

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Obtención y Caracterización de Células Madre
Mesenquimales a Partir de Sangre Periférica**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

1942

Presenta:

Adriana Guadalupe Quiroz Reyes

Hermosillo, Sonora

Septiembre del 2017

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



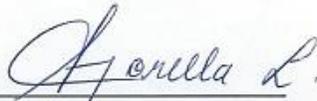
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Adriana Guadalupe Quiroz Reyes la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



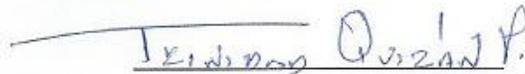
M.C. Antonio Rascón Careaga
Presidente



Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño
Secretario



Dr. Joel Alberto Badell Luzardo
Vocal



Dra. Trinidad Quizán Plata
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A:

M.C Antonio Rascón Careaga

Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño

Dr. Joel Alberto Badell Luzardo

Dra. Trinidad Quizán Plata

Q.B. Gabriela Zubiate Cabanillas

Q.B. Sonia Zulema Soufflé Vázquez

Laboratorios Acuña y Asociados S.c.

Por todo el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia, por ser el pilar de mi vida.

A mis maestros, por abrirme las puertas del conocimiento.

A mis amigos, por su apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. OBJETIVOS.....	11
4. MARCO TEÓRICO.....	12
4.1. Antecedentes.....	12
4.2. Células Madre Mesenquimales.....	13
4.2.1. Definición y aspectos generales.....	13
4.2.2. Historia.....	15
4.2.3. Fuentes de obtención.....	15
4.2.4. Cultivo de células madre mesenquimales.....	17
4.2.5. Caracterización.....	18
4.3. Caracterización Inmunofenotípica.....	19
4.4. Capacidad de diferenciación	21
4.4.1. Diferenciación osteogénica.....	22
4.4.2. Diferenciación adipogénica.....	25
4.4.3. Diferenciación condrogénica	27
4.4.4. Diferenciación hacia otros tipos celulares.....	29
4.5. Importancia clínica.....	29
5. JUSTIFICACIÓN.....	35
6. HIPÓTESIS.....	36
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
7.1. Material biológico.....	37
7.2. Metodología.....	38
7.2.1. Obtención de células mononucleares.....	38
7.2.2. Cultivo y aislamiento de MSCs.....	39
7.2.3. Inmunotipificación.....	40
8. RESULTADOS	41
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
10. CONCLUSIONES.....	49
11. RECOMENDACIONES.....	50
12. GLOSARIO.....	51

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
14. ANEXO 1.....	57
15. ANEXO 2.....	59
16. ANEXO 3.....	60
17. ANEXO 4.....	62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características del cultivo celular.....	42
2. Características del cultivo de pase 1.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Morfología de células madre mesenquimales.....	14
2. Funcionamiento del citómetro de flujo.....	20
3. Proceso molecular de diferenciación osteogénica de las MSCs.....	24
4. Diferenciación osteogénica de las MSCs con tinción rojo de alizarina.....	25
5. Cascada de activación de la diferenciación adipogénica de las MSCs.....	26
6. Diferenciación adipogénica de las MSCs de médula ósea con tinción rojo al aceite O.....	27
7. Proceso molecular de condrogénesis en las MSCs.....	28
8. Diferenciación condrogénica de las MSCs con tinción azul alcian.....	29
9. Esquema de los mecanismos de inmunoregulación de las MSCs sobre diferentes células del sistema inmunológico.....	33
10. Obtención de células mononucleares.....	39
11. Cultivo de células mononucleares en placa de 35 x 10mm.....	40
12. Cultivo de células mononucleares en frasco de 25cm ²	40
13. Proporción de células obtenidas en el cultivo.....	43
14. Fotografías de las etapas del cultivo celular.....	43
15. Cultivos de células fibroblastoides al 80% de confluencia.....	44
16. Inmunofenotipo de células adherentes de muestra 1	46
17. Inmunofenotipo de células adherentes de muestra 2.....	46
18. Inmunofenotipo de células adherentes de muestra 3.....	47

RESUMEN

Las células madre mesenquimales (MSCs), un tipo de células madre adultas, son células adherentes fibroblastoides capaces de diferenciarse a múltiples linajes de origen mesodérmico, como osteoblastos, adipocitos y condrocitos; además tienen la característica de no presentar marcadores de origen hematopoyético. Tienen múltiples aplicaciones clínicas a causa de su gran capacidad de autorenovación, proliferación, diferenciación y modulación de respuestas inmunes. Las MSCs se obtienen principalmente de la médula ósea por sus destacadas propiedades autoregenerativas e inmunomoduladoras, sin embargo, debido a que es un procedimiento invasivo y doloroso se han buscado nuevas alternativas que permitan obtener los mismos resultados sin causar daño adicional al paciente. El objetivo del trabajo es realizar la obtención y caracterización de células madre mesenquimales a partir de aféresis de sangre periférica para su potencial uso clínico. Se emplearon muestras de aféresis de sangre periférica de donantes aparentemente sanos de acuerdo con la Norma oficial mexicana 253-SSA1-2012. Se desarrolló el cultivo celular en medio X-VIVO10™ con y sin suplementación con plasma autólogo y/o lisado plaquetario. La caracterización fue por medio de citometría de flujo. Al concluir se logró el aislamiento del 93% de MSCs a partir de sangre periférica, confirmadas por el inmunofenotipo característico CD73+, CD90+ y CD105+.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las células madre se están utilizando cada vez más con fines terapéuticos debido a que sus propiedades, disponibilidad y facilidad de cultivo las vuelven ideales para diversas aplicaciones clínicas. Las células madre mesenquimales o MSCs, son un grupo de células madre adherentes de aspecto fibroblastoide (Arévalo-Romero, Páez- Guerrero y Rodríguez-Pardo, 2007). Principalmente se aíslan de la médula ósea (Bentivegna *et al.*, 2016), sin embargo, se han encontrado en otras fuentes como sangre de cordón umbilical, placenta, tejido adiposo entre otras menos frecuentes (Chen *et al.* 2015). Lo más importante es que no han demostrado ser dañinas al ser trasplantadas (Flores–Figuroa, Montesinos y Mayani, 2006).

Principalmente se caracterizan por su gran potencial de proliferación y diferenciación. *In vitro*, las MSCs tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares de origen mesodérmico (Zhang *et al.*, 2014), como fibroblastos medulares, adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Flores–Figuroa *et al.*, 2006). Además, pueden diferenciarse en células distintas a las de su tejido original, como ejemplo, células musculares, cardiomiocitos, neuronas, hepatocitos, entre otras (Arévalo-Romero *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2016). Generalmente presentan morfología espigada o de forma de huso, o bien morfología romboide, pese a que, en cultivo muestran gran heterogeneidad. Así mismo, expresan los marcadores de superficie celular CD73, CD90 y CD105, mientras que son carentes de CD34, CD45, CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-DR (Chen *et al.*, 2015).

Estas células al ser componentes del estroma medular son capaces de producir y secretar diversas moléculas importantes para la hematopoyesis como componentes de la matriz extracelular, citocinas y factores de crecimiento (Flores–Figuroa *et al.*, 2006). Las MSCs tienen efectos inmunosupresores de la función inmune de las principales poblaciones celulares que intervienen en el reconocimiento y la eliminación de aloantígenos (Li *et al.*, 2009).

