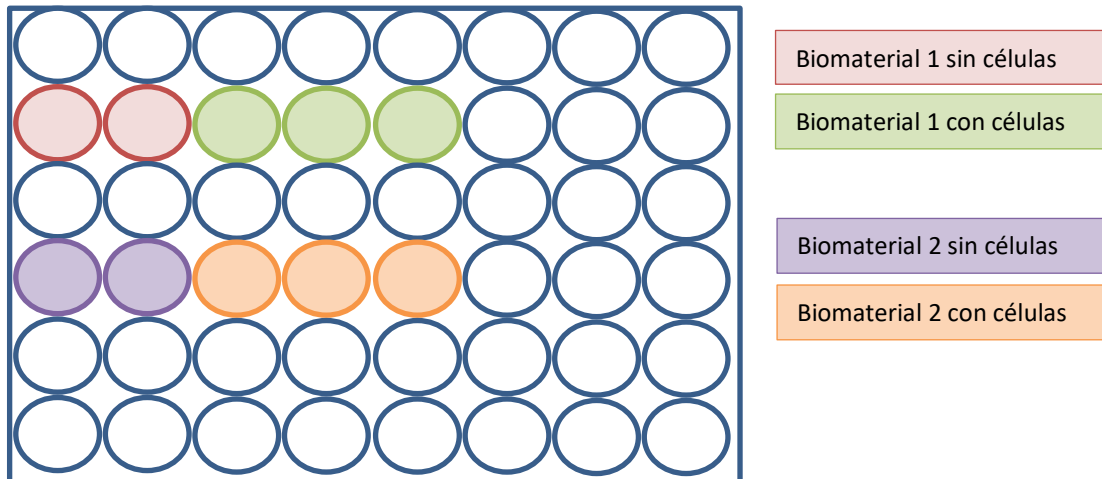


Figura 2 Esquema de placa p48 para ensayo Alamar Blue con biomateriales

En el día 4 del ensayo, se procedió a traspasar los biomateriales a una nueva placa p48 (p48-1). Se lavaron dos veces los pocillos de esta nueva placa con PBS. Tras recoger todo el PBS empleado para el lavado, se añadieron 0,7 mL de AlamarBlue® al 10% en DMEM sin rojo fenol a cada pocillo, comprobando que el material quedaba cubierto. Se incubó la placa a 37°C durante 3 horas. Pasado este tiempo, se recogió una alícuota de 200 μ L del sobrenadante de cada pocillo, que se pasó a una placa p96 de fondo plano, para lectura en espectrofotómetro.

Se añadió PBS a los pocillos de la placa p48 para evitar que se secan las células y los biomateriales, retirándose después todo el sobrenadante, y lavando dos veces con PBS.

Se pasaron los materiales a una nueva placa p48, añadiendo 1mL de medio completo fresco a cada pocillo, e incubando de nuevo a 37°C hasta el nuevo punto de medición, repitiéndose este paso tras cada medición.

Los puntos de medición fueron los días 4, 8, 11, 15 y 18 del ensayo.

Para realizar la curva patrón del AlamarBlue®, se mantuvieron en cultivo CME-D del mismo lote, en T25, en las mismas condiciones que en la placa p48. Se añadieron a la placa p48-1 en concentración conocida, en cada punto de medición.

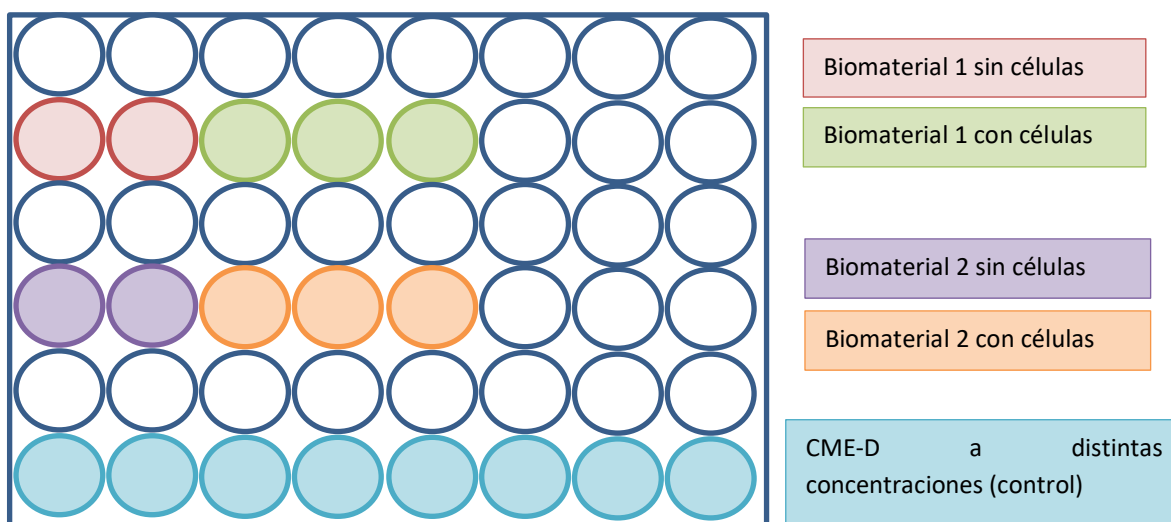


Figura 3 Esquema de placa p48-1 para el ensayo de Alamar Blue con biomateriales

4.2.13 CONTROLES DE CALIDAD

- *TEST DE MYCOPLASMA*

El test de micoplasma se realizó empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la utilización del kit comercial “Venor® GeM Classic. Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR” (Minerva Biolabs) y la enzima BIOTAQ™ DNA Polimerasa (BIOLINE).

Previo a la PCR las muestras problema se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C y se mantuvieron en hielo.

La PCR se realizó en un volumen final de 25 µL añadiendo por cada uno de los tubos los siguientes reactivos:

- 14,3 µL de agua grado PCR (Kit VenorGeM)
- 2,5 µL de Buffer de reacción 10X (BIOLINE)
- µL de MgCl₂ (BIOLINE)
- 2,5 µL de Mix Primer/Nucleótidos (Kit VenorGeM)
- 2,5 µL de Control interno (Kit VenorGeM)
- 0,2 µL BIOTAQ™ DNA Polimerasa (BIOLINE)

Además de estos reactivos se añadieron 2 µL por tubo de cada una de las muestras problema, que habían sido previamente desnaturalizadas. Y por cada ensayo de micoplasma se añadieron dos tubos más:

- Tubo Control Positivo: 2 µL Control positivo (Kit VenorGeM)

- Tubo Control Negativo: 2 µL de agua grado PCR (Kit VenorGeM)

La PCR se realizó en un termociclador Gene Amp 2400 (Perkin Elmer Applied Biosystem) y las condiciones de la amplificación, dadas por el fabricante del kit Venor GeM, fueron:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos.
- Seguimiento de 39 ciclos, cada uno de los cuales está formado por tres etapas:
 - o 94°C 30 segundos
 - o 55°C 1 minuto
 - o 72°C 30 segundos

Una vez finalizada la PCR las muestras se conservaron a 4°C.

Una alícuota de 10 µL de cada una de las muestras, a la que se añadió 2 µL de tampón de carga, se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % en presencia de TAE 1X y 6 µL de Gel Red. La electroforesis se realizó durante 40 minutos a 180 V 500 mA y 250 W.

- *TEST DE ENDOTOXINAS*

Se realizó el ensayo: Lisado de Amebocitos de Limulus mediante el método cromogénico cinético (LAL KCA) utilizando el sistema Endosafe® PTS™, Charles River, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras se tomaron dentro del área GMP, utilizando, tanto para el cultivo como para la toma de muestras y procesamiento de las mismas, material apirógeno (libre de endotoxinas).

En primer lugar se realizó una dilución 1:5 de las muestras estudiadas, con agua LAL (suministrada por el fabricante). A continuación, se cargaron en los cartuchos de sensibilidad 10-0,1 EU/mL (Charles River), recomendados para este tipo de muestras.

Según las indicaciones del fabricante, para que el ensayo de endotoxinas se considerara válido se exigió el cumplimiento de los siguientes criterios:

- ✓ Recuperación de la muestra conocida 50-200% (Spike Recovery = 50-200%)
- ✓ Coeficientes de variación de la muestra problema y de la conocida menores del 25%, es decir, que tanto Sample Rxn Time CV como Spike Rxn Time CV debían mostrar resultados < 25%.

- ✓ Los niveles de endotoxinas en las muestras de estudio se aceptaron sólo si se encontraban por debajo de 1 UE/mL (criterio de aceptación extrapolado de los criterios de aceptación clínicos en ensayos).

- *ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS*

Para la realización de los análisis microbiológicos se inocularon 10-15 mL del sobrenadante, tras la finalización del cultivo, en los frascos de hemocultivos para aerobios y anaerobios.

Los frascos de hemocultivos se incubaron en estufa de hemocultivos a 30-35°C según el protocolo habitual de cultivo de larga duración del Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Puerta de Hierro, manteniéndose en incubación hasta un total de 14 días.

- *ANÁLISIS DE CARIOTIPO*

El análisis de cariotipo de las CME en cultivo se realizó mediante la técnica de detección de bandas G.

Para detener la división celular, se emplearon 190µL de Colcemid y se incubó 4 horas a 37°C en estufa de CO₂ con humedad. Se despegaron las células del soporte de cultivo con tripsina-EDTA 0,05% (previamente atemperada a 37°C). A continuación, la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 50mL y se centrifugó 10min a 1500rpm. El precipitado celular se resuspendió después en KCL 0.075M hasta 15mL y se agitó con vortex. Posteriormente se pasó al baño a 37°C y se mantuvo 45min, pasados los cuales se añadió 1mL de Carnoy, se agitó con vortex y se centrifugó 10min a 1100rpm. Se retiró el sobrenadante con pipeta, se añadieron 20mL de Carnoy y se dejó reposar 1h, pasada la cual se centrifugó 10min a 1100rpm. Tras retirar el sobrenadante se realizaron 3 lavados más con Carnoy o hasta dejar el "pellet" limpio. Se retiró el sobrenadante y se burbujeó echando a continuación un máximo de 2mL de Carnoy tras lo que se burbujeó de nuevo, hasta conseguir una concentración celular adecuada. Las extensiones de metafase se realizaron depositando gotas de la suspensión celular sobre portaobjetos de vidrio limpios.

El análisis se llevó a cabo en un laboratorio especializado externo (Laboratorios Echevarne S.A.).

- *ANÁLISIS DE VIABILIDAD*

Para analizar la viabilidad del producto final criopreservado, se empleó el método de exclusión con azul tripán. Para ello, se añadió a un pequeño volumen de la suspensión celular final descongelada (100 µL),

20 μ L de una solución de colorante vital azul tripán al 0,4% en PBS. Se homogeneizó la muestra, cambiando después de punta. Se cargó 20 μ L de la muestra en una cámara de Neubauer y se procedió a contar las células en el microscopio. Se consideraron células viables aquellas que presentasen un perímetro circular con borde regular y sin tinción azul intracelular, y como células no viables, aquellas teñidas de azul, expresando el resultado final en porcentaje (mediante la fórmula: *(células viables/número total de células) x 100*).

Tras descongelación de un vial de producto final, se realizó este análisis en los siguientes puntos: hora 0 (inmediatamente tras la descongelación), hora 1, hora 24 y hora 48 post-descongelación.

Adicionalmente, se analizaron las características inmunofenotípicas de las CME tras la descongelación en los diferentes puntos horarios referidos, mediante la técnica descrita en 4.2.8 (Caracterización de CME mediante citometría de flujo).

4.3 PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Para la consecución del objetivo principal, preparar un nuevo producto celular, Células Mesenquimales Estromales de decidua (CME-D) a escala clínica y en condiciones GMP, apto para su empleo en la clínica, y entre otras aplicaciones, para la regeneración ósea, se planteó el trabajo experimental en 3 fases.

	FASE I: INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO	FASE II: ESTUDIO "GMP-LIKE"	FASE III: FASE DE PRODUCCIÓN
OBJETIVOS	Generación de "stock" CME-D	Comparación de medios de cultivo para la generación de CME-D	Producción de 2 lotes de CME-D para uso clínico
	Estudios comparativos CME-D y CME-MO en cultivo a pequeña y mediana escala	Producción de 3 lotes de CME-D en condiciones "GMP-like"	Estudios funcionales, de calidad, de estabilidad y viabilidad de las CME-D expandidas
	Análisis de inmunofenotipo, comparación CME-MO y CME-D	Estudios funcionales y de calidad de CME-D expandidas	Estudio del comportamiento de las CME-D expandidas con biomateriales

Tabla 2 Planteamiento experimental en 3 fases

4.3.1 FASE I: FASE DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

Esta primera fase se centró en la obtención de CME-D, de las que se pudiera generar un "stock" de trabajo, para su uso posterior en estudios comparativos con CME-MO en cultivo a pequeña y mediana escala, comprobando las características inmunofenotípicas de las CME en estudio (CME-D) tras el cultivo a pequeña y mediana escala.

Para ello, inicialmente se aislaron las CME-D según se ha descrito previamente en el Laboratorio de medicina regenerativa del IIS del Hospital 12 de Octubre y se enviaron viales con células criopreservadas de 3 placentas diferentes al Laboratorio de Investigación del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Puerta de Hierro, en el que se llevó a cabo el trabajo experimental que se detalla a continuación.

Para generar un “stock” de trabajo de CME-D, se descongelaron viales de pase 1 de CME-D de 3 lotes diferentes, con 100.000 células/vial, que se sembraron con medio de cultivo suplementado con EGF y SBF al 10%. Se retiraron del medio de cultivo previamente descrito para estas células el β -mercaptoetanol y los aminoácidos no esenciales, para equiparar las condiciones de cultivo en la medida de lo posible a condiciones GMP.

Se recambió, según el protocolo, el medio de cultivo dos veces por semana y se observó por microscopía óptica su crecimiento, analizando su morfología y el estado del sobrenadante (pH, turbidez).

Tras alcanzar un 80-90% de confluencia de la monocapa, se procedió a tripsinizar el cultivo según el procedimiento detallado en 4.2.2, realizando posteriormente los subcultivos necesarios para obtener un número de células suficiente como “stock” de trabajo. Se prepararon viales para criopreservar de 1, 2 y 5×10^6 CME-D.

Para comparar la proliferación de las CME-D y de las CME-MO, se establecieron 5 condiciones diferentes de cultivo, denominadas A, B, C, D y E:

CONDICION	FUENTE CME	MEDIO CULTIVO (MC)	PROTOCOLO
A	CME-MO	DMEM + SBF 10% + A/A	Estándar SBF
B	CME-MO	DMEM + heparina + LP 5% + A/A	GMP
C	CME-MO	DMEM + SBF 10% + EGF + A/A	Estándar CME-D
D	CME-D	DMEM + SBF 10% + EGF + A/A	Estándar CME-D
E	CME-D	DMEM + heparina + LP 5% + A/A	GMP

Tabla 3. Condiciones de cultivo para estudio comparativo de cultivo CME a pequeña escala

Las CME-MO se cultivaron en condiciones estándar, con medio suplementado con un 10% de SBF (protocolo “estándar SBF”, condición A de cultivo), en condiciones compatibles con los requerimientos GMP, en medio suplementado con lisado plaquetario al 5% (protocolo “GMP”, condición B de cultivo) y en medio de cultivo suplementado con SBF al que se añadió EGF recombinante (protocolo equiparable al estándar descrito para las CME de decidua, aunque sin aminoácidos no esenciales y β -mercaptoetanol, denominado “estándar CME-D”, condición C de cultivo).