Los principales criterios que se utilizan actualmente para caracterizar e identificar estas células son su capacidad de autorenovación y diferenciación en tejidos de origen mesodérmico, combinado con la falta de expresión de moléculas hematopoyéticas (Chen *et al.*, 2015). Debido a su plasticidad en el desarrollo, la utilización de MSCs en terapia celular se ha convertido en una nueva estrategia para la sustitución de tejidos dañados.

El presente trabajo constituye la primera parte del proyecto: “Obtención y caracterización de células estromales mesenquimales a partir de aféresis de sangre periférica por técnicas convencionales y microespectroscopia RAMAN”; Clave USO313003343 en desarrollo por el Cuerpo Académico: Biomedicina, Química y Nutrición en la Universidad de Sonora, con el objetivo

de realizar la obtención y caracterización de células madre mesenquimales a partir de aféresis de sangre periférica para su potencial uso clínico.

OBJETIVOS

General

Realizar la obtención y caracterización de células madre mesenquimales a partir de aféresis de sangre periférica para su potencial uso clínico.

Específicos

1. Analizar las condiciones de cultivo necesarias para la obtención de células madre mesenquimales a partir de aféresis de sangre periférica.
2. Desarrollar el cultivo y expansión de células madre mesenquimales de sangre periférica.
3. Realizar la inmunotipificación de las células obtenidas en el cultivo.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

Las células madre (CM) son un grupo de células indiferenciadas con potencial proliferativo elevado que presentan dos características fundamentales: son capaces de autorenovarse y poseen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones específicas en el organismo (Flores–Figuroa *et al.*, 2006). Estas células se encuentran en todos los organismos multicelulares (Jaime–Pérez, Garza-Veloz y Ortiz-López, 2007); junto con las células tumorales son las únicas células de mamíferos capaces de proliferar y mantener su potencial de diferenciación indefinidamente (Bernard, 2010). Han sido extensamente estudiadas debido a su potencial en el desarrollo de terapias clínicas (Kadir *et al.*, 2012).

Las CM ocupan cierto protagonismo desde hace algún tiempo en el escenario científico mundial gracias a su enorme plasticidad. Son células inmaduras porque aún no se conoce su destino final, y esa inmadurez es su atractivo principal que las convierte en células con un extraordinario potencial (Pérez de Prada, 2007). Se conocen y estudian desde hace tiempo en diferentes tejidos, como la epidermis, el intestino y la sangre, cuyas células se renuevan con frecuencia. Así mismo, demuestran que las CM se mantienen aún después del desarrollo embrionario del organismo adulto, con la función de renovar su progenie (Jaime–Pérez *et al.*, 2007).

Dependiendo de su origen, las CM pueden dividirse en células madre embrionarias y células madre adultas (Flores–Figuroa *et al.*, 2006). Las células madre embrionarias (CMEs) se originan en la masa celular interna del blastocito durante el desarrollo embrionario y son pluripotentes, es decir, pueden diferenciarse en todos los tipos celulares del organismo. Las células madre adultas (CMAs) son clasificadas como células multipotentes ya que generan los tipos celulares pertenecientes a un mismo tejido (Kadir *et al.*, 2012).

Las CMAs provienen principalmente de la médula ósea, mismas que son capaces de generar las células sanguíneas y del sistema inmune (Mata-Miranda, Vázquez-Zapién y Sánchez-Monroy, 2013). Las CMEs son más versátiles, porque pueden dar lugar a gran variedad de tejidos, sin embargo, su uso es controversial debido a problemas éticos, así como incompatibilidades inmunes y preocupaciones sobre el desarrollo de teratomas malignos a partir de las células administradas (Flores–Figuroa *et al.*, 2006). Por otra parte, en los últimos años ha crecido notablemente el interés en las CMAs de múltiples tejidos humanos porque no representan ningún reto ético, se obtienen de tejidos que son desechados y, como su uso es autólogo, no existen problemas de incompatibilidad y rechazo (Kadir *et al.*, 2012).

A su vez, las CMAs se dividen en dos tipos: células madre mesenquimales y células madre hematopoyéticas. Las células madre mesenquimales (MSCs) se definen generalmente como células fibroblastoides, autoreplicables y multipotenciales con la habilidad de diferenciarse en todos los tejidos conectivos no hematopoyéticos de linaje mesenquimal (Bernard, 2010). Además, estas células han demostrado tener potencial para diferenciarse en otros tejidos como hepático, renal, cardíaco y neuronal, mostrando así su pluripotencialidad (Kadir *et al.*, 2012); se sugiere que las MSCs son responsables del recambio y mantenimiento normal de los tejidos mesenquimales adultos (Lyahyai *et al.*, 2012). Las células madre hematopoyéticas (CMHs) se definen por su habilidad para diferenciarse en todos los linajes hematopoyéticos *in vivo* y sostener la producción de esas células durante la vida del individuo. Este tipo de células han sido utilizadas para la recuperación de la función linfhematopoyética después de tratamientos mieloablativos y no mieloablativos (Kadir *et al.*, 2012).

Dentro del grupo de las CMAs, las CMHs han sido las más estudiadas, tanto que en la actualidad se tiene un panorama bastante claro de su estructura y biología. El estudio de CM de otros tejidos ha sido más reciente, en específico el de las MSCs. Éste comenzó en la década de los 70's y estuvo enfocado primordialmente al conocimiento de su papel en la formación del estroma hematopoyético (Flores–Figuerola *et al.*, 2006).

A pesar de ser una opción terapéutica para múltiples enfermedades, el estudio de las MSCs es controversial y no se cuenta con una técnica estándar para su obtención ni una nomenclatura aceptada universalmente (Flores–Figuerola *et al.*, 2006).

Células Madre Mesenquimales

Definición y Aspectos Generales

Las células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) son un grupo de células adherentes de aspecto fibroblastoide capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Arévalo-Romero *et al.*, 2007). Están localizadas principalmente en la médula ósea de los adultos, formando parte del estroma hematopoyético, donde representan una pequeña fracción (<0.1%) (Chen *et al.*, 2015). Las MSCs tienen efectos inmunosupresores de la función inmune de las principales células que intervienen en el reconocimiento y la eliminación de aloantígenos (Li *et al.*, 2009).

Morfológicamente se caracterizan por ser de forma espigada, o de huso, con la presencia de un núcleo central alargado que contiene de dos a tres nucléolos (Fig. 1) (Flores–Figuerola *et*

al., 2006). Aunque algunos autores han reportado que los cultivos de MSCs contienen células con una morfología homogénea, existe una mayor evidencia de que éstas son heterogéneas y contienen células, morfológica y funcionalmente distintas (López-Lucas, 2015).

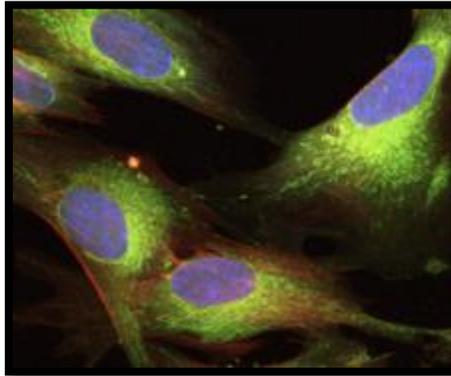


Figura 1. Morfología de células madre mesenquimales; Areválo-Romero *et al.*, 2007.

Recientemente, mediante estudios por citometría de flujo, se han separado a las MSCs en tres subpoblaciones: una de células pequeñas, fusiformes y agranulares (RS-1), otra de células pequeñas y granulares (RS-2), y la última conformada por células más grandes y granulares, también denominadas células mesenquimales maduras o mMSCs (Flores–Figuroa *et al.*, 2006). Así mismo, postularon que las células RS–1 corresponden a MSCs progenitoras con un índice de proliferación elevado que dan origen a las células RS–2, estas últimas originando a las mMSCs (López-Lucas, 2015).

Las MSCs se aíslan generalmente mediante selección por adherencia a plástico de cultivo celular, por ser capaces de adherirse y crecer en condiciones *in vitro* en las que otros tipos celulares habitualmente no proliferan (Bernard, 2010).

Debido a su relativamente sencilla obtención, su elevada capacidad de proliferación y a su amplio potencial de diferenciación, las MSCs son uno de los tipos de CMAAs más empleados en terapia celular. Por último, una propiedad especialmente interesante de las MSCs es su capacidad, tanto *in vitro* como *in vivo*, de inhibir la respuesta inmunitaria (Bernard 2010).

Historia

El primero en plantear la hipótesis de la presencia de células con capacidad regenerativa fue Cohnheim (1867), quien a finales del siglo XIX propuso que los fibroblastos derivados de médula ósea participaban en la curación de heridas de todo el organismo. Posteriormente, Maximow (1924) describió una relación entre el desarrollo de tejido mesodérmico y la sangre durante la embriogénesis. Entre los años 60 y 70, Friedenstein y colaboradores (1976) hallaron en el estroma de la médula ósea de ratones y cobayos un tipo de células adherentes al plástico con elevada capacidad para replicarse *in vitro* y formadoras de colonias fibroblásticas (Flores–Figuroa *et al.*, 2006). A este tipo de células las nombraron como “Unidades formadoras de colonias de fibroblastos”. Posteriormente descubrieron que estas colonias, al ser trasplantadas *in vivo* en cobayos podían generar osteoblastos (López-Lucas, 2015).

Con base en la evidencia experimental obtenida hasta entonces, a finales de los 80’s Owen y Friedenstein propusieron que existía una célula madre presente en el tejido conjuntivo asociado a médula ósea, capaz de dar origen a diferentes tipos celulares (Owen, Friedenstein, 1988; Flores–Figuroa *et al.*, 2006). Seguidamente, esas células fueron aisladas y definidas como células madre mesenquimales (Kassis *et al.*, 2006).

Fuentes de Obtención

Los tejidos de donde pueden obtenerse MSCs son muchos y variados. En un inicio Friedenstein y colaboradores aislaron MSCs de médula ósea, del estroma de bazo y timo de ratones (Muntión-Olave, 2010). Las células de médula ósea son las más utilizadas en el área de investigación por las propiedades autoregenerativas e inmunomoduladoras que presentan. No obstante, se han encontrado en otras fuentes como el tejido adiposo, dermis (Salerno *et al.*, 2017), ligamento periodontal, sangre periférica, pulpa dental, folículos capilares, epitelio intestinal y tejido cardíaco (Shi *et al.*, 2012). También se ha descrito la presencia de MSCs en pulmón, músculo, sistema nervioso central y líquido sinovial.

Además, se pueden aislar MSCs de tejidos fetales, como placenta, membrana amniótica, amnios y vellosidades coriónicas de la placenta (Muntión-Olave, 2010). Se han obtenido diferentes tipos de MSCs a partir del cordón umbilical, dependiendo de si se aíslan de la totalidad del mismo, de la gelatina Wharton, o de las zonas perivasculares. También se pueden encontrar en la sangre menstrual (Hofer y Tuan, 2016) y en la leche materna (López-Lucas, 2015).

A pesar de su diverso origen, todas estas células tienen escasas diferencias en cuanto a morfología, capacidad de adherencia a superficies plásticas, senescencia celular y/o capacidad de diferenciación. Este hecho unido a la inexistencia de un marcador específico que identifique

cada población celular hace que se las considere también MSCs y que la utilización de unas dependa de la disponibilidad o accesibilidad a los tejidos donantes y de la facilidad de expansión *in vitro*. Sin embargo, se han descrito diferencias en su papel funcional (López-Lucas, 2015). Estas poblaciones son heterogéneas y en la mayoría de los casos no presentan todas las características establecidas para las MSCs derivadas de médula ósea (Lyahyai *et al.*, 2012).

Aunque la obtención de MSCs de médula ósea es la más realizada, el procedimiento de extracción es traumático y la cantidad de material extraído es limitado. Por lo tanto, la exploración de nuevas fuentes y técnicas de aislamiento para obtener dichas células es de gran interés (Kassis *et al.*, 2006).

Una alternativa que pocas veces ha sido empleada por los investigadores es aislar MSCs a partir de aféresis de sangre periférica. La aféresis es la extracción de sangre total de un paciente o donante, la separación de sus diferentes componentes según tamaño, densidad y peso en el campo gravitacional de una centrífuga, la retención del componente deseado y la devolución de los elementos remanentes (Leticia, 2006). La aféresis se ha utilizado con gran éxito en la obtención de células madre. Al hacer la comparación con las obtenidas de médula ósea existen grandes ventajas como no requerir anestesia, obtención de una mayor cantidad de células, recuperación más rápida de la hematopoyesis y efectos adversos menos frecuentes, menos intensos y de menor duración (Lordméndez-Jacóme, 2015).

En la circulación de individuos sanos existe una pequeña población de células mononucleares CD34- que proliferan rápidamente en cultivo *in vitro* como células adherentes de morfología variable, características que se encuentran en las MSCs derivadas de la médula ósea. Así mismo, la sangre autóloga puede proveer células útiles para generación de tejidos y terapia génica (Zvaifler *et al.*, 2000). El aislamiento de MSCs a partir de sangre periférica se ha reportado en una gran variedad de mamíferos, incluyendo cuyos, conejos, perros, ratones, ratas, caballos y humanos (Lyahyai *et al.*, 2012), sin embargo, en México no se ha realizado ninguna investigación a partir de esta fuente.

Lyahyai y colaboradores describieron por primera vez el aislamiento y caracterización de MSCs a partir de sangre periférica de ovejas. Esas células expresaron los marcadores inmunofenotípicos mesenquimales y retuvieron la habilidad de diferenciarse hacia adipocitos y osteoblastos. Además, no fue necesario movilizar a las células de la médula ósea para poder separarlas por medio de aféresis (Lyahyai *et al.*, 2012).

Chong y colaboradores de igual manera demostraron que sí se podían aislar MSCs de sangre periférica, no obstante, el número de células aisladas es limitado en comparación a las provenientes de aspirado de médula ósea. En ese estudio las células adherentes aisladas

presentaban la capacidad de autorenovación y diferenciación en tres líneas al igual que las MSCs de médula ósea (Chong *et al.*, 2012).

Es importante resaltar que las proporciones de MSCs y factores osteogénicos están en mayor proporción en médula ósea que en sangre periférica (Chi-Chien *et al.*, 2014); sin embargo, la obtención de estas a partir de aféresis de sangre periférica aun representa una alternativa viable.