Las CME-D se cultivaron en medio suplementado con SBF y EGF recombinante (protocolo “estándar CME-D”, condición D de cultivo) y en medio suplementado con LP (protocolo “GMP”, condición E de cultivo).

En todos los medios de cultivo se añadió antibiótico/antimicótico al 1% (v/v).

Se sembró 1 pocillo/condición en placa p6, con una densidad de siembra de 4000 células/cm², con 3 mL de medio de cultivo por pocillo. El experimento se realizó por cuadruplicado para confirmación de los resultados (en total se utilizaron 4 placas).

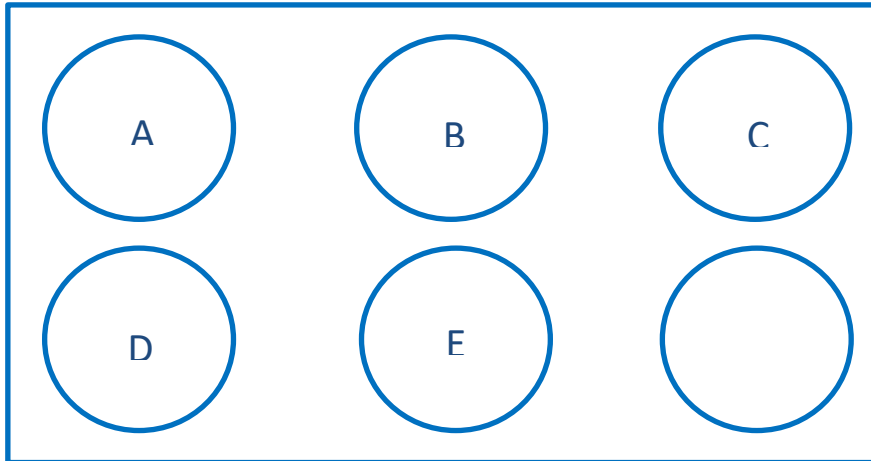


Figura 4 Esquema de las condiciones de cultivo sembradas en cada placa p6 (el último pocillo queda vacío)

Las células se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar confluencia del 80-90% de la monocapa en los pocillos en los que se observó una mayor proliferación.

En ese momento, se realizó tinción May-Grünwald Giemsa de una de las placas para evaluación morfológica. Las otras 3 placas se tripsinizaron para realización de contajes celulares en contador automático.

Para confirmar el origen mesenquimal de las células expandidas, se procedió posteriormente al estudio de su inmunofenotipo por citometría de flujo, analizando las células obtenidas en todas las condiciones de cultivo.

Tras la realización del cultivo comparativo a pequeña escala, se realizó un escalado de cultivo a mayor escala, empleando frascos con superficie de cultivo de 25cm² (T25), manteniendo las mismas 5 condiciones de cultivo que en el experimento anterior (cf. TABLA 3. CONDICIONES DE CULTIVO PARA ESTUDIO COMPARATIVO DE CULTIVO CME A PEQUEÑA ESCALA).

Se sembraron 3 frascos/condición, por triplicado, en T25, con una densidad de siembra de 4000células/cm², con 4 mL de medio de cultivo por cada frasco. Se mantuvieron las células en cultivo hasta alcanzar confluencia de 80-90% de la monocapa en los frascos con mayor proliferación celular.

Tras la finalización del cultivo se realizó tinción May-Grünwald Giemsa de uno de los frascos de cada condición. Los dos frascos de cultivo restantes de cada condición se tripsinizaron y se realizaron contajes celulares en contador automático.

A continuación, se analizó el inmunofenotipo por citometría de flujo de las células expandidas en todas las condiciones de cultivo.

4.3.2 FASE II: FASE DE ESTUDIO EN CONDICIONES EQUIPARABLES A GMP (“GMP-LIKE”)

En esta fase, se aumentó el cultivo de CME-D hasta varios millones de células, comparando la proliferación de las CME en diferentes medios de cultivo, estudiando su comportamiento en condiciones de cultivo GMP, con medios de cultivo de grado clínico, tanto desde el punto de vista de proliferación como funcional, con estudios de diferenciación tras el cultivo y controles de calidad similares a los exigidos para un producto para uso clínico.

Se aumentó la superficie de cultivo empleando CellSTACK®-1272, con una superficie de cultivo de 1272cm². Se compararon los dos medios de cultivo considerados estándar para el cultivo de las CME de decidua:

- El medio suplementado con SBF y EGF, con el que se ha comprobado en estudios previos¹ la adecuada proliferación de las células, manteniendo su funcionalidad y calidad tras el cultivo
- El medio considerado como “estándar GMP”, considerado el más adecuado para la potencial utilización en clínica de las CME

Se sembró un CellSTACK por condición, realizándose con CME-D procedentes de 3 deciduas (donantes) diferentes, repitiéndose el experimento al menos en dos ocasiones para cada donante. La densidad de siembra fue de 4000células/cm² (es decir, 5×10^6 células por CellSTACK), con 300 mL de medio de cultivo por CellSTACK. Se mantuvieron las células en cultivo durante 9 días. Tras la finalización del cultivo se tripsinizaron las células para realizar contajes en contador automático.

En total se produjeron 3 lotes de CME-D en condiciones equiparables a las condiciones GMP, en CellSTACK 1272 como se describe anteriormente, con medio de cultivo “estándar GMP”, suplementado con lisado plaquetario, sin aditivos xenogénicos ni recombinantes, en condiciones equiparables a las requeridas para el cultivo de células para uso clínico. Se mantuvieron las CME 9 días en cultivo,

realizándose tras la finalización del mismo contajes en contador automático para evaluar el rendimiento del cultivo. Se realizó también estudio de CFU-f para evaluar la capacidad clonogénica de las CME en cultivo.

Las CME obtenidas de esta manera se emplearon para estudios funcionales y de calidad:

- Ensayos de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica

- Control de calidad:
 - o Inmunofenotipo
 - o Esterilidad
 - o Test de Mycoplasma
 - o Test de endotoxinas
 - o Cariotipo
 - o CFU-f

4.3.3 FASE III: FASE DE PRODUCCIÓN DE UN PRODUCTO DE TERAPIA CELULAR EN CONDICIONES GMP

Se prepararon 2 lotes de CME-D en condiciones GMP, para uso clínico, evaluando sus características inmunofenotípicas, funcionales, tanto con estudios de diferenciación como con estudios de viabilidad con biomateriales, realizando todos los controles de calidad exigidos a un producto de grado clínico. La expansión de CME-D se realizó con medio suplementado con lisado plaquetario, mediante siembra en CellSTACK®, en condiciones GMP, en la Unidad de Producción Celular del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda. Las células se mantuvieron en cultivo hasta confluencia del 80-90% de la monocapa, momento en el que se tripsinizaron para su recuento. Posteriormente fueron o bien criopreservadas, o bien empleadas en fresco para estudios funcionales y de calidad.

Se realizó también estudio de CFU-f para evaluar la capacidad clonogénica de las CME en cultivo para ambos lotes.

Las CME obtenidas mediante expansión en condiciones GMP se emplearon para estudios funcionales y de calidad:

- Ensayos de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica

- Control de calidad:
 - o Viabilidad

- Inmunofenotipo
- Esterilidad
- Test de Mycoplasma
- Test de endotoxinas
- Cariotipo
- CFU-f

Adicionalmente se estudió el comportamiento de un lote de CME-D en cultivo junto con dos biomateriales elegidos en el seno del proyecto del Plan I+D+i en el que nuestro Laboratorio colaboraba.

La estabilidad y la viabilidad de las CME-D tras descongelación se analizaron también, de acuerdo al procedimiento descrito en 4.2.13.

4.4 UNIDAD DE PRODUCCIÓN CELULAR

La Unidad de Producción Celular del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (UPCHUPH), también denominada “sala blanca”, “sala GMP” o “sala limpia”, es el lugar en el que se realizan los cultivos celulares de larga duración con fines terapéuticos, cumpliendo la normativa vigente para Terapias Avanzadas (RD 1394/2007), y en la que se ha llevado a cabo la FASE III del presente trabajo.

Para la generación de productos de terapia celular aptos para su aplicación en humanos, son imprescindibles una infraestructura adecuada, un estricto *sistema* de calidad de acuerdo con las Normas de Correcta Fabricación y en el caso de España, es necesario obtener la acreditación correspondiente otorgada por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

La Unidad consta de tres esclusas de paso con presiones positivas y nivel de pureza creciente en cuanto al número de partículas en suspensión (para garantizar un ambiente limpio en la generación de productos estériles), conseguida mediante un *sistema* de filtrado del aire con filtros HEPA, una Sala de Cultivos y una Sala de Envasado.

Además, en el entorno de la Unidad se encuentra el Laboratorio de Criobiología (que dispone de congeladores biológicos, tanques de nitrógeno líquido, ultracongelador de -80°C, baño termostático y neveras).

5. RESULTADOS

5.1 FASE I: INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

5.1.1 OBTENCIÓN DE CME-D

El proceso inicial de obtención de CME-D se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina Regenerativa del IIS del Hospital 12 de Octubre de Madrid, como parte del proyecto colaborativo Plan I+D+i SAF SAF2012-40149-C02-01. Las células deciduales se obtuvieron mediante digestión enzimática de las membranas extraembrionarias de placentas y se procesaron según se describe en [1].

Las células adheridas a la placa de cultivo y con morfología fibroblastoide se caracterizaron mediante citometría de flujo.

Los resultados mostraron un patrón de expresión típico de células mesenquimales, con positividad para CD73, CD90, CD13, CD44 y CD105, CD117 y CD29; y negatividad para los marcadores de células hematopoyéticas CD45 y CD34, CD133 y BCRP1.

Las CME-D que se mantuvieron en cultivo de forma prolongada mostraron un crecimiento exponencial entre los pases 2 y 22, siendo la media del tiempo de duplicación (TD) de 129,12 horas.

Partiendo de un número de células de $6,88 \times 10^6$ de media, se obtuvieron tras el cultivo una media de $2,54 \times 10^{14}$ CME, lo que supone un incremento de casi 3700 veces la cantidad inicial de CME, tras una media de 20 pases.

Las CME-D poseen por lo tanto fenotipo mesenquimal (en concordancia resultados publicados previamente)¹ y muestran capacidad de proliferación en cultivo, por lo que pueden ser denominadas células mesenquimales estromales de decidua (CME-D).

5.1.2 GENERACIÓN DE “STOCK” DE TRABAJO DE CME-D

Las CME-D de pase 1 criopreservadas en el Laboratorio de Medicina Regenerativa del IIS del H 12 de Octubre fueron enviadas al Laboratorio de Investigación del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, donde se llevó a cabo su expansión y todos los estudios posteriores.

Tras el cultivo de CME-D de pase 1 de tres lotes diferentes, se obtuvieron los siguientes resultados:

	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
CME-D iniciales	0,1 x 10 ⁶	0,1 x 10 ⁶	0,1 x 10 ⁶
Días en cultivo	29	20	20
CME-D tras cultivo	45,5 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶	6 x 10 ⁶
Incremento	455 x	19 x	60 x
TD	78,8 horas	112,9 horas	81,2 horas

Tabla 4 Rendimiento tras la cultivo de CME-D para generación de "stock" de trabajo

En todos los casos, se comprobó que las células presentaban la morfología característica de las CME, fusiforme, por microscopía óptica, y que a lo largo del cultivo las CME formaban inicialmente colonias separadas, progresivamente confluentes, hasta alcanzar una confluencia completa en la superficie de cultivo, formando haces celulares en toda la superficie.

Se comprobó que el crecimiento observado en el cultivo de las CME-D se asimilaba a lo descrito previamente para las CME-D, así como al crecimiento en cultivo de las CME de otras fuentes, como las CME-MO en la experiencia previa de nuestro laboratorio.

5.1.3 CULTIVO A PEQUEÑA ESCALA, COMPARATIVO ENTRE CME-MO Y CME-D

Para comparar la proliferación de las CME de decidua y de médula ósea, se establecieron 5 condiciones diferentes de cultivo según se describe en 4.3.1

A lo largo del cultivo, la evaluación por microscopía óptica dos veces por semana mostró una proliferación celular similar en todas las placas, con diferencias entre las diferentes condiciones de cultivo pero sin diferencias reseñables entre placas.

Tras 7 días de cultivo se observó confluencia de en torno al 80-90% en los pocillos con mayor densidad celular, por lo que se finalizó el cultivo.

En este punto se realizó tinción May-Grünwald Giemsa de una de las placas para evaluación morfológica.