Las MSCs de sangre periférica o sus precursores existen en la circulación de individuos normales y proliferan en cultivo (Ukai *et al.*, 2007). Por lo anterior y debido a que la recolección de sangre por aféresis es un procedimiento menos invasivo para obtener células madre, este método podría representar una ventaja significativa para pacientes y, así mismo, podría ser una técnica ideal de obtención de MSCs para futuras aplicaciones clínicas (Lyahyai *et al.*, 2012).

Cultivo de Células Madre Mesenquimales

Las condiciones ideales de cultivo se realizan con el fin de mantener las características de las MSCs como genotipo y funciones similares a las que exponen en su nicho original, proliferación indefinida y plasticidad activa para diferenciarse en linajes múltiples. La expansión *in vitro* de MSCs es usualmente realizada con medio Dulbecco modificado por Eagle, suplementado con 5-10% de suero fetal bovino (SFB), el cual tiene un alto contenido de factores de crecimiento y de adherencia, así como componentes nutricionales que se requieren para el mantenimiento y crecimiento celular (Heyes *et al.*, 2016).

Muchos procedimientos de expansión de MSCs requieren medios con SFB para el cultivo celular y tripsina porcina para disociar las células, pero el uso de esos ingredientes trae el riesgo de transmitir virus desconocidos, mycoplasma, priones o agentes zoonóticos desconocidos. Además, la presencia de una alta cantidad de proteínas xenogénicas puede causar reacciones inmunes en los pacientes humanos (Swamynathan *et al.*, 2014). Medios nuevos enriquecidos con lisado plaquetario humano, suero autólogo, o medios libres de suero químicamente definidos suplementado con factor de crecimiento recombinante humano están en prueba para demostrar su seguridad. A la terminación del cultivo es posible congelar y criopreservar las MSCs, manteniendo el potencial de crecimiento, diferenciación e inmunomodulación inclusive años después del cultivo (Heyes *et al.*, 2016).

La investigación básica del potencial inmunomodulatorio de las MSCs sugiere que las condiciones de cultivo, tipo de tejido y las características del donante pueden tener un impacto significativo en las características de las células. Éstas son cultivadas repetidamente con el fin de

incrementar su número, sin embargo, un aumento en el número de pases puede conducir a la progresiva senescencia celular, disminución de la tasa de proliferación, y más importante, una tendencia a perder sus propiedades inmunomoduladoras con un número de pases superior a 7 (Heyes *et al.*, 2016).

Se ha reportado que el fenotipo, potencial de diferenciación y expresión de genes de las MSCs cambian significativamente con los pases *in vitro* (Shi *et al.*, 2012). Así mismo se ha formulado la hipótesis de que el genotipo de cada individuo participa en la expresión y secreción de citocinas, dando énfasis a la medicina personalizada utilizando dosis de MSCs combinadas con proteínas o factores de crecimiento autólogos (López-Lucas, 2015).

Caracterización

Uno de los principales problemas para la caracterización de las MSCs es la falta de un marcador específico (Muntión-Olave, 2010). Tras el descubrimiento y caracterización de las MSCs, los científicos deseaban un método para aislar de forma prospectiva poblaciones de células progenitoras basados la selección de marcadores expresados en la superficie celular. Con el fin de elaborar una definición de MSCs, en el 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (I.S.C.T) propuso los criterios mínimos para definir las MSCs humanas usadas tanto para estudios experimentales como para estudios clínicos (López-Lucas, 2015; Muntión-Olave, 2010). Dichos criterios son:

- Capacidad de adherencia al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar.
- Expresión de CD90, CD73, y CD105 y ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 ó CD11b, CD79 α ó CD19 y HLA-DR o MHC de clase II.
- Capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos.

Caracterización Inmunofenotípica

Como una herramienta para el estudio del inmunofenotipo de las MSCs se emplea la citometría de flujo. Esta es una técnica que permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir del estudio individualizado de un gran número de células (entre 5,000 y 10,000) (CNB, 2001).

Representa un método rápido objetivo y cualitativo de análisis de células, núcleos, mitocondrias u otras partículas en suspensión (Barrera-Ramírez *et al.*, 2004).

El fundamento de la técnica es el siguiente: una suspensión de células en solución isotónica se inyecta al flujo laminar, donde las células pasan una después de la otra a través de un capilar. Sobre esta corriente de células se hace incidir un haz de luz láser; cuando este rayo incide en una célula, la luz de excitación sale hacia delante y hacia los lados. La luz dispersada hacia adelante provee información sobre el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados provee información sobre la granularidad, tamaño y morfología celular. Si la célula va marcada con un fluorocromo, la luz fluorescente se procesa a través del fotomultiplicador en el sistema procesador de datos (Salgado-Lynn, 2002). La dispersión, reflexión, y/o emisión de luz por fluorocromos es analizada en duración, intensidad y espectro; los resultados son analizados por el software del citómetro y desde allí pasados a archivos binarios que posteriormente pueden ser analizados con detenimiento (Fig.9) (CNB, 2001). Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula (Salgado-Lynn, 2002).

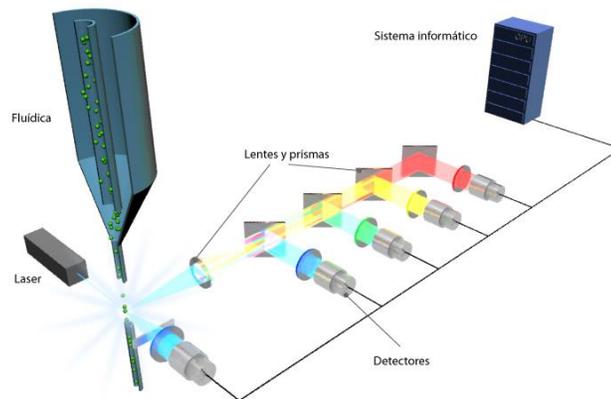


Figura 2. Funcionamiento de citómetro de flujo; Díaz-Martínez y Martos, 2011).

La fluorescencia ha sido usada para visualizar ciertas moléculas y estructuras por medio de la microscopía óptica durante muchos años. Ésta ha encontrado una extensa área de aplicación en la citometría de flujo. La capacidad para detectar simultáneamente la fluorescencia de dos, tres, cuatro o actualmente hasta trece fluorocromos de diferentes longitudes de onda, abre completamente el campo del análisis multiparamétrico. (Barrera-Ramírez *et al.*, 2004). Así,

es posible caracterizar una célula por su fenotipo de superficie y, al mismo tiempo, conocer el estado intracelular que guarda la misma, como su patrón de secreción de citocinas, o bien, la etapa del ciclo celular en la que se encuentra. La aplicación de la citometría de flujo al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula, como el tamaño y complejidad, y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos en los diferentes compartimentos celulares, como superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo, lo que contribuye a aumentar, tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba (Barrera-Ramírez *et al.*, 2004).

El uso de la citometría de flujo tiene potencial para identificar a las MSCs de una manera más precisa (Chi-Chien *et al.*, 2014). Las MSCs expresan los marcadores de superficie celular CD73, CD90 y CD105, y son carentes de CD34, CD45, CD11b, CD31, CD14, CD56, CD68, CD133, CD79 α o CD19 y HLA-DR (Chen *et al.*, 2015; Flores-Figueroa *et al.*, 2006).

La identificación de MSCs *in situ* ha sido difícil en parte porque tienen pocos marcadores moleculares. Una serie de anticuerpos monoclonales (anticuerpos SH) se han utilizado para identificar MSCs de una población de células de médula ósea (Zvaifler *et al.*, 2000). El más utilizado (SH-2) ha demostrado recientemente reaccionar con endoglina (CD105), una glicoproteína que forma parte del complejo del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), y se expresa en macrófagos activados, precursores eritroides, fibroblastos, células foliculares dendríticas, melanocitos, células cardíacas, células vasculares de músculo liso y células endoteliales. CD105 es una citocina implicada en la proliferación, diferenciación y migración celular. En algunos estudios se ha demostrado que regula la expresión de ciertos componentes de la matriz extracelular como fibronectina, colágeno y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) (Fuentes-Lacouture, 2008), por lo cual se cree que está relacionada con procesos de angiogénesis y reparación vascular (Arévalo-Romero *et al.*, 2007).

I.S.C.T. propone la molécula CD73 o 5'ectonucleotidasa como un marcador de linaje para las MSCs (Arévalo-Romero *et al.*, 2007). La función principal de la enzima 5'ectonucleotidasa es catalizar la desfosforilación extracelular de nucleótidos a sus correspondientes nucleósidos. Esta reacción permite la entrada de adenosina, inosina y guanosina a la célula y su posterior conversión en ATP y GTP para ser utilizado como fuente de energía. CD73 ha sido encontrada en linfocitos, fibroblastos, tejido nervioso, células dendríticas foliculares, hepatocitos de ratas, neutrófilos de cerdos y MSCs (Fuentes Lacouture, 2008). No obstante, en éstas últimas se cree que CD73 está más relacionado con mecanismos de adhesión celular, porque se ha encontrado coexpresada con moléculas tipo $\alpha 2$ integrinas (Arévalo-Romero *et al.*, 2007).

Las MSCs también expresan la molécula CD90 o Thy-1, una proteína que forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas y cuyo principal ligando es CD45; se expresa entre el 10-

40% de las células CD34 y en mayor proporción en tejido conectivo y en células del estroma medular. Su función exacta es desconocida, pero se cree que se encuentra involucrada en el reconocimiento, adhesión y activación de linfocitos, señales de apoptosis, supresión de tumores y proliferación y migración de fibroblastos; esto indica que Thy-1 es un importante regulador de interacciones entre célula-célula y célula-matriz (Fuentes-Lacouture, 2008). Aunque no se conoce su función en las MSCs, se ha demostrado que si son sometidas a estrés mecánico se diferencian hacia células similares a osteoblastos, lo que podría mostrar que este antígeno es un marcador de precursores mesenquimales tempranos que pueden diferenciarse en osteoblastos (Arévalo-Romero *et al.*, 2007).

Además de los antígenos propuestos por I.S.C.T., otros autores proponen moléculas como STRO-1, CD44 y CD166 para la tipificación de MSCs. STRO-1 es un marcador que se expresa en el desarrollo temprano de las MSCs de médula ósea, declinando su expresión cuando se expresan los genes asociados a la diferenciación y expansión osteogénica. CD44 es una molécula de adhesión que actúa mediante la interacción con el ácido hialurónico, osteopontina, colágeno, anquirina, fibronectina y metaloproteasas, y contribuye en procesos de adhesión, migración y proliferación de las MSCs (Fuentes-Lacouture, 2008). Así mismo, se ha sugerido que la molécula CD166 o ALCAM (Molécula de Adhesión Celular de Leucocitos Activados) participa en la hematopoyesis con el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas (Arévalo-Romero *et al.*, 2007).

Capacidad de Diferenciación

Las MSCs se consideran capaces de diferenciarse hacia células de tejidos de estirpe mesenquimal e inclusive de otras estirpes, pero por definición deben diferenciarse al menos a tejido óseo, cartilaginoso y adiposo (Muntión-Olave, 2010).

La diferenciación está regulada por acontecimientos genéticos en los que están implicados factores de transcripción. Una vía particular de diferenciación fenotípica se puede controlar por algunos genes reguladores que inducen la diferenciación de la célula progenitora a un linaje específico. Además de la inducción con factores de crecimiento y productos químicos, se puede construir un microambiente que aporte a las MSCs condiciones adecuadas para su proliferación y diferenciación. Aunque las MSCs pueden diferenciarse en una serie de tejidos *in vitro*, la población de células resultante no imita enteramente los tejidos diana en sus propiedades bioquímicas y biomecánicas (López-Lucas, 2015).

Diferenciación Osteogénica

La diferenciación de las MSCs hacia osteoblastos ha sido ampliamente demostrada *in vitro* (Muntión-Olave, 2010), e implica el progreso de una serie de etapas en las cuales se obtienen estadios intermedios de diferenciación osteogénica que culminan con la formación de osteoblastos maduros y funcionales (López-Lucas, 2015).

Es posible reconstruir este modelo bajo condiciones *in vitro* mediante el cultivo de las MSCs en presencia de factores osteoinductores, como dexametasona, β -glicerofosfato y ácido ascórbico (Muntión-Olave, 2010). La dexametasona estimula la proliferación de las MSCs y permite la diferenciación hacia el linaje osteogénico. El β -glicerofosfato actúa como sustrato de fosfato orgánico, necesario para la formación de hidroxiapatita. En presencia de estos suplementos, las MSCs adquieren cambios morfológicos y aumentan la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, la cual juega un papel fundamental en la mineralización de la matriz extracelular. La fosfatasa alcalina hidroliza los ésteres de fosfato, liberando fósforo inorgánico que produce depósitos de cristales de hidroxiapatita, mineral indispensable para el inicio de la etapa de diferenciación (López-Lucas, 2015).

Previo a la osteodiferenciación las MSCs comienzan a multiplicarse, aumentando la expresión de genes asociados a la proliferación celular, como el factor de transcripción “Core-binding factor α -1” (CBFA1) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Posterior a la proliferación da inicio el proceso de diferenciación caracterizado por la activación de la fosfatasa alcalina, que al eliminar grupos fosfatos produce un pH alcalino y propicia el crecimiento y el desarrollo óseo. La última etapa del proceso osteogénico se caracteriza por la expresión de proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno tipo 1 (López-Lucas, 2015). Además, hay otras proteínas que tienen función de adhesión como la osteonectina, considerada como marcador temprano e involucrada en la unión del colágeno con los cristales de mineral formados. Por su parte la proteína siálica del hueso (BSP) y la osteopontina tienen la función de unir las células diferenciadas con la matriz extracelular a través de las integrinas (Ranera-Beltrán, 2012).

En la diferenciación osteogénica el principal factor a expresar es el factor de transcripción 2 relativo a runt (Runx2). Éste marcador temprano de diferenciación va a activar la expresión de genes relacionados con la formación de la matriz extracelular (Ranera-Beltrán, 2012). Runx2 dirige la diferenciación osteogénica al unirse a un elemento específico del osteoblasto llamado elemento osteocalcino-específico 2 (OSE2) en la región del promotor de los genes diana, regulando la expresión y la activación de genes de osteocalcina y de las BMPs. El proceso anterior aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina y la acumulación de mineral en las células,

conduciendo a la diferenciación osteogénica de las mismas. Todo el proceso se ilustra en la figura 2 (Fuentes-Lacouture, 2008).