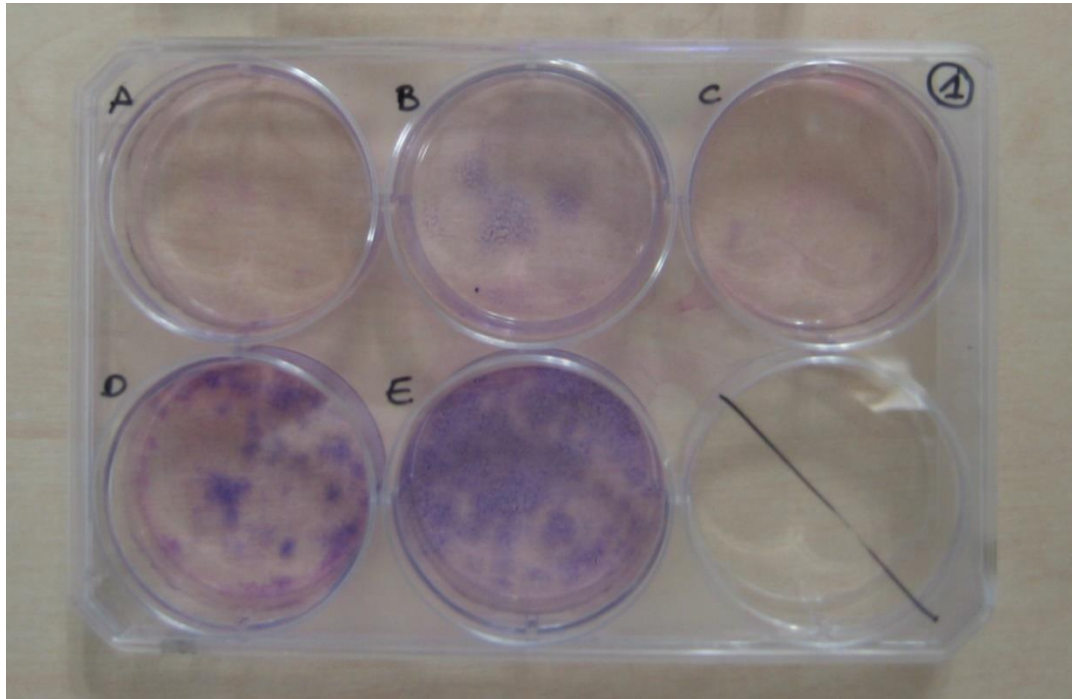
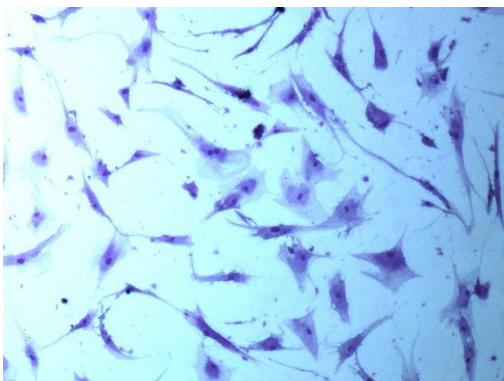


Imagen 2 Tinción May-Grünwald Giemsa de placa p6

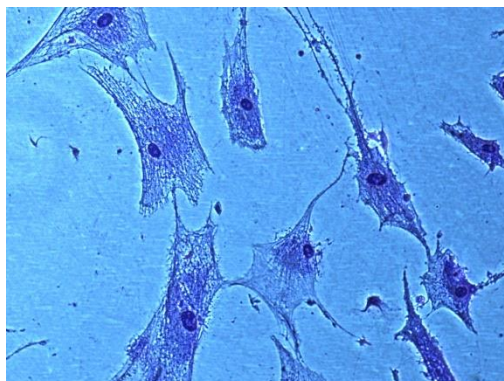
En la observación directa al microscopio y tras tinción May-Grünwald Giemsa se objetivó una mayor densidad celular en los pocillos correspondientes a las CME-D (condiciones D y E), siendo el pocillo con la mayor proliferación el correspondiente a la condición E, en el que se sembraron CME-D con el protocolo denominado "GMP".

En el caso de las CME-MO, la mayor densidad celular también se observó en el pocillo correspondiente a las CME sembradas con el protocolo denominado "GMP" (condición B).

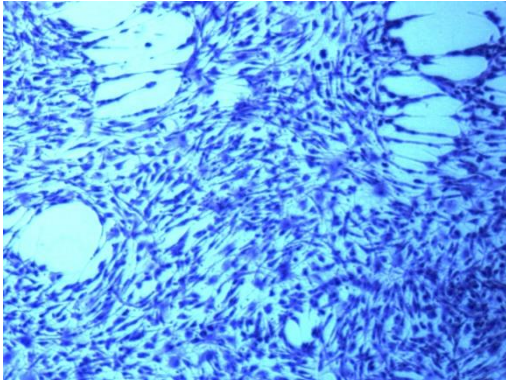
A1



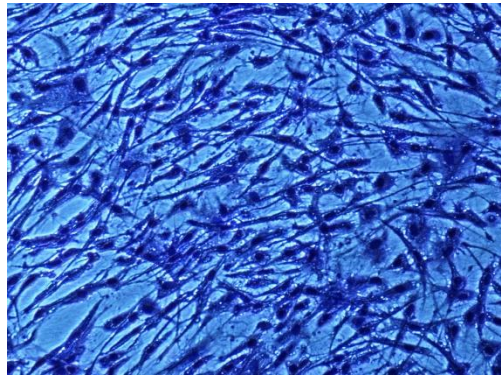
A2



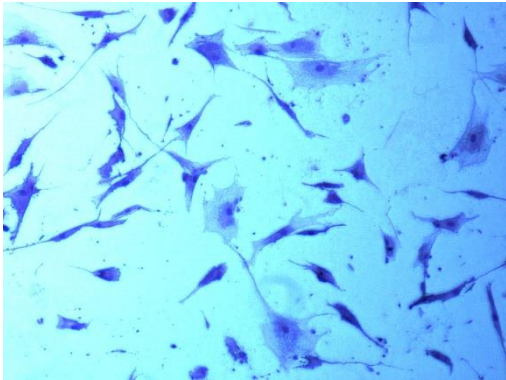
B1



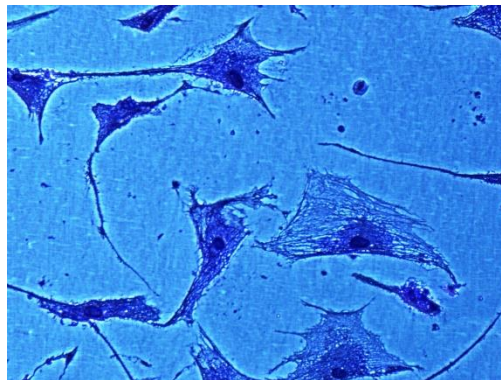
B2



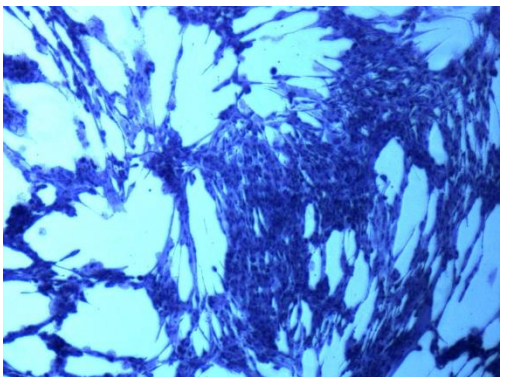
C1



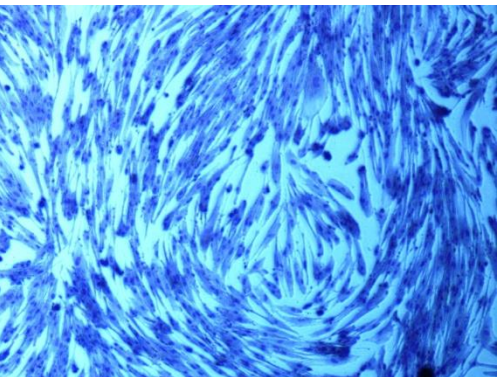
C2



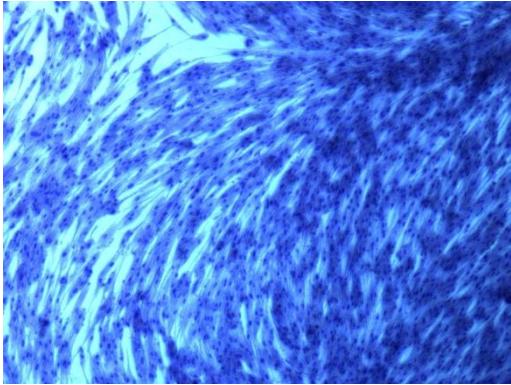
D1



D2



E1



E2

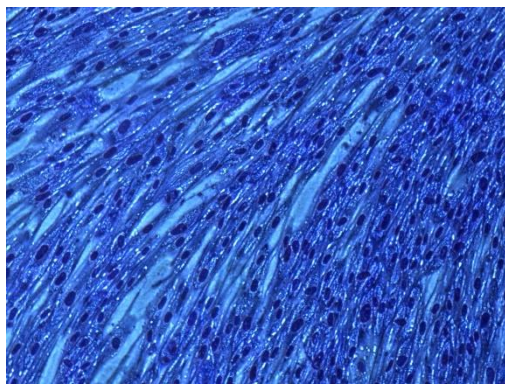


Imagen 3 Fotos de microscopía placa p6, Tinción May-Grünwald Giemsa. A1: condición A, 4x; A2: condición A, 10x; B1: condición B, 4x; B2: condición B, 10x; C1: condición C, 4x; C2: condición C, 10x; D1: condición D, 4x; D2: condición D, 10x; E1: condición E, 4x; E2: condición E, 10x.

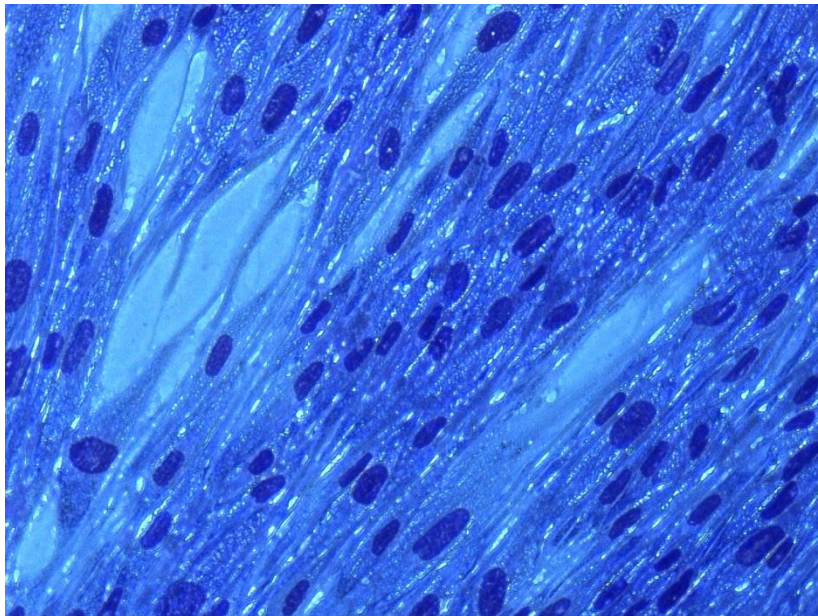


Imagen 4 Tinción May-Grünwald Giemsa. Condición E, CME-D, 20x

En el resto de placas empleadas para el experimento (3 placas p6) se tripsinizaron las células para realizar contajes de las células obtenidas, en contador automático.

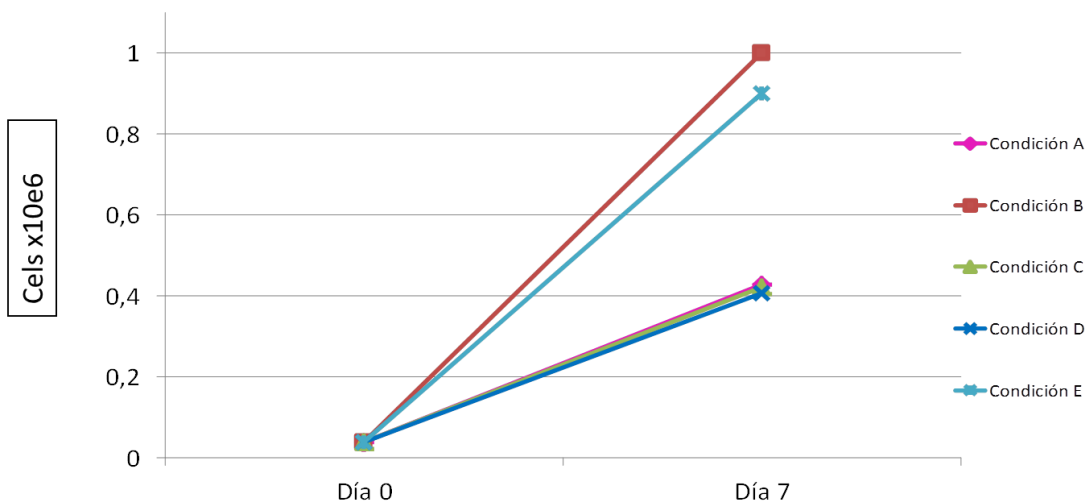
Se obtuvieron los siguientes resultados, de media, tras la realización del experimento por triplicado:

CONDICIÓN DE CULTIVO	INCREMENTO CME-D
A	12,44 x
B	32,84 x
C	12,05 x
D	12,58 x
E	31,26 x

Tabla 5 Resultados tras cultivo comparativo a pequeña escala

Se objetivó una mayor proliferación, tanto para las CME-MO como para las CME-D, con los medios de cultivo suplementados con LP (condiciones B y E), con un rendimiento similar para las células cultivadas en estas condiciones, independientemente de su origen (incremento similar del número de células para las CME-MO y CME-D con el medio denominado "GMP").

Gráfico 1 Rendimiento tras cultivo comparativo a pequeña escala, número de células al inicio y tras finalizar el cultivo



5.1.4 CARACTERIZACIÓN POR INMUNOFENOTIPO

Se confirmó mediante el estudio de citometría de flujo que todas las células expandidas cumplían los criterios de inmunofenotipo establecidos por la ISCT: positividad para CD105, CD73 y CD90, y

negatividad (<5% positividad) para la expresión de marcadores de células hematopoyéticas entre otros (CD45, CD34 y HLA clase II).

	Condición A	Condición B	Condición C	Condición D	Condición E
CD31	0,32	0,08	0	0,13	0,08
CD34	0	0	0	0,02	0
CD45	0,49	0,03	2,7	0,05	0,02
CD80	0,37	0,01	1,47	0	0,02
HLA II	0,85	0,02	1,1	0,11	0,01
CD73	98,9	99,91	89,19	99,95	99,79
CD90	99,54	99,97	100	99,8	99,94
CD105	87,2	75,34	72,06	91,97	91,51
CD166	99,2	99,82	94,12	99,44	99,36
HLA I	90,37	99,03	90,14	97,35	98,52

Tabla 6 Porcentaje de CME positivas por citometría de flujo para los antígenos estudiados tras cultivo a pequeña escala en diferentes condiciones

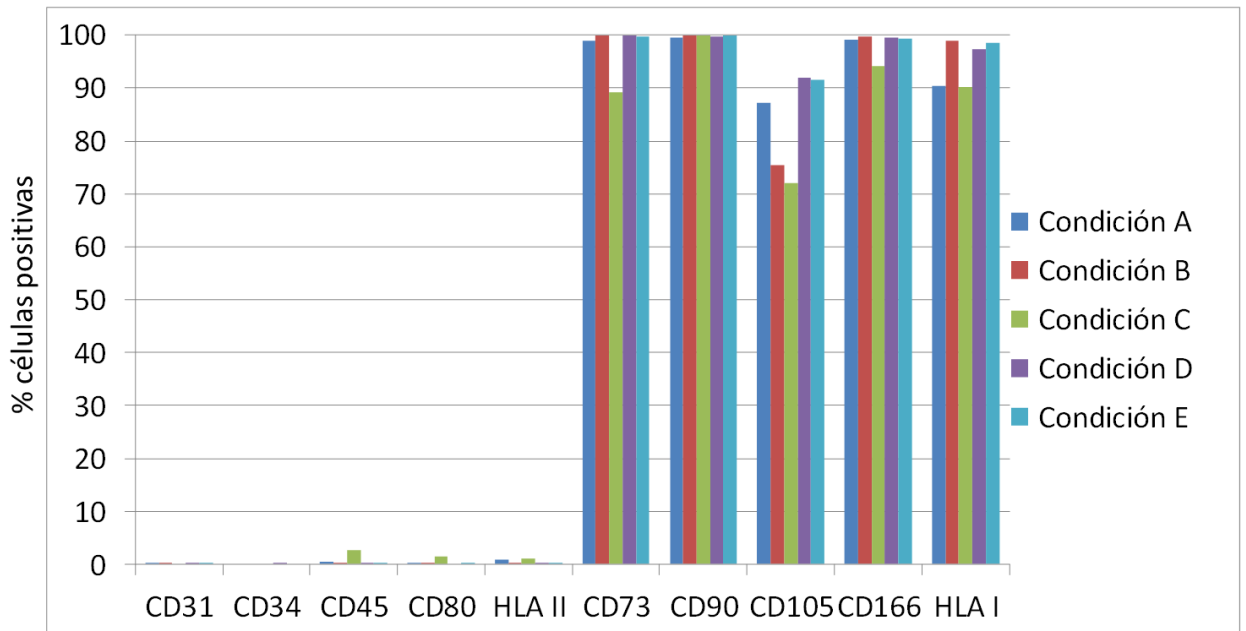


Gráfico 2 Resultados de estudio de citometría de flujo: Positividad de las CME obtenidas tras cultivo a pequeña escala en diferentes condiciones para los distintos antígenos de superficie

5.1.5 ESCALADO DE CULTIVO COMPARATIVO

Una vez comprobada la adecuada adherencia y expansión de las CME con todos los medios de cultivo a pequeña escala, se realizó un escalado del cultivo comparativo, empleando frascos con superficie de cultivo de 25cm² (T25), manteniendo las mismas 5 condiciones de cultivo, durante 8 días.