El ácido ascórbico es otro suplemento esencial para la diferenciación de MSCs a osteoblastos. Este funciona como cofactor en la hidroxilación de aminoácidos y el procesamiento del colágeno. La síntesis normal de colágeno depende de la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en el retículo endoplásmico de la célula para formar hidroxiprolina e hidroxilisina, donde las enzimas que catalizan esta reacción requieren el ácido ascórbico para funcionar correctamente. Esta reacción es indispensable para la formación de las fibras de colágeno que permiten mantener la estructura de los tejidos (Fuentes-Lacouture, 2008).

Similar a la adipogénesis, la diferenciación osteogénica depende de la superficie de crecimiento, tensión, organización del citoesqueleto y factores solubles apropiados. Un principio general es que la estimulación de la adipogénesis resulta en la supresión de la osteogénesis y viceversa (Bateman *et al.*, 2016).

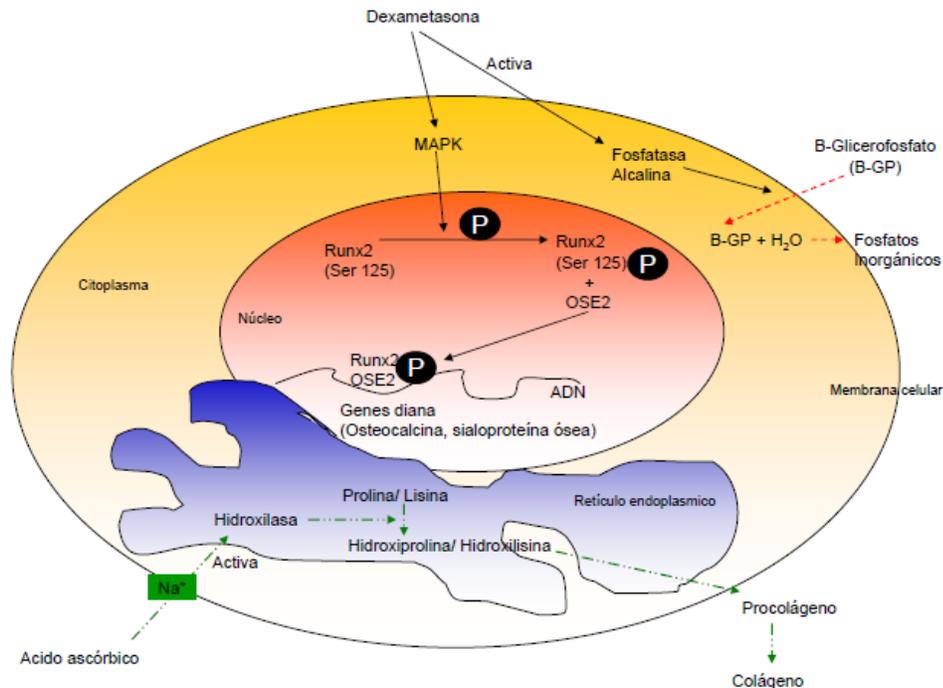


Figura 3. Proceso molecular de diferenciación osteogénica de las MSCs; Fuentes-Lacouture, 2008.

Para analizar la diferenciación *in vitro* hacia osteoblastos se llevan a cabo tinciones específicas que muestran afinidad por el calcio presente en la matriz extracelular, producido por las células diferenciadas. La habilidad de las MSCs para diferenciarse a osteoblastos puede

demostrarse con la tinción de rojo de alizarina (Fig. 3). Este método resulta insuficiente a la hora de cuantificar la diferenciación, por ello se analizan también los genes sobre expresados durante la osteogénesis descritos anteriormente o se determina la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (Ranera-Beltrán, 2012).

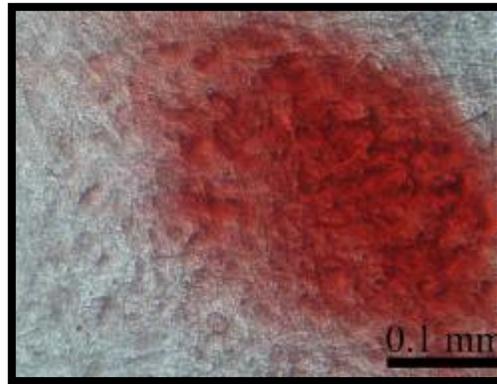


Figura 4. Diferenciación osteogénica de las MSCs demostrada con tinción rojo de alizarina; Lyahyai *et al.* 2012.

Diferenciación Adipogénica

La diferenciación hacia adipocito se consigue *in vitro* al incubar las MSCs en presencia de un medio de diferenciación con factores inductores como dexametasona, insulina, indometacina y 3-isobutilmetilxantina. La dexametasona es un estimulante de la diferenciación de las MSCs al actuar a nivel celular sobre el factor de transcripción de proteínas de unión al potenciador-CCAAT (C/EBP), necesario para el proceso de la adipogénesis. Existen tres isoformas de este factor de transcripción; la dexametasona actúa sobre el C/EBP δ , quien a su vez induce la expresión de C/EBP α y del Receptor Nuclear de Proliferadores de Peroxisomas- γ (PPAR- γ), los cuales permanecen elevados durante el resto del proceso de diferenciación (Fuentes-Lacouture, 2008).

También, la dexametasona induce la expresión de la proteína activadora 2 (aP2), proteína específica del tejido adiposo, la cual debe actuar sinérgicamente con la fosfodiesterasa, 3-isobutilmetilxantina e insulina para inducir la expresión de genes específicos del linaje adipogénico. Por su parte, la indometacina estimula la expresión de PPAR- γ , cuya función es regular el proceso de diferenciación adipogénica (López-Lucas, 2015). La expresión de PPAR- γ , inducida por C/EBP β y δ , se activa en un bucle de avance con C/EBP α para promover la adipogénesis (Bateman *et al.*, 2016).

La insulina participa en este proceso al unirse al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), y lo hace únicamente a concentraciones mayores de las fisiológicas. La insulina también estimula la captación de glucosa por parte de las células adiposas, dentro de las cuales ocurre la glucólisis, formando grandes cantidades de α -glicerofosfato que se acopla con ácidos grasos libres y sintetiza triglicéridos dentro de la célula (Fuentes-Lacouture, 2008). La diferenciación adipogénica se ilustra en la figura 4.

Entre los marcadores que van a ayudar en el seguimiento de las diferentes etapas de la diferenciación adipogénica se encuentran los de expresión temprana, intermedia y tardía. Por ejemplo, la lipoproteinlipasa, enzima que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos, se considera marcador temprano. También se activa la expresión de genes que codifican para proteínas que no están relacionadas con el metabolismo de lípidos, como es el caso de la proteína aP2 involucrada en el transporte intracelular de ácidos grasos, considerada un marcador intermedio. Los genes que codifican para los factores de secreción adiposina y leptina por parte de los adipocitos maduros, y la proteína de unión acil-coenzima A (ACBP) relacionada con el metabolismo de la acil-CoA, se consideran marcadores tardíos (Ranera-Beltrán, 2012).