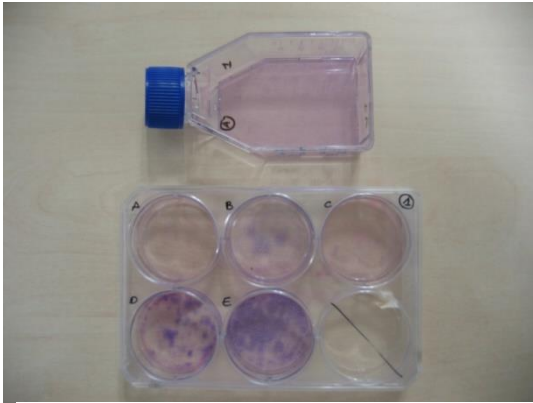


Imagen 5 Imagen de placa p6 frente a frasco de cultivo T25



Imagen 6 Frascos de cultivo T25 de las 5 condiciones de cultivo tras su finalización

El experimento se realizó por triplicado. Se obtuvieron los siguientes resultados:

CONDICIÓN DE CULTIVO	INCREMENTO CME-D
A	3,13 x
B	7,78 x
C	3 x
D	5,26 x
E	9,18 x

Tabla 7 Resultados tras cultivo comparativo a mayor escala (mediana de los triplicados)

Se observó por lo tanto una mayor proliferación de las CME, tanto de decidua como de médula ósea, cuando eran cultivadas en medio suplementado con LP (condiciones B y E).

Además, se observó en general una mayor proliferación de las CME-D (condiciones D y E), respecto a las CME-MO (condiciones A, B y C).

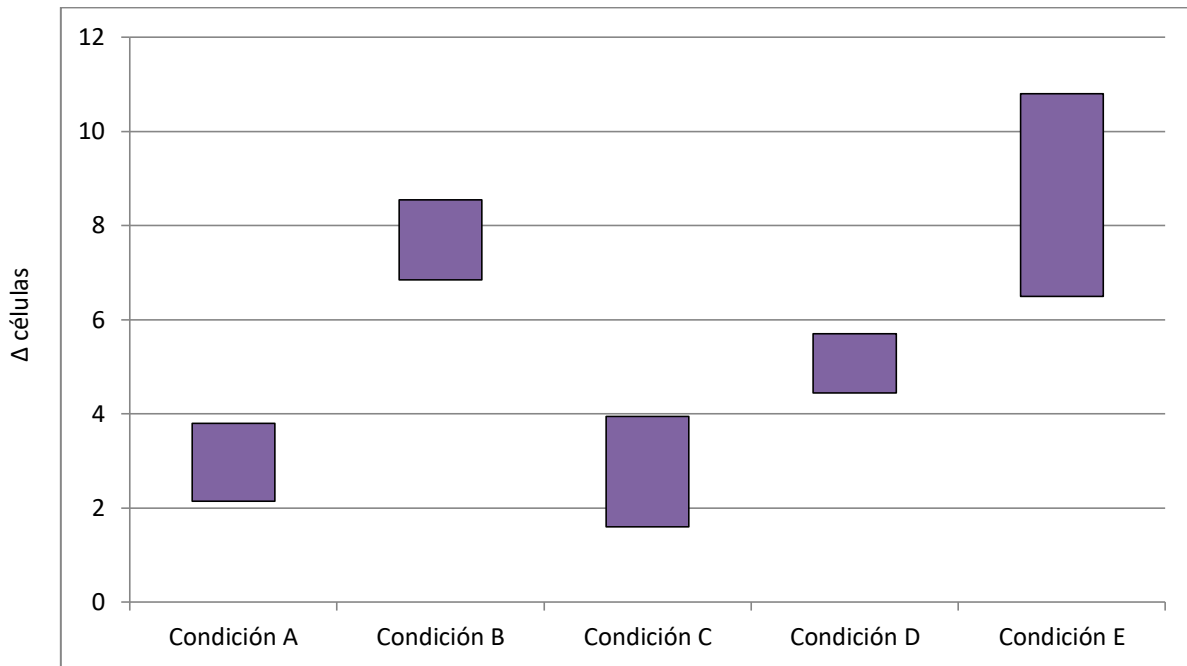


Gráfico 3 Incremento del número de CME tras el cultivo, en distintas condiciones de cultivo

En nuestra experiencia en el cultivo a pequeña escala observamos una ventaja proliferativa para cualquiera de los dos tipos celulares (CME-D y CME-MO) cuando el cultivo se lleva a cabo con medios suplementados con LP (protocolo “GMP”), frente a los medios suplementados con SBF.

Las CME-D en cultivo con el medio considerado estándar para las condiciones GMP, suplementado con LP, presentan una buena tasa de proliferación, comparable o incluso superior a las CME-MO en las mismas condiciones de cultivo.

Además, hemos comprobado que las CME-D en cultivo se adhieren al plástico, tienen morfología fibroblastoide y tras la finalización del cultivo presentan un inmunofenotipo concordante con el requerido para definir las como CME.

5.2 FASE II: ESTUDIOS EN CONDICIONES EQUIPARABLES A GMP (“GMP-LIKE”)

Una vez comprobados estos extremos, y continuando con el planteamiento experimental, se procedió a analizar en mayor profundidad el comportamiento de las CME-D en condiciones equiparables a las condiciones GMP (condiciones “GMP-like”), comparando de nuevo la expansión de las CME con distintos medios de cultivo, y comprobando después la calidad y funcionalidad de las células obtenidas.

5.2.1 COMPARACIÓN CON CULTIVO A ESCALA CLÍNICA

Para el cultivo a escala clínica, se continuó escalando la superficie de cultivo, y se emplearon CellSTACK®-1272, con una superficie de cultivo de 1272cm².

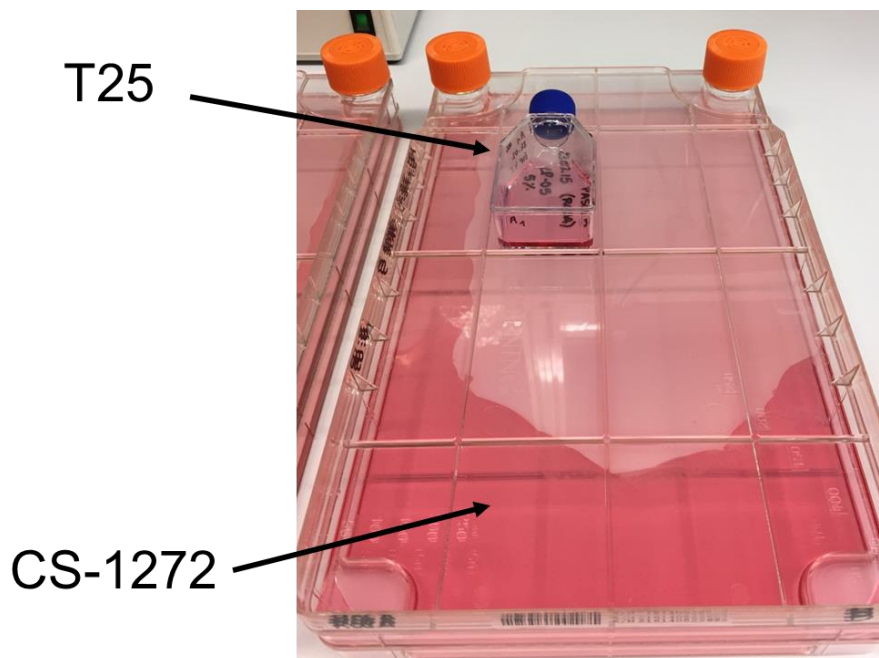


Imagen 7 Comparativa del tamaño de los frascos de cultivo T25 y los CellSTACK (1272 cm²)

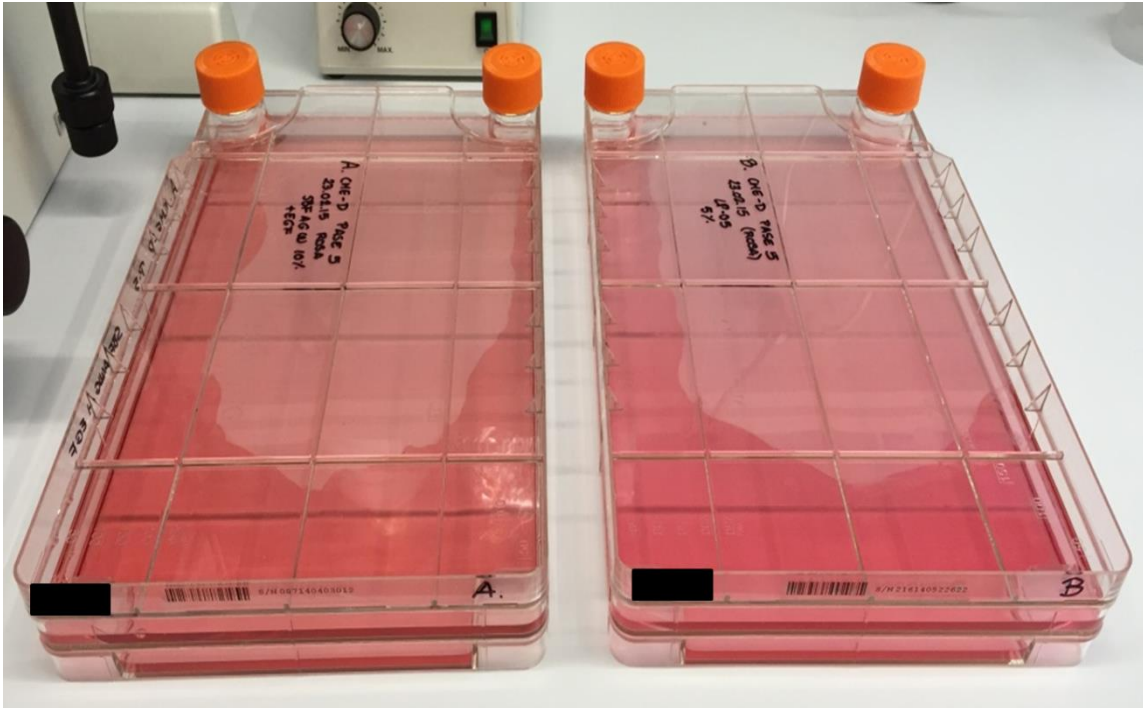


Imagen 8 Imagen de los CellStack con los cultivos estándar con SBF (A) y estándar GMP con LP (B)

Tras la finalización y la tripsinización del cultivo se realizaron los contajes obteniéndose los resultados que se detallan en la siguiente tabla:

TIPOS DE CULTIVO	DONANTE 1	DONANTE 2	DONANTE 3
Medio con SBF			
- Nº de CME obtenidas	17,1 x 10 ⁶	16 x 10 ⁶	29 x 10 ⁶
- Incremento	3,42 x	3,2 x	5,8 x
Medio "GMP" con LP			
- Nº de CME obtenidas	56 x 10 ⁶	42 x 10 ⁶	17 x 10 ⁶
- Incremento	11,21 x	8,4 x	3,4 x

Tabla 8 Rendimiento tras cultivo a escala clínica

En dos de los 3 lotes, la proliferación de las CME en cultivo con medio suplementado con LP (condición de cultivo “estándar GMP”) fue superior a la obtenida en cultivo con medio suplementado con SBF y EGF (condición de cultivo “estándar”). En el tercer lote no se confirmaron estos resultados, pero el rendimiento en cultivo con medio “GMP” fue en cualquier caso aceptable, y similar al rendimiento obtenido para CME-MO en la experiencia de nuestro Laboratorio.

5.2.2 PRODUCCIÓN DE 3 LOTES DE CME-D

Para la producción de 3 lotes homogéneos de CME-D en condiciones equiparables a las requeridas para la elaboración de un producto celular para uso clínico, se llevó a cabo el cultivo en CellSTACK 1272 como se describe anteriormente, con medio de cultivo “estándar GMP”.

Se obtuvieron de media, tras 9 días en cultivo, 38×10^6 CME tras la expansión, para su posterior evaluación de funcionalidad y calidad.

Se sintetizan los resultados en la siguiente tabla (los datos corresponden a la mediana de los 3 lotes).

DATOS DEL CULTIVO	
Nº CME sembradas	5×10^6
Densidad de siembra (CME/cm ²)	4×10^3
Días en cultivo	9
RESULTADOS	
Nº CME obtenidas	38×10^6
Viabilidad	98%
Factor de expansión	190 000
DP	17,54
TD	12,32 h
CFU-F (por cada 10^6 CME)	1×10^5

Tabla 9 Datos de rendimiento de la producción de 3 lotes de CME-D en condiciones “GMP-like”

Observamos por lo tanto, que en condiciones experimentales similares a las exigidas para un producto para uso clínico, era factible la expansión de CME-D, con un rendimiento adecuado.

Se realizó ensayo de CFU-f para los 3 lotes, observándose en todos los casos crecimiento de colonias de células, con lo que demostramos la capacidad clonogénica de las CME expandidas.

5.2.3 ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN

Para comprobar la funcionalidad de las CME-D tras el cultivo en condiciones GMP-like, se llevaron a cabo estudios de diferenciación a tejidos de origen mesodérmico: diferenciación osteogénica adipogénica y condrogénica.

5.2.3.1 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

Las CME-D se cultivaron tras su expansión en condiciones GMP-like, con medio de diferenciación osteogénica.

A lo largo del cultivo con el medio de diferenciación se observó un discreto cambio en la morfología de las CME. Las células adquirieron de forma progresiva una morfología más cuboidea y menos fusiforme. Tras la finalización del cultivo, se llevaron a cabo diferentes estudios para confirmar la diferenciación de las CME a osteoblastos. Se analizaron los depósitos de calcio mediante la tinción de rojo de Alzarina, observándose la presencia de depósitos de calcio tanto intra como extracelulares en las células sometidas a diferenciación.

Además, se estudió la actividad fosfatasa alcalina tras someter a las CME a diferenciación osteogénica, mediante el empleo del kit comercial SIGMA FAST. Se observaron CME-D con positividad para la tinción de actividad FA.

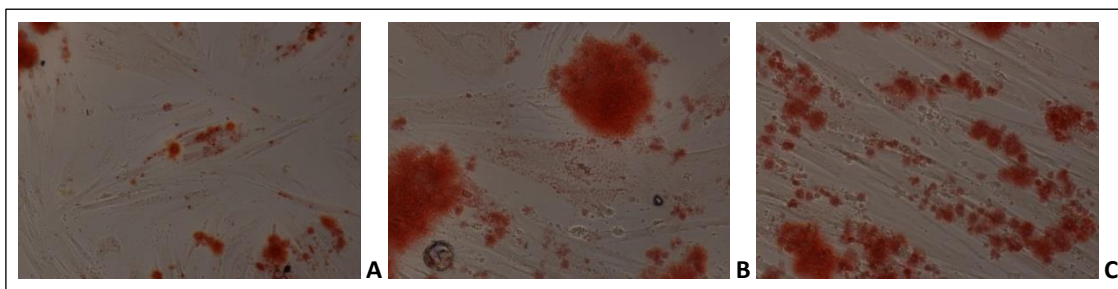


Imagen 9 Depósitos extra e intracelulares de calcio, teñidos (rojo) con Alzarin Red. A: 10x, B: 20x, C: 20x



Imagen 10 Actividad Fosfatasa alcalina, CME teñidas con SIGMA FAST. A: 4x, B: 10x, C: 20x

5.2.3.2 DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

Se emplearon las CME-D obtenidas tras expansión en condiciones “GMP-like” y se cultivaron con medio de diferenciación adipogénica.

Tras la finalización del cultivo, se estudió la presencia de vacuolas grasas mediante la tinción de Oil Red, observándose la presencia de pequeñas vacuolas en las CME sometidas a diferenciación.

5.2.3.3 DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA

Se emplearon las CME-D, tras su expansión en condiciones “GMP-like” y se cultivaron con medio de diferenciación condrogénica.

En este caso, a lo largo del cultivo se observó que las CME sembradas con medio de diferenciación condrogénica no se adherían en su totalidad a la superficie de cultivo, observándose células en suspensión en los recambios de medio tras tan solo 9 días en cultivo. Además, las células adquirieron una morfología más redondeada de lo habitual. Al llevar a cabo los estudios de evaluación de diferenciación con anticuerpos específicos, no se observó tinción de las células.

5.2.4 CONTROLES DE CALIDAD

5.2.4.1 ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para comprobar que las células expandidas en condiciones GMP-like mantenían las características definitorias de células mesenquimales, se procedió a su estudio por citometría de flujo. Se analizaron los tres lotes de CME-D expandidas tras cultivo con medio suplementado con lisado plaquetario.

Se confirmó mediante este estudio que todas las células expandidas cumplían los criterios de inmunofenotipo establecidos por la ISCT: positividad para CD105, CD73 y CD90, y negatividad (<5% positividad) para la expresión de marcadores de células hematopoyéticas entre otros (CD45, CD34 y HLA clase II).

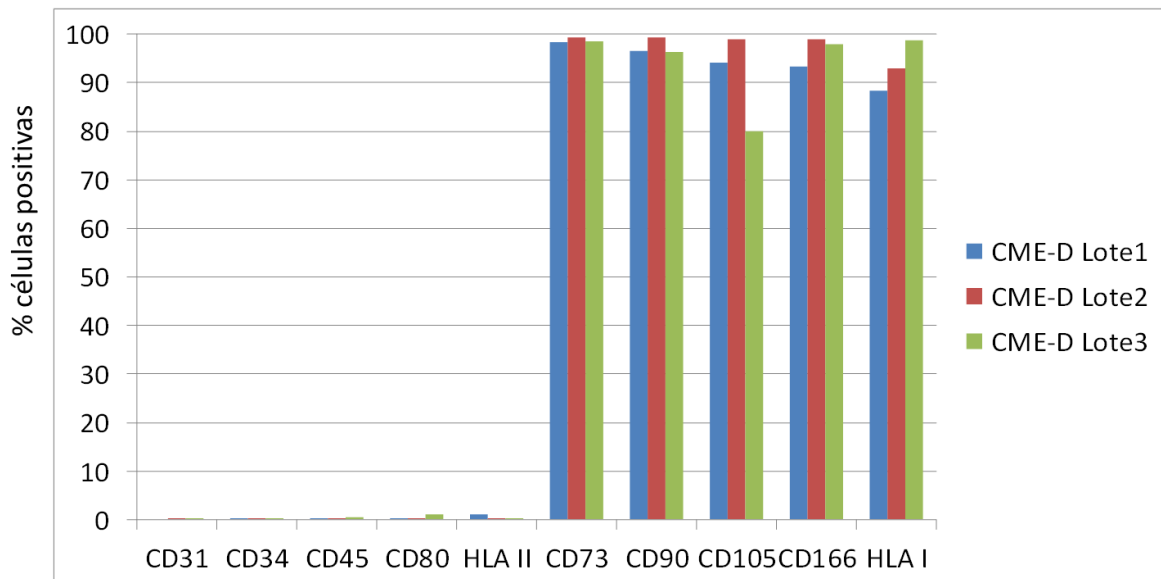


Gráfico 4 Resultados de estudio de citometría de flujo de 3 lotes de CME-D

5.2.4.2 ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS

Como parte de los controles de calidad a los que se someten los productos de terapia celular con potencial aplicación clínica se incluyen estudios microbiológicos:

- Cultivos del sobrenadante en frasco de hemocultivo para aerobios y anaerobios, que fueron negativos en todos los casos.
- Estudio de Mycoplasma en el sobrenadante, que fue negativo en todos los casos
- Estudio de endotoxinas en el sobrenadante, que fue negativo en todos los casos

5.2.4.3 ESTUDIO DE CARIOTIPO

Se llevó a cabo el estudio del cariotipo de las células expandidas en condiciones "GMP-like", con medio suplementado con LP para evaluar su estabilidad genómica tras el cultivo.

En el primer lote de CME-D expandidas, se observó una anomalía cromosómica en el cromosoma 20. Para descartar que dicha anomalía fuera adquirida en el curso del cultivo celular, se realizó el cariotipo del vial originario de las CME-D, observándose la misma anomalía en las metafases estudiadas.

En los 2 otros lotes, el estudio del cariotipo fue en todos los casos normal, con un cariotipo femenino como corresponde a las células de decidua, de origen materno.

5.3 FASE III: PRODUCCIÓN DE PRODUCTO DE TERAPIA CELULAR EN CONDICIONES GMP

Una vez comprobada la posibilidad de expansión de las CME-D a escala clínica, en condiciones equiparables a las requeridas según las normas GMP, con un adecuado rendimiento y con cumplimiento de las condiciones exigibles de calidad, se procedió a elaborar un producto de terapia celular que cumpliera todos los requisitos aplicables a dichas terapias, para posteriormente analizar su capacidad funcional de cara a su posible aplicación en el campo de la Traumatología.

5.3.1 PRODUCCIÓN DE DOS LOTES DE CME-D PARA USO CLÍNICO

Se procedió a la expansión de CME-D con medio suplementado con LP, mediante siembra en CellSTACK®, en condiciones GMP, en la Unidad de Producción Celular del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda.

	LOTE 1	LOTE 2
Días en cultivo	6	9
Nº de CME obtenidas	15,25 x 10 ⁶	70 x 10 ⁶
Incremento	3,05 x	14 x
Factor de expansión	76250	350000
DP	16,22	18,42
TD (horas)	8,88	11,73

Tabla 10 Rendimiento de cultivo de CME-D en condiciones GMP, 2 lotes

Para ambos lotes se llevaron a cabo ensayos de CFU-F, observándose crecimiento de colonias en todos los puntos descritos en el ensayo.

De media, se observó el crecimiento de 30 CFU-F por cada 200 CME, es decir, 148000 CFU-F por cada millón de CME-D.

Las CME-D obtenidas en la Fase III se emplearon para estudios de funcionalidad (diferenciación y proliferación con biomateriales). Además, se llevaron a cabo controles de calidad.

5.3.2 ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN

5.3.2.1 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

Para los ensayos de diferenciación osteogénica, se cultivaron las CME-D, tras su expansión en condiciones GMP como se describe en el apartado anterior, con medio de diferenciación osteogénica comercial según se describe en *Diferenciación osteogénica* (52).

A lo largo del cultivo con el medio de diferenciación se observó un discreto cambio en la morfología de las CME. Las células adquirieron progresivamente una forma más cuboidea y menos fusiforme.

Tras la finalización del cultivo, se realizó marcaje por inmunofluorescencia. Se observó positividad para osteocalcina de las CME-D sometidas a diferenciación osteogénica.

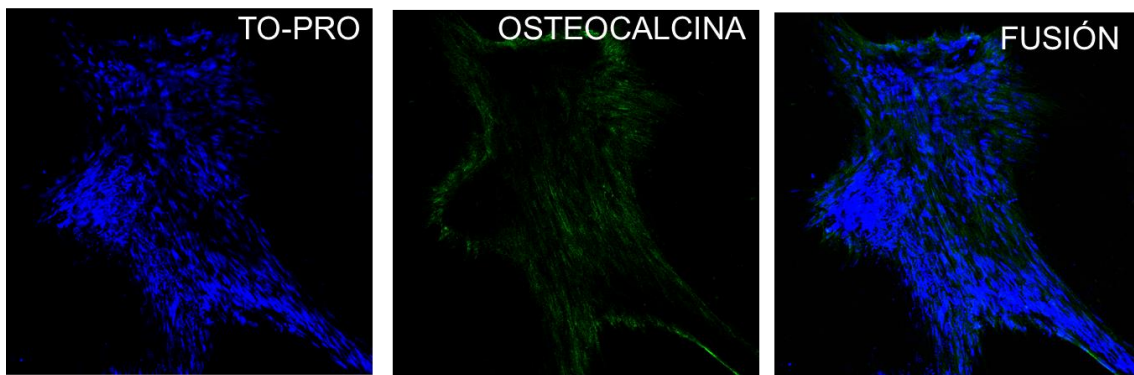


Imagen 11 Imagen de microscopía confocal. TP-PRO: tinción de núcleos; osteocalcina: positividad para osteocalcina en verde; fusión: imagen de fusión de las previas.

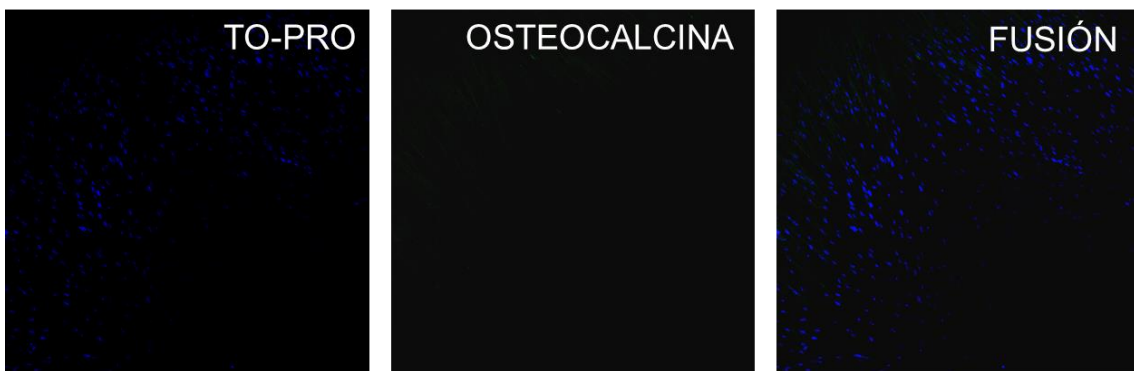


Imagen 12 Control negativo de osteocalcina.

5.3.2.2 DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

Se emplearon las CME-D obtenidas tras expansión en condiciones GMP, como se describe en 5.3.1 y se cultivaron con medio de diferenciación adipogénica comercial según se describe en 4.2.9.2.

Se observó por microscopía convencional la aparición de pequeñas vacuolas grasas en algunas de las CME y tras la finalización del cultivo, se realizó marcaje para inmunofluorescencia.

Se objetivó la positividad de las CME-D sometidas a diferenciación adipogénica para mFAP3, comprobándose la presencia de grasa.

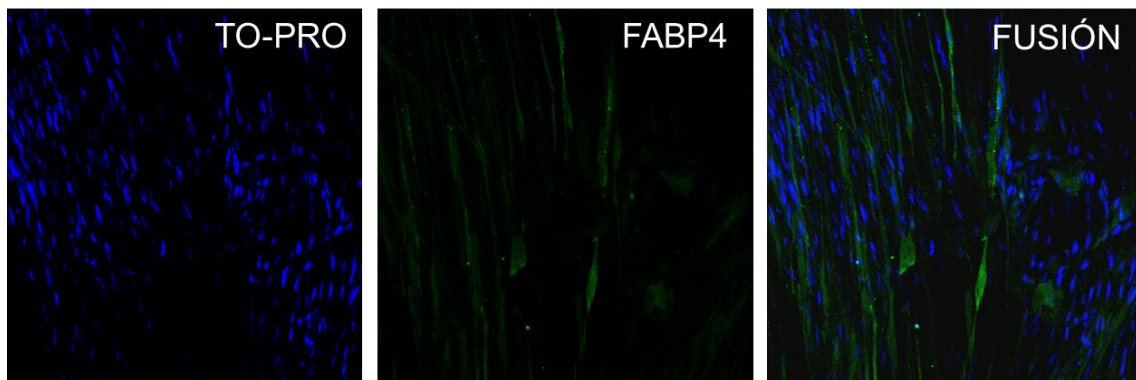


Imagen 13 Imagen de microscopía confocal. TP-PRO: tinción de núcleos; FABP4: positividad para grasa en verde; fusión: imagen de fusión de las previas.