Trascurridas tres semanas de cultivo se observan vacuolas lipídicas agrupadas en el citoplasma de las células que además expresan el receptor PPAR- α 2, lipoproteinlipasa, la proteína ácida P2 y adiponectina (Muntión-Olave, 2010).

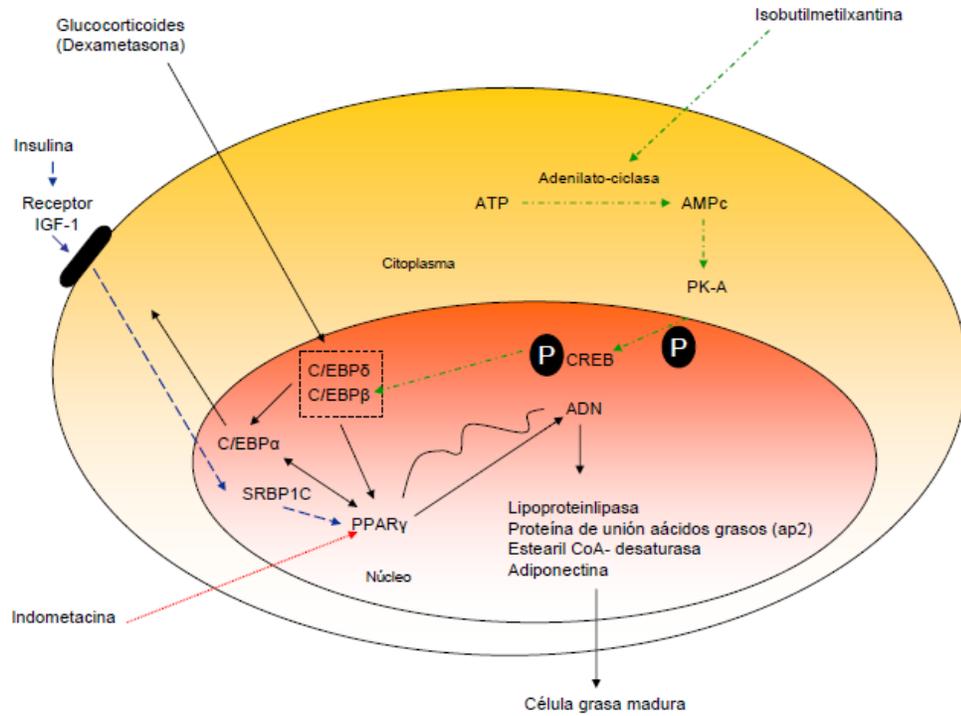


Figura 5. Cascada de activación de la diferenciación adipogénica de las MSCs; Fuentes Lacouture, 2008.

El seguimiento de la diferenciación adipogénica de las MSCs se puede realizar a través del análisis de los diferentes marcadores comentados con anterioridad a nivel proteico o a nivel de transcrito. Además, existen tintes con afinidad específica hacia los ácidos grasos como la tinción con rojo al aceite O (oil-red-O) (Fig.5), o por técnicas citoquímicas que permiten visualizar la formación de gotas lipídicas en el interior de las células diferenciadas (Ranera Beltrán, 2012).



Figura 6. Diferenciación adipogénica de las MSCs de médula ósea con tinción rojo al aceite O; Liu *et al.*, 2016.

Diferenciación Condrogénica

La diferenciación condrogénica de las MSCs *in vitro* imita el proceso de formación de cartílago *in vivo*, y se realiza en un cultivo en tres dimensiones. El objetivo de realizar la diferenciación en este sistema es el de generar un ambiente de hipoxia, porque el cartílago está pobremente vascularizado y contiene niveles muy bajos de oxígeno. La presencia de miembros de la familia TGF- β es determinante para promover la condrogénesis en las MSCs, siendo las isoformas 2 y 3 las que causan mayor efecto al inducir de una forma más rápida la acumulación de proteoglicanos y colágeno tipo II. La familia de las BMPs son proteínas capaces de potenciar el efecto que genera TGF- β (Ranera-Beltrán, 2012).

Para dicho proceso se utiliza un medio que contiene dexametasona, ácido linoleico, insulina bovina, transferrina y TGF- β 1, factor de crecimiento involucrado en su diferenciación *in vivo* (Muntión-Olave, 2010). El TGF- β 1 es un potente inductor de la condrogénesis *in vitro*; su acción está basada en la síntesis de fibronectina, una glicoproteína dimérica que unida a sus receptores de integrinas interviene en la adhesión, migración y señalización celular (Fig. 6) (Fuentes-Lacouture, 2008).

Además, la diferenciación condrogénica de las MSCs conlleva a la rápida biosíntesis de glicosaminoglicanos y a la generación de una matriz extracelular, todo ello acompañado con una variación de la morfología celular. El factor de transcripción desencadenante de estos procesos es SOX-9 (Región determinante de sexo γ -caja 9), que va a regular la expresión del resto de genes relacionados con la condrogénesis. La expresión de este factor va acompañada de la condensación de las células y un aumento en la expresión y secreción de componentes cartilaginosos a la matriz extracelular. La proteína de mayor presencia en este tipo de tejido es el colágeno tipo II, que aumenta progresivamente junto con la proteína de adhesión condroadherina (Ranera-Beltrán, 2012).

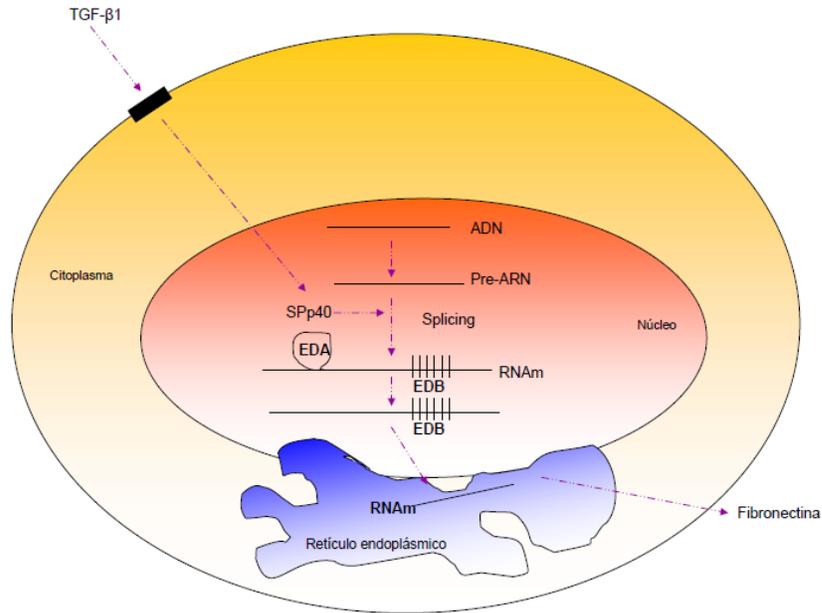


Fig. 7. Proceso molecular de condrogénesis en las MSCs (Fuentes Lacouture, 2008).

Al igual que en la diferenciación a los otros linajes, existen distintas formas de analizar y cuantificar la diferenciación condrogénica. Mientras que tinciones como azul alcian (Fig.7), azul de toluidina y safranina O, tiñen los glicosaminoglicanos (GAG) de la matriz extracelular, las técnicas inmunohistoquímicas permiten determinar las moléculas de colágeno tipo II y otras glicoproteínas de la matriz extracelular. También se pueden cuantificar a través de la reacción con DMB (azul de dimetilmetileno) (Ranera-Beltrán, 2012).