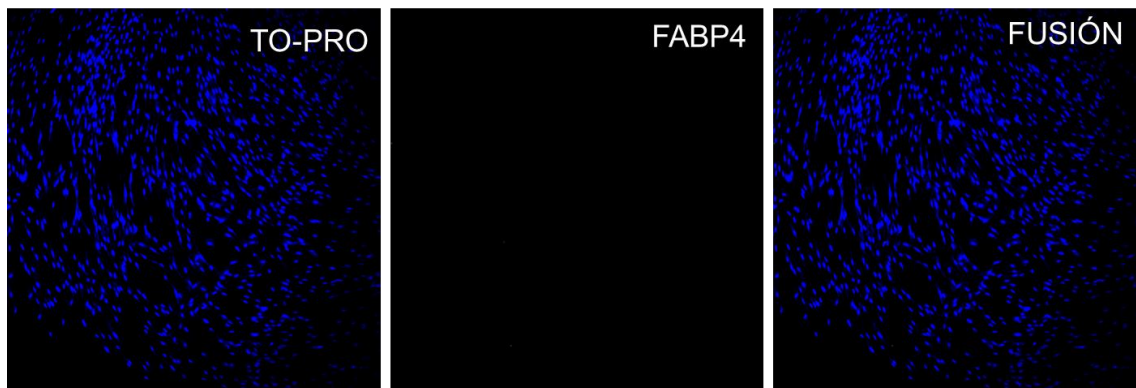


Imagen 14 Control negativo de FABP4

5.3.2.3 DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA

Se emplearon las CME-D, tras su expansión en condiciones GMP, como se describe en 5.3.1 y se cultivaron con medio de diferenciación condrogénica comercial de acuerdo con lo expuesto en 4.2.9.3.

Las CME sembradas con medio de diferenciación condrogénica no se adhirieron en su totalidad a la superficie de cultivo, observándose células en suspensión en los recambios de medio tras tan solo 9 días en cultivo. Además, estas CME adquirieron una morfología más redondeada de lo habitual.

Al llevar a cabo los estudios de evaluación de diferenciación con anticuerpos específicos (antígeno agrecan), se observó una tinción muy débil de las células.

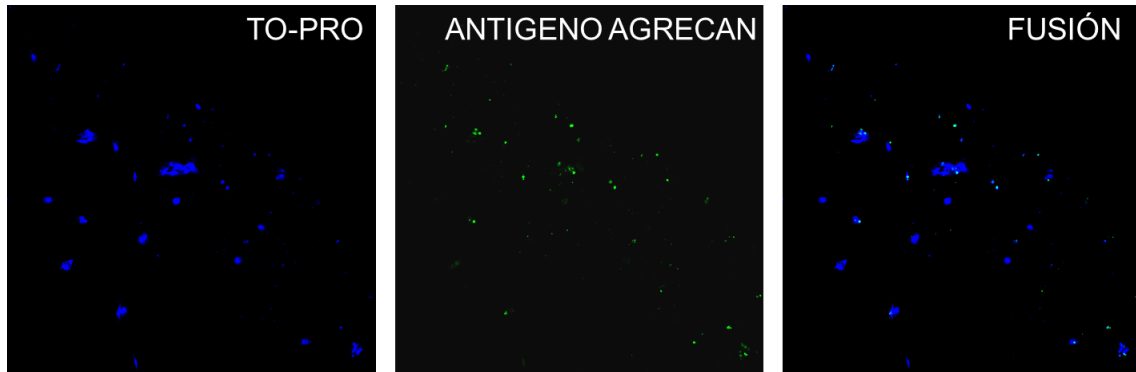


Imagen 15 Imagen de microscopía confocal. TO-PRO: tinción de núcleos; ANTIGENO AGRECAN: positividad para cartílago en verde, muy escasa; fusión: imagen de fusión de las previas.

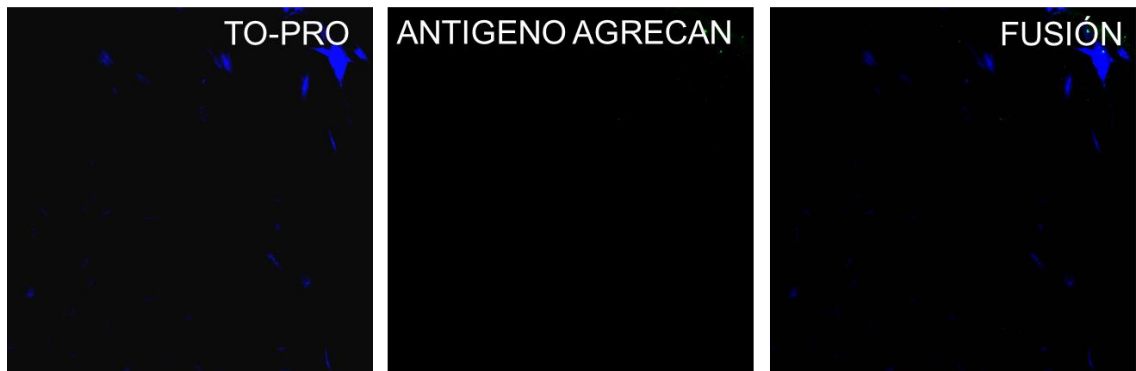


Imagen 16 Control negativo de ANTÍGENO AGRECAN

5.3.3 CONTROLES DE CALIDAD

5.3.3.1 ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Como parte del control de calidad de la producción de CME-D en grado clínico, se evaluaron las características inmunofenotípicas tras el cultivo mediante análisis por citometría de flujo de los dos lotes de CME-D tras cultivo en condiciones GMP.

Se confirmó mediante este estudio que todas las células expandidas cumplían los criterios de inmunofenotipo establecidos por la ISCT: positividad para CD105, CD73 y CD90, y negatividad (<5% positividad) para la expresión de marcadores de células hematopoyéticas entre otros (CD45, CD34 y HLA clase II).

5.3.3.2 ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS

Se llevaron a cabo los estudios microbiológicos habituales para los productos de terapia celular, con los siguientes resultados:

- Cultivos del sobrenadante en frasco de hemocultivo para aerobios y anaerobios, que fueron negativos en todos los casos.
- Estudio de Mycoplasma en el sobrenadante, que fue negativo en todos los casos
- Estudio de endotoxinas en el sobrenadante, que fue negativo en todos los casos

5.3.3.3 ESTUDIO DE CARIOTIPO

Se llevó a cabo el estudio del cariotipo de las células expandidas en condiciones GMP, para la evaluación de seguridad del producto final.

El estudio no reveló ninguna anomalía, obteniéndose en todos los casos un resultado compatible con un cariotipo femenino normal, como corresponde a las células de decidua, de origen materno.

5.3.4 ENSAYO CON BIOMATERIALES

Para evaluar la funcionalidad y la capacidad de proliferación de las células adheridas a biomateriales, se llevó a cabo un cultivo en placa de CME-D junto con los biomateriales elegidos (Engipore y Polybone), analizando la proliferación celular con el ensayo Alamar Blue.

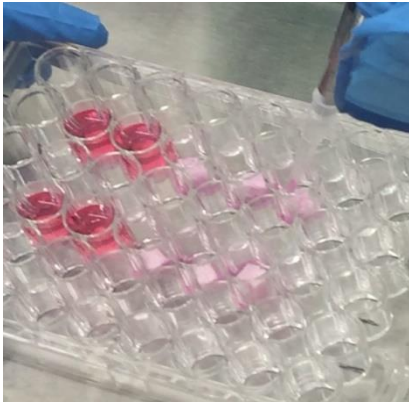


Imagen 17 Placa p48 con biomateriales

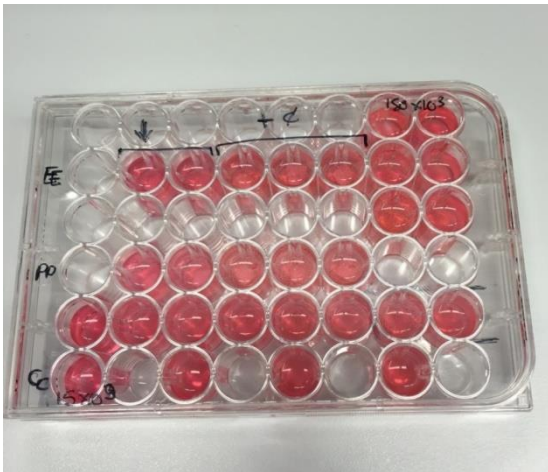


Imagen 18 Placa p48 con biomateriales, una vez añadida la suspensión celular y las CME-D como controles positivos para la curva patrón

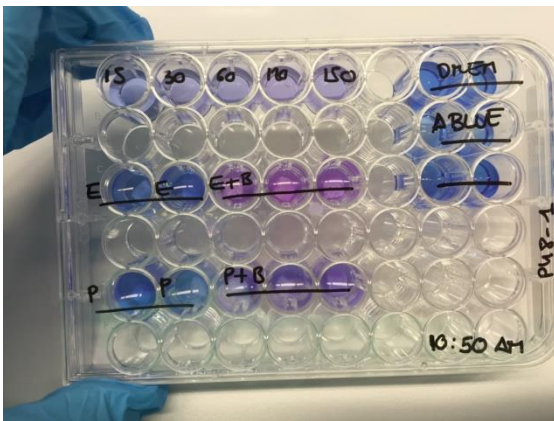


Imagen 19 Placa p48-1 tras incubación con Alamar Blue



Imagen 20 Placa p48 tras incubación con Alamar Blue, se observan los biomateriales en los pocillos

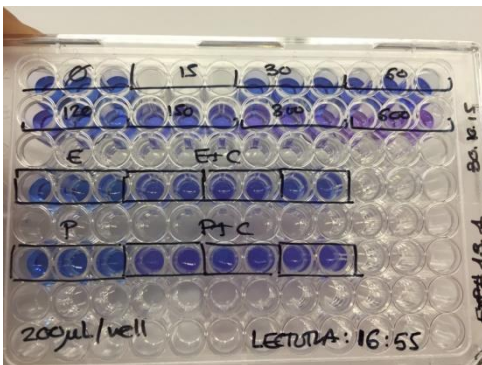


Imagen 21 Placa p96 para lectura en el espectrofotómetro

Tras la incubación con Alamar blue se observó diferencia de coloración a simple vista en algunos de los pocillos conteniendo biomaterial y células, concordante con la posibilidad de proliferación de las CME sobre el biomaterial.

Con la lectura en el espectrofotómetro en los puntos del ensayo establecidos, se analizaron los datos correspondientes a la proliferación celular en los biomateriales, que se detallan en los gráficos siguientes.

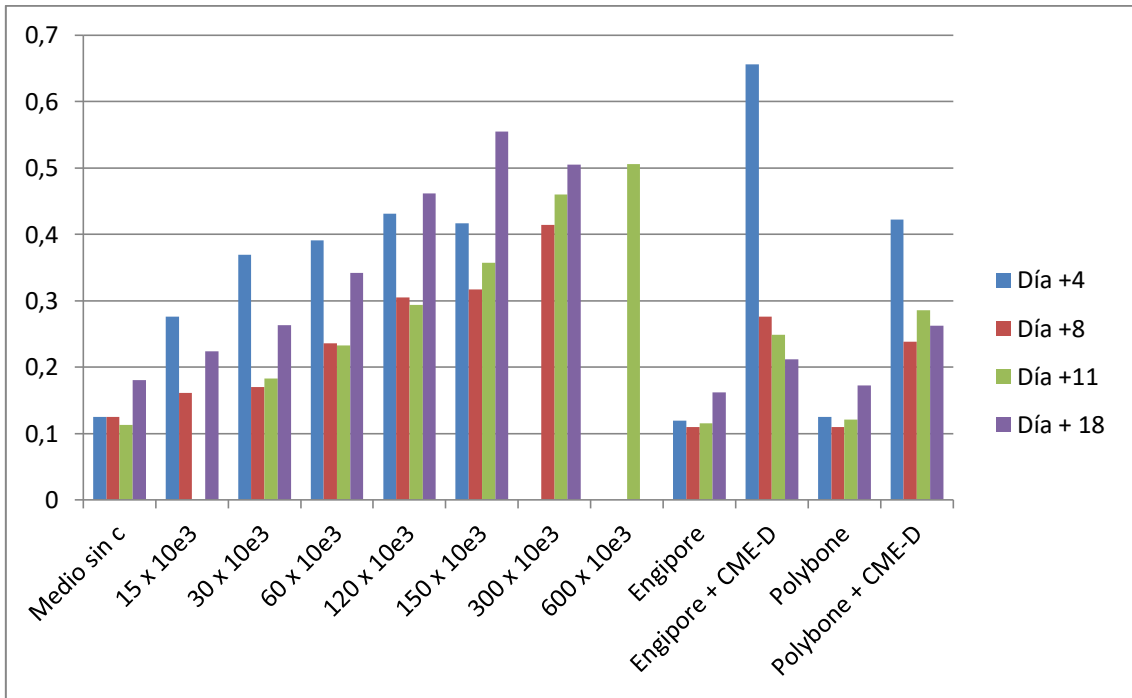


Gráfico 5 Unidades de Fluorescencia en las distintas condiciones y en los distintos puntos

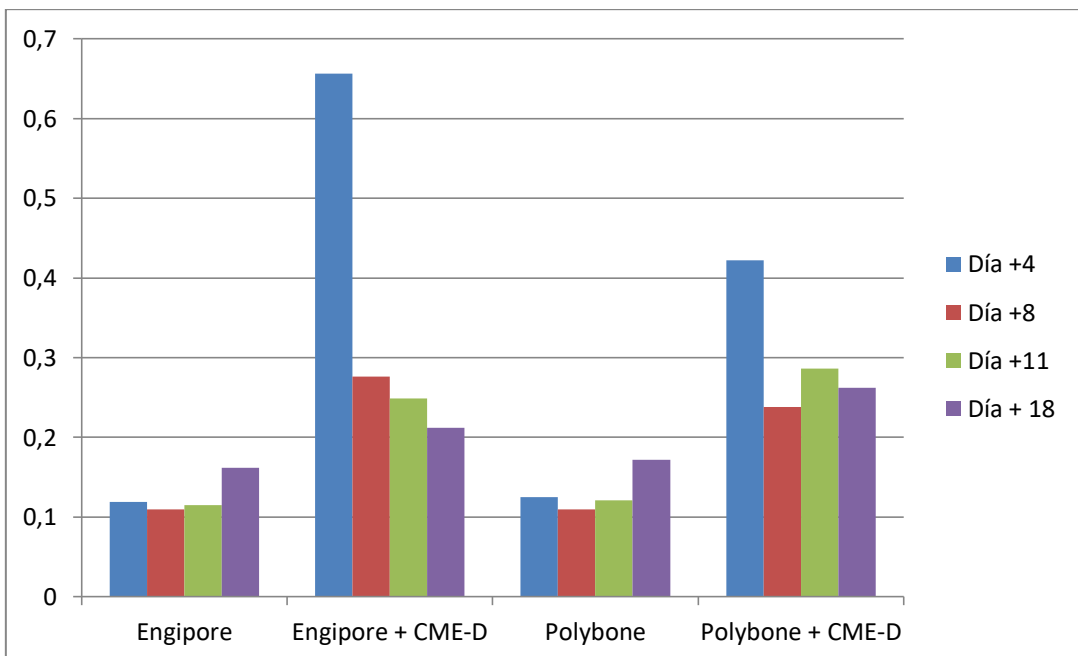


Gráfico 6 Unidades de fluorescencia en las condiciones en las que se incluyó biomaterial (detalle de Gráfico 5)

Los controles negativos mostraron ausencia de fluorescencia. Los controles positivos fueron adecuados y mostraron fluorescencia creciente a mayor concentración celular.

En los gráficos 5 y 6 se muestran las medidas de fluorescencia detectadas en cada punto del experimento (días 4, 8, 11 y 18 de cultivo) para cada condición. Se observó viabilidad de las CME-D en cultivo en todos los puntos del experimento. De acuerdo con la intensidad de la fluorescencia, la proliferación celular fue mayor para las CME-D de grado GMP cultivadas con el biomaterial Engipore® que con el material Polybone®.

5.3.5 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO CELULAR

El estudio de la estabilidad de las CME-D expandidas en condiciones GMP, se realizó de cara a su potencial utilización en la clínica bajo demanda, analizando la viabilidad inmediatamente tras la descongelación, y posteriormente en diferentes puntos temporales para los dos lotes de CME-D, mediante el test de tinción con azul tripán.

	HORA 0	HORA 1	HORA 24	HORA 48
LOTE 1	99%	99%	94%	92%
LOTE 2	99%	99%	97%	95%

Tabla 11 Porcentaje de células viables. Mediana de 3 contajes con cámara Neubauer y azul tripán

Se realizó además el análisis del inmunofenotipo de las CME en los diferentes puntos temporales, mostrando en todos los casos un patrón de expresión idéntico al observado inmediatamente tras la descongelación, y compatible con el fenotipo estándar de las CME, es decir, con más de un 95% de las células con expresión para los antígenos CD73, CD90, CD105, CD166 y HLA de clase I, y con menos de un 2% de expresión de los antígenos CD31, CD34, CD45, CD80 y HLA de clase II.

6. DISCUSIÓN

Las CME han sido objeto de multitud de estudios en las últimas décadas, desde su aislamiento y descripción por parte de Friedenstein et al². Debido a sus características únicas (facilidad de aislamiento y expansión) y sus múltiples propiedades tanto inmunomoduladoras como regenerativas, son muy atractivas para el campo de la terapia celular.

Su capacidad de diferenciación osteogénica supone además una ventaja añadida para su aplicación en el ámbito de la traumatología y más concretamente, en el de la reparación de defectos óseos secundarios a fracturas o a resorción ósea, tanto fisiológica como patológica.

Para cualquier uso terapéutico de las CME, es necesaria su expansión *in vitro* en condiciones GMP, con el fin de obtener un número de células suficiente para su aplicación clínica y con las máximas garantías de esterilidad, sin que se vea afectada su capacidad funcional tras el cultivo y sin que el proceso de expansión suponga un riesgo para los pacientes.

La fuente ideal de CME sería, desde el punto de vista teórico, aquella de la que se pudieran obtener las células sin necesidad de realizar procedimientos invasivos sobre el donante. De tal manera que se pudieran aislar CME con un alto índice proliferativo, que permitiera un cultivo *ex vivo* lo menos prolongado posible, lo que redundaría en una mayor seguridad biológica del producto. Además, sería deseable que las CME tuvieran escasa inmunogenicidad para poder ser empleadas en el contexto alogénico y que mantuvieran su viabilidad y funcionalidad tras el cultivo a escala clínica y la criopreservación y posterior descongelación. De esta manera, se podría disponer de un “stock” de células criopreservadas, que podrían ser empleadas de forma inmediata en el momento en el que el clínico estableciera la indicación del tratamiento.

Las CME-D surgen en este sentido como una alternativa muy atractiva a las CME-MO. La obtención de las placentas no requiere de ningún procedimiento invasivo sobre el donante, pudiéndose obtener de forma aséptica. El aislamiento de CME a partir de la decidua de origen materno y por lo tanto adulto, no conlleva problemas éticos al no tratarse de un tejido de origen fetal. Además, las pruebas realizadas a las mujeres embarazadas permiten realizar un cribado previo de enfermedades infecciosas transmisibles.

En este trabajo se ha demostrado que es posible mediante un procedimiento estandarizado, aislar CME de la decidua, de acuerdo con datos publicados anteriormente¹.

Se ha demostrado además que es posible expandir estas células *in vitro* en un medio de cultivo investigacional suplementado con SBF y EGF, manteniendo las CME a lo largo del cultivo sus

características morfológicas, formando una monocapa de células fibroblastoides adherente a la superficie de cultivo. Tras la expansión, las CME-D mantienen también sus características inmunofenotípicas, expresando una combinación de marcadores de superficie compatible con los criterios establecidos por la ISCT, definitorios de célula mesenquimal^{6,7}, con negatividad para la expresión de marcadores de células hematopoyéticas, moléculas coestimuladoras y HLA-II.

Puesto que la mayoría de los trabajos publicados en la literatura emplean CME-MO para las diferentes aplicaciones terapéuticas, consideramos necesario realizar una comparación de ambas poblaciones en cultivo a pequeña escala. De acuerdo con resultados previamente publicados^{54,60}, observamos en nuestro estudio que es posible cultivar tanto las CME-D como las CME-MO con todos los medios de cultivo estudiados. Además, las CME-D muestran una capacidad proliferativa similar, y en ocasiones superior, a las CME-MO en condiciones de cultivo idénticas.

Una vez realizada la comparación a pequeña escala, y tras observar que las CME-D pueden ser expandidas con un rendimiento similar o incluso superior a las CME-MO en las diferentes condiciones de cultivo, se procedió a valorar la expansión de las CME-D en condiciones equiparables a las condiciones GMP, estudiando la posibilidad de expansión de las CME-D en un medio de cultivo que cumpliera los requisitos GMP⁷⁰, es decir, libre de productos xenogénicos (SBF), y de suplementos recombinantes como el EGF.

Para ello, realizamos un estudio comparativo de la expansión de las CME-D con el medio de cultivo investigacional publicado previamente¹, frente a un medio de cultivo compatible con las condiciones GMP y empleado de forma habitual para la expansión de CME-MO de uso clínico⁷⁵.

El rendimiento obtenido con los dos medios de cultivo fue comparable, y para alguno de los lotes de CME-D incluso superior en el caso del cultivo con medio suplementado con lisado plaquetario, de acuerdo con resultados previamente publicados por otros grupos⁷⁸. Tras el análisis de los resultados de los diferentes lotes de CME-D, se observó que la proliferación celular podía presentar variaciones en función del lote de células, aunque en todos los casos se obtuvo un rendimiento adecuado en las condiciones de cultivo empleadas en el estudio.

Se comprobó además, tras la expansión en medio de cultivo de grado GMP, que las CME de decidual mantienen las mismas características inmunofenotípicas previamente descritas, poseen capacidad clonogénica, y que tras el cultivo mantienen la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica. En ambos casos, las CME-D mostraron cambios de morfología a lo largo del cultivo con medios de diferenciación, adquiriendo una morfología más cuboidea en el caso de la diferenciación osteogénica y mostrando la aparición de pequeñas vacuolas grasas en el caso de la diferenciación adipogénica, de acuerdo a lo previamente descrito en la literatura. Tras completar el periodo de cultivo con medio de

diferenciación osteogénica se comprobó mediante diversas técnicas la presencia de depósitos de calcio, actividad fosfatasa alcalina y positividad para osteocalcina. Tras cultivo con medio de diferenciación adipogénica se comprobó la presencia de lípidos.

Las CME-D expandidas en condiciones GMP cumplieron por lo tanto los criterios establecidos por la ISCT para la definición de células mesenquimales estromales multipotentes^{6,7}.

Sin embargo, en este trabajo no se ha podido demostrar la capacidad de diferenciación condrogénica de las CME-D. A lo largo del cultivo de las CME-D expandidas con medio de diferenciación condrogénico, se observó que las células no se adherían en su totalidad a la superficie de cultivo, detectándose células en suspensión en los recambios de medio tras tan solo 9 días en cultivo. Las células sí mostraron cambios morfológicos, adquiriendo una morfología más redondeada de lo habitual. Sin embargo, al llevar a cabo los estudios de evaluación de diferenciación con anticuerpos específicos, se observó una tinción muy débil de las células, no pudiéndose considerar como positivos los resultados.

En este sentido, algunas publicaciones han apuntado a que las CME aisladas de las distintas capas de la placenta podrían tener una menor capacidad de diferenciación a algunos linajes^{79,58}. Además, varios estudios apuntan a que las CME pueden perder su potencial de diferenciación tras su expansión *in vitro*, incluso tras pocos pases¹², aunque en nuestro caso sí se pudo demostrar la capacidad de diferenciación tanto osteogénica como adipogénica.

Existen múltiples que trabajos han comprobado la capacidad de diferenciación de las CME de decidua tanto a adipocitos como a osteoblastos y condrocitos^{1,66,80}. No obstante, muchas publicaciones consideran suficiente la demostración de la capacidad de diferenciación bilineal, estudiando tan solo la diferenciación a linaje osteogénico y adipogénico^{54,57}, extremos que en nuestro caso sí se han comprobado tras el cultivo a escala clínica.

En cuanto al cumplimiento de los controles de calidad, se realizaron todos los estudios de calidad del producto equiparables a los exigidos para un producto de terapia celular producido en condiciones GMP.

En ningún caso las CME-D expandidos mediante nuestro procedimiento presentaron contaminación microbiológica. En uno de los lotes estudiados se detectó una anomalía cromosómica tras la expansión. Se realizó un estudio citogenético de las CME-D fuente de dicho lote, que mostró la misma alteración genética, concluyéndose por lo tanto que dicha alteración, al estar presente desde el inicio, no era atribuible al cultivo.

Las CME-D expandidas en condiciones GMP constituirían por lo tanto un producto final potencialmente seguro tanto desde el punto de vista microbiológico como desde el punto de vista de estabilidad genética.

De acuerdo con estos resultados, se desarrolló un protocolo de cultivo a gran escala y grado GMP, llevándose a cabo con dicho protocolo la producción de dos lotes de CME-D en condiciones GMP,

comprobándose los resultados referidos anteriormente: se obtuvieron dos lotes de CME-D, obteniéndose suficientes células tras la expansión, con un rendimiento equiparable o incluso superior al obtenido de forma habitual en las mismas condiciones de cultivo para las CME-MO expandidas para su empleo habitual en clínica. Mediante el estudio de CFU-f, se demostró la capacidad clonogénica de las CME-D expandidas en condiciones GMP. Estas células cumplieron además todos los controles de calidad exigibles a un producto de terapias avanzadas. Se demostró que las CME-D mantenían características inmunofenotípicas concordantes con CME. Se llevaron a cabo estudios de diferenciación, que confirmaron que el producto final obtenido mantiene la capacidad de diferenciación osteoblástica y adipogénica.

Para establecer la utilidad de estas células en el campo de la regeneración ósea, se llevó a cabo adicionalmente un estudio de proliferación celular en cultivo con biomateriales. Se detectó la presencia de CME-D en todos los puntos del experimento y con ambos biomateriales, comprobándose por lo tanto que las CME-D pueden proliferar y sobrevivir hasta 4 días después de su siembra sobre el material. Esta capacidad de retención y proliferación sobre el biomaterial, de acuerdo con trabajos publicados previamente, sería equiparable a la proliferación de las CME-MO sobre el biomaterial, y en cualquier caso suficiente para que las células ejerzan su papel mediador de la regeneración ósea. Al comparar la proliferación celular en los distintos materiales estudiados, se observó una mayor presencia de CME-D en cultivo con Engipore frente a Polybone. Esta aparente mejor proliferación puede ser debida a la mayor porosidad del Engipore, que potencialmente podría implicar una mayor capacidad de fijación de las CME-D al material respecto al Polybone.

Además, los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad realizados fueron adecuados, por lo que postulamos que se podría considerar su descongelación en el centro de origen para su posterior transporte al centro en el que se pretenda aplicar el tratamiento, o bien, si ambos centros estuvieran muy distantes entre sí, se podría considerar el transporte de las CME criopreservadas para su descongelación a pie de cama del paciente en caso de ser posible, para asegurar la máxima viabilidad de las CME-D.

Por lo tanto, en este trabajo hemos demostrado que las CME-D podrían constituir una alternativa a las CME-MO, para casos en los que se plantee la indicación para el empleo de CME alogénicas, con múltiples ventajas en lo que respecta a su aislamiento y su expansión *in vitro*.

Hemos elaborado un protocolo de cultivo de grado GMP con el que hemos demostrado que las CME-D mantienen sus características morfológicas, inmunofenotípicas y funcionales, con un rendimiento adecuado, cumpliendo los estrictos estándares de calidad aplicables a cualquier producto de terapias avanzadas.

Las CME-D de grado GMP han demostrado además una viabilidad adecuada tras su descongelación, y un comportamiento superponible a las CME-MO sobre el biomaterial, lo que hace de ellas una herramienta muy atractiva para el campo de la regeneración ósea y un producto óptimo para su estudio preclínico en modelos animales y para su posterior traslación a la clínica.

7. CONCLUSIONES

Una vez establecidos los objetivos y habiendo analizado los resultados, las conclusiones de este estudio son las siguientes:

1. Las CME-D se pueden aislar en condiciones asépticas y mantener en cultivo mediante protocolos experimentales, con una elevada tasa de proliferación.
2. Las CME-D se comportan de forma comparable a las CME-MO en cultivo a pequeña y mediana escala en cuanto a tasa de proliferación.
3. Las CME-D mantienen, tras cultivo a gran escala, sus características inmunofenotípicas y su capacidad de diferenciación a tejidos de linaje mesodérmico.
4. Es factible la expansión de las CME-D en una Unidad GMP, obteniendo un producto celular final con unas características inmunofenotípicas y funcionales óptimas y cumpliendo los controles de calidad de un producto de terapias avanzadas que las hacen adecuadas para una futura aplicación clínica.

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Macias MI, Grande J, Moreno A, Domínguez I, Bornstein R, Flores AI. Isolation and characterization of true mesenchymal *stem* cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Nov;203(5):495.e9-495.e23. doi: 10.1016/j.ajog.2010.06.045. Epub 2010 Aug 8.
- ² Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393-403.
- ³ Caplan AI. Mesenchymal *stem* cells. *J Orthop Res* 9:641–650.
- ⁴ Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 72:570–585.
- ⁵ Viswanathan S, Keating A, Deans R, Hematti P, Prockop D, Stroncek DF, Stacey G, Weiss DJ, Mason C, Rao MS. Soliciting strategies for developing cell-based reference materials to advance mesenchymal stromal cell research and clinical translation. *Stem Cells Dev*. 2014 Jun 1;23(11):1157-67. doi: 10.1089/scd.2013.0591.
- ⁶ Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2005) Vol. 7, No. 5, 393/395.
- ⁷ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317
- ⁸ Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, vol. 13, no. 1, pp. 81–88, 1992.
- ⁹ Hayflick L, Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961; 25:585–621.
- ¹⁰ Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, Simmons PJ, Sensebe L, Keating A. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy*. 2010 Sep;12(5):576-8. doi: 10.3109/14653249.2010.507330.
- ¹¹ Wagner W, Ho AD, Zenke M. Different Facets of Aging in Human Mesenchymal *Stem* Cells. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Aug;16(4):445-53. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0825.
- ¹² Schellenberg A, Stiehl T, Horn P, Jousseaume S, Pallua N, Ho AD, Wagner W. Population dynamics of mesenchymal stromal cells during culture expansion. *Cytotherapy*, 2012; 14: 401–411
- ¹³ Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F. Human bone marrow derived mesenchymal *stem* cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 67, 9142, 2007.
- ¹⁴ Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Löwik CW, Falkenburg JH, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal *stem* cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2002 Aug;30(8):870-8.