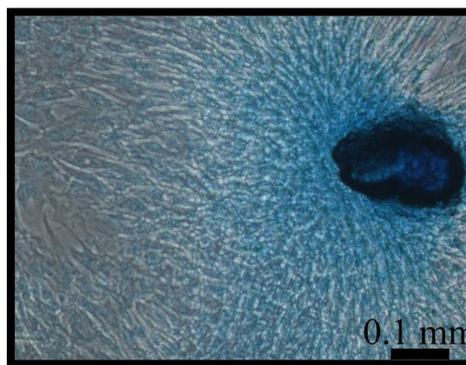


Figura 8. Diferenciación condrogénica de MSC con tinción azul alcian; Lyahyai *et al.*, 2012.

Diferenciación Hacia Otros Tipos Celulares

La diferenciación hacia otros tipos celulares no se ha estudiado tan a fondo como las anteriores. En cuanto la diferenciación a miocitos, diferentes autores han descrito que las MSCs al ser tratadas con 5-azacitidina pueden dar lugar a células musculares (Muntión-Olave, 2010).

Además de la diferenciación a tejidos de origen mesodérmico, algunos grupos han descrito que las MSCs son capaces de adquirir características morfológicas y/o funcionales de células renales, hepáticas e incluso neuronales cuando se utilizan determinadas condiciones de cultivo, demostrando así la multipotencialidad de las células (Muntión-Olave, 2010).

A través de manipulación genética de las MSCs se ha conseguido crear células productoras de insulina, que pueden suponer un gran avance para la terapia de reemplazo en el tratamiento de diabetes. Por otra parte, la transdiferenciación de las MSC hacia células similares a hepatocitos genera una amplia expectativa en el campo de los trasplantes debido a la escasez de órganos disponibles (Ranera-Beltrán, 2012).

Una de las diferenciaciones de las MSCs sobre la que más se investiga es hacia células neurales, por la aplicación que podrían tener para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Los procedimientos que se aplican varían desde la inducción química, transfección génica de moléculas participes en la neurogénesis o directamente el cultivo de MSCs con células neurales (Ranera-Beltrán, 2012).

Importancia Clínica

Las terapias con células madre iniciaron hace 50 años con el primer trasplante de células madre hematopoyéticas, el cual tenía la finalidad de reemplazar estromas hematopoyéticos dañados (Ratajczak, Bujko y Wojakowski, 2016).

Según Gimble y colaboradores para que las células madre puedan ser utilizadas con fines médicos deben cumplir con los siguientes criterios:

1. Presencia en cantidades muy abundantes, de millones a billones de células.
2. Aislables con procedimientos mínimamente invasivos.
3. Diferenciables en múltiples linajes celulares de manera regulada y reproducible.
4. Trasplantables en forma autóloga o alogénica.
5. Manipulables de acuerdo con las actuales Guías de Buena Práctica (Gimble, Katz y Bunnell, 2007).

Las MSCs se presentan como una herramienta terapéutica que podría aplicarse a diversas enfermedades degenerativas e inmunes (Muntión-Olave, 2010). La principal propiedad trófica de las MSCs es la secreción de factores de crecimiento y otras citocinas para inducir la proliferación

celular y la angiogénesis. Las MSCs expresan proteínas mitogénicas tales como el factor de crecimiento transformante alfa- (TGF- α), TGF- β , factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), para aumentar el número de fibroblastos y la división celular. Por otro lado, liberan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y angiopoyetina-1 para reclutar células de linaje endotelial y promover la neoangiogénesis (López-Lucas, 2015). Además, las MSCs expresan una variedad de receptores incluyendo de integrinas y selectinas, que permiten la extravasación de las MSCs a los sitios donde son requeridas (Hofer y Tuan, 2016). Sin embargo, estas células no expresan sus propiedades inmunomoduladoras de forma constitutiva: deben ser inducidas por mediadores inflamatorios liberados de células inmunes activadas, como IFN- γ , IL1 β , TNF- α , también el lipopolisacárido de algunas bacterias o las condiciones de hipoxia, todos dependientes del factor nuclear (NF)-Kb (Heyes *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2012).

En años recientes, las MSCs han venido a ser reconocidas como uno de los tipos de células madre adultas que participan activamente en la reparación tisular (Wang *et al.*, 2014). Debido a su amplia capacidad de autorenovación, proliferación, multipotencialidad, propiedades inmunomoduladoras y la capacidad para ser modificadas por técnicas de ingeniería molecular han demostrado que podrían ser una herramienta terapéutica útil en la reparación y regeneración de tejidos, principalmente en el sistema cardiovascular, aparato locomotor, trasplante hematopoyético, tracto gastrointestinal, páncreas e incluso en el sistema nervioso central. Otra aplicación potencial es su uso en terapia génica (Muntión-Olave, 2010).

Cuando el daño tisular ocurre las MSCs, ya sean vecinas inmediatas o aquellas derivadas de la médula ósea, pueden migrar al tejido dañado. Las células deben interactuar de cerca con las células del estroma e inflamatorias una vez alcanzado el sitio de daño para participar en la reparación del tejido (Shi *et al.*, 2012). Se cree que las MSCs ejercen sus efectos terapéuticos en los tejidos dañados de dos maneras: por medio de reemplazo o potenciando las propiedades de las células (Wang *et al.*, 2014).

En el sitio de la herida, las MSCs contribuyen a la generación de tejido vascularizado, promueven la reepitelización y atenúan la formación de cicatriz. Simultáneamente, modulan la inflamación y la infección, promueven la migración celular, la proliferación, diferenciación y el reclutamiento de otras células importantes en la reparación del tejido (Chen *et al.*, 2015). Su vía de administración puede ser intravenosa o *in situ* (Muntión-Olave, 2010).

Además de las MSCs de origen autólogo, aquellas de fuentes alogénicas son eficaces para tratamiento de daños tisulares, porque estas células no expresan en su superficie el complejo

mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), molécula implicada en el rechazo de trasplantes (Wang *et al.*, 2014). Como resultado de la ausencia del MHC-II el tratamiento *in vivo* con MSCs parece no activar respuestas inflamatorias ni rechazos (Ranera-Beltrán, 2012).

Las MSCs inhiben la formación de cicatrices en la piel mediante la producción de factores antifibróticos que permiten atenuar la inflamación excesiva, la proliferación de miofibroblastos, así como la reducción del depósito de colágeno y la producción de matriz extracelular para promover la remodelación del tejido (Chen *et al.*, 2015).

Además de la reparación tisular, las MSCs tienen potencial para suprimir respuestas inmunes descontroladas, promoviendo la regulación negativa *in situ* durante la respuesta inflamatoria (Shi *et al.*, 2012). La función inmunomoduladora de estas células es altamente plástica para la secreción de factores solubles, dependiendo de la fuerza de activación del sistema inmune, los tipos de citocinas inflamatorias presentes y el efecto de inmunosupresores (Heyes *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014).

El interferón (IFN) γ y en combinación con citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 α o IL-1 β , puede estimular a que las MSC produzcan altos