-
- ¹⁵ Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, Kambouris M, Kollar K, McTaggart S, Pelekanos R, Rice A, Rossetti T, Atkinson K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Dec;**18**(6):846-58. Epub 2007 Sep 18. Review.
-
- ¹⁶ Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, Hou Y, Zeng X, Gilkeson GS, Sun L. Allogeneic mesenchymal *stem* cells transplantation in refractory *systemic* lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis* 2010;**69**:1423e9.
- ¹⁷ Keyszer G, Christopheit M, Fick S, Schendel M, Taute BM, Behre G, Müller LP, Schmoll HJ. Treatment of severe progressive *systemic* sclerosis with transplantation of mesenchymal stromal cells from allogeneic related donors: report of five cases. *Arthritis Rheum* 2011;**63**:2540e2.
- ¹⁸ Xu J, Wang D, Liu D, Fan Z, Zhang H, Liu O, Ding G, Gao R, Zhang C, Ding Y, Bromberg JS, Chen W, Sun L, Wang S. Allogeneic mesenchymal *stem* cell treatment alleviates experimental and clinical Sjogren syndrome. *Blood* 2012; **120**:3142e51.
- ¹⁹ Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O; Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal *stem* cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;**371**:1579e86.
- ²⁰ Lucchini G, Introna M, Dander E, Rovelli A, Balduzzi A, Bonanomi S, Salvadè A, Capelli C, Belotti D, Gaipa G, Perseghin P, Vinci P, Lanino E, Chiusolo P, Orofino MG, Markt S, Golay J, Rambaldi A, Biondi A, D'Amico G, Biagi E. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;**16**:1293e301.
- ²¹ Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J. Adult human mesenchymal *stem* cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;**15**:804e11.
- ²² Zhou H, Guo M, Bian C, Sun Z, Yang Z, Zeng Y, Ai H, Zhao RC. Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal *stem* cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;**16**:403e12.
- ²³ Weng JY, Du X, Geng SX, Peng YW, Wang Z, Lu ZS, Wu SJ, Luo CW, Guo R, Ling W, Deng CX, Liao PJ, Xiang AP. Mesenchymal *stem* cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2010;**45**:1732e40.
- ²⁴ Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Martín-Donaire T, Rico MA, Bautista G, Krsnik I, Forés R, Ojeda E, Sanjuán I, García-Marco JA, Navarro B, Gil S, Sánchez R, Panadero N, Gutiérrez Y, García-Berciano M, Pérez N, Millán I, Cabrera R, Fernández MN. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy.* 2009;**11**(3):278-88.
- ²⁵ Kaïpe H, Erkers T, Sadeghi B, Ringdén O. Stromal cells-are they really useful for GVHD? *Bone Marrow Transplant.* 2014 Jun;**49**(6):737-43. doi: 10.1038/bmt.2013.237. Epub 2014 Jan 27.
- ²⁶ Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal *stem* cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; **105**(4):1815–1822.
- ²⁷ Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal *stem* cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond).* 2005 Jul **26**;2:8

-
- ²⁸ Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838-43.
- ²⁹ Melief SM, Geutskens SB, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* 2013; 98(6)
- ³⁰ Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow *stem* cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002 Mar;174(1):11-20.
- ³¹ Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10344-9. Epub 2001 Aug 14.
- ³² Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1+ mesenchymal *stem* cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation*. 2004 Jul 15;78(1):83-8.
- ³³ Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP *Stem* cell therapy in a Caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Dec;48(12):3464-74.
- ³⁴ Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal *stem* cells for clinical application. *Vox Sang*. 2010 Feb;98(2):93-107.
- ³⁵ Ringdén O, Uzunel M, Sundberg B, Lönnies L, Nava S, Gustafsson J, Henningsohn L, Le Blanc K. Tissue repair using allogeneic mesenchymal *stem* cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia*. 2007 Nov;21(11):2271-6. Epub 2007 Jul 5.
- ³⁶ Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal *stem* cells in bone tissue-engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng* 2005; 11: 787-802.
- ³⁷ Wang W, Cao W. Treatment of osteoarthritis with mesenchymal *stem* cells. *Sci China Life Sci* 2014; 57: 586-595.
- ³⁸ François M, Birman E, Forner KA, Gaboury L, Galipeau J. Adoptive transfer of mesenchymal stromal cells accelerates intestinal epithelium recovery of irradiated mice in an interleukin-6-dependent manner. *Cytotherapy*. 2012 Nov;14(10):1164-70.
- ³⁹ Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ernthaller C, Gerbhard F. Fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015 Jan;70:93-101.
- ⁴⁰ Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, Granchi D, Kassem M, Konttinen YT, Mustafa K, Pioletti DP, Sillat T, Finne-Wistrand A. Bone regeneration and *stem* cells. *J. Cell. Mol. Med*. Vol 15, No 4, 2011
- ⁴¹ Sponer P, Kučera T, Diaz-Garcia D, Filip S. The role of mesenchymal *stem* cells in bone repair and regeneration. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2014 Apr;24(3):257-62. doi: 10.1007/s00590-013-1328-5. Epub 2013 Oct 8.
- ⁴² Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8932-7.

-
- ⁴³ Gómez-Barrena E, Rosset P, Müller I, Giordano R, Bunu C, Layrolle P, Konttinen YT, Luyten FP. Bone regeneration: *stem* cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 15, No 6, 2011 pp. 1266-1286
- ⁴⁴ Cordonnier T, Layrolle P, Gaillard J, Langonné A, Sensebé L, Rosset P, Sohier J. 3D environment on human mesenchymal *stem* cells differentiation for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2010 Mar;21(3):981-7. doi: 10.1007/s10856-009-3916-9. Epub 2009 Oct 25.
- ⁴⁵ Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001 344:385–386
- ⁴⁶ Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. *Stem* cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 13:947–955
- ⁴⁷ Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, Kotobuki N, Sugimoto K, Ohmura T, Kobata Y, Shigematsu K, Kawamura K, Tamai K, Takakura Y. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal *stem* cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* 2006 30:952–960
- ⁴⁸ Kagami H, Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: Basic science to clinical translation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Mar;43(3):286-9. doi: 10.1016/j.biocel.2010.12.006. Epub 2010 Dec 13. Review.
- ⁴⁹ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal *stem* cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- ⁵⁰ Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal *stem* cell aging. *Exp Gerontol* 2005;40:926-30.
- ⁵¹ Vaananen HK. Mesenchymal *stem* cells. *Ann Med* 2005;37:469-79.
- ⁵² Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, Granton J, Stewart DJ. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and metaanalysis of clinical trials. *Plos One* 2012; 7: 1-21.
- ⁵³ Agata H, Asahina I, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H. Characteristic change and loss of in vivo osteogenic abilities of human bone marrow stromal cells during passage. *Tissue Eng Part A* 2010;16:663–73.
- ⁵⁴ Raynaud CM, Maleki M, Lis R, Ahmed B, Al-Azwani I, Malek J, Safadi FF, Rafii A. Comprehensive characterization of mesenchymal *stem* cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. *Stem Cells Int.* 2012;2012:658356. doi: 10.1155/2012/658356. Epub 2012 Jun 4.
- ⁵⁵ Jones BJ, Brooke G, Atkinson K, McTaggart SJ. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal *stem* cells. *Placenta* 2007;28:1174-81.
- ⁵⁶ Li C, Zhang W, Jiang X, Mao N. Human placenta-derived mesenchymal *stem* cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells. *Cell Tissue Res* 2007;330:437-46.

-
- ⁵⁷ Pelekanos RA, Sardesai VS, Futrega K, Lott WB, Kuhn M, Doran MR. Isolation and Expansion of Mesenchymal *Stem*/Stromal Cells Derived from Human Placenta Tissue. *J. Vis. Exp.* (112), e54204, doi:10.3791/54204 (2016).
- ⁵⁸ Araújo AB, Salton GD, Furlan JM, Schneider N, Angeli MH, Laureano ÁM, Silla L, Passos EP, Paz AH. Comparison of human mesenchymal stromal cells from four neonatal tissues: Amniotic membrane, chorionic membrane, placental decidua and umbilical cord. *Cytotherapy*, 2017; 19: 577–585
- ⁵⁹ Choi YS, Park YB, Ha CW, Kim JA, Heo JC, Han WJ, Oh SY, Choi SJ. Different characteristics of mesenchymal *stem* cells isolated from different layers of full term placenta. *PLoS One*. 2017 Feb 22;12(2):e0172642. doi: 10.1371/journal.pone.0172642. eCollection 2017.
- ⁶⁰ Indumathi S, Harikrishnan R, Mishra R, Rajkumar JS, Padmapriya V, Lissa RP, Dhanasekaran M. Comparison of feto-maternal organ derived *stem* cells in facets of immunophenotype, proliferation and differentiation. *Tissue Cell*. 2013 Dec;45(6):434-42. doi: 10.1016/j.tice.2013.07.007. Epub 2013 Sep 2.
- ⁶¹ Bornstein R, Macias MI, de la Torre P, Grande J, Flores AI. Human decidua-derived mesenchymal stromal cells differentiate into hepatic-like cells and form functional three-dimensional structures. *Cytotherapy*. 2012 Nov;14(10):1182-92.
- ⁶² Melief SM, Geutskens SB, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica*. 2013 Jun;98(6):888-95. doi: 10.3324/haematol.2012.078055. Epub 2013 Jan 24.
- ⁶³ Erkers T, Nava S, Yosef J, Ringdén O, Kaipe H. Decidual stromal cells promote regulatory T cells and suppress alloreactivity in a cell contact-dependent manner. *Stem Cells Dev*. 2013 Oct 1;22(19):2596-605. doi: 10.1089/scd.2013.0079. Epub 2013 Jul 2.
- ⁶⁴ Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L, Shi S. Mesenchymal-*stem*-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*. 2012 May 4;10(5):544-55. doi: 10.1016/j.stem.2012.03.007. Epub 2012 Apr 26.
- ⁶⁵ Kaipe H, Carlson LM, Erkers T, Nava S, Mollén P, Gustafsson B, Qian H, Li X, Hashimoto T, Sadeghi B, Alheim M, Ringdén O. Immunogenicity of decidual stromal cells in an epidermolysis bullosa patient and in allogeneic hematopoietic *stem* cell transplantation patients. *Stem Cells Dev*. 2015 Jun 15;24(12):1471-82. doi: 10.1089/scd.2014.0568. Epub 2015 Mar 13.
- ⁶⁶ Abomaray FM, Al Jumah MA, Alsaad KO, Jawdat D, Al Khaldi A, AlAskar AS, Al Harthy S, Al Subayyil AM, Khatlani T, Alawad AO, Alkushi A, Kalionis B, Abumaree MH. Phenotypic and Functional Characterization of Mesenchymal *Stem*/Multipotent Stromal Cells from Decidua Basalis of Human Term Placenta. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5184601. doi: 10.1155/2016/5184601. Epub 2016 Feb 10.
- ⁶⁷ Kusuma GD, Menicanin D, Gronthos S, Manuelpillai U, Abumaree MH, Pertile MD, Brennecke SP, Kalionis B. Ectopic Bone Formation by Mesenchymal *Stem* Cells Derived from Human Term Placenta and the Decidua. *PLoS One*. 2015 Oct 20;10(10):e0141246. doi: 10.1371/journal.pone.0141246. eCollection 2015.
- ⁶⁸ Li X, Ling W, Pennisi A, Wang Y, Khan S, Heidaran M, Pal A, Zhang X, He S, Zeitlin A, Abbot S, Faleck H, Hariri R, Shaughnessy JD Jr, van Rhee F, Nair B, Barlogie B, Epstein J, Yaccoby S. Human Placenta-Derived Adherent Cells Prevent Bone loss, Stimulate Bone formation, and Suppress Growth of Multiple Myeloma in Bone. *Stem Cells*. 2011 Feb;29(2):263-73. doi: 10.1002/stem.572.

-
- ⁶⁹ Ringdén O, Erkers T, Nava S, Uzunel M, Iwarsson E, Conrad R, Westgren M, Mattsson J, Kaipe H. Fetal membrane cells for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2013 Mar;31(3):592-601. doi: 10.1002/*stem*.1314.
- ⁷⁰ Wuchter P, Bieback K, Schrezenmeier H, Bornhäuser M, Müller LP, Bönig H, Wagner W, Meisel R, Pavel P, Tonn T, Lang P, Müller I, Renner M, Malcherek G, Saffrich R, Buss EC, Horn P, Rojewski M, Schmitt A, Ho AD, Sanzenbacher R, Schmitt M. Standardization of Good Manufacturing Practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications. *Cytotherapy*, 2015; 17: 128-139
- ⁷¹ Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal *stem* cells. *Biomaterials*. 2003 Aug;24(18):3095-100.
- ⁷² Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Klüter H. Human Alternatives to Fetal Bovine Serum for the Expansion of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow. *Stem Cells*. 2009 Sep;27(9):2331-41. doi: 10.1002/*stem*.139.
- ⁷³ Flemming A, Schallmoser K, Strunk D, Stolk M, Volk HD, Seifert M. Immunomodulative Efficacy of Bone Marrow-Derived Mesenchymal *Stem* Cells Cultured in Human Platelet Lysate. *J Clin Immunol* (2011) 31:1143–1156
- ⁷⁴ Martinelli D, Pereira RC, Moggi M, Benelli R, Mastrogiacomo M, Coviello D, Cancedda R, Gentili C. A humanized *system* to expand in vitro amniotic fluid-derived *stem* cells intended for clinical application. *Cytotherapy*, 2016; 18: 438–451
- ⁷⁵ Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, Mailänder V, Lotfi R, Ignatius A, Sensebé L, Bourin P, Schrezenmeier H, Rojewski MT. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy*. 2012 May;14(5):540-54. doi: 10.3109/14653249.2012.655420. Epub 2012 Feb 2.
- ⁷⁶ Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal *stem* cells. *J Biol Chem*. 2008 Jul 25;283(30):20948-58. doi: 10.1074/jbc.M800850200. Epub 2008 Apr 24.
- ⁷⁷ Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85: 638–46.
- ⁷⁸ Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, Drexler C, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007 Aug;47(8):1436-46.
- ⁷⁹ Karlsson H, Erkers T, Nava S, Ruhm S, Westgren M, Ringdén O. Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic settings in vitro. *Clin Exp Immunol* 2011;167:543–55.
- ⁸⁰ Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived *Stem* Cells. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):300-11. Epub 2007 Nov 1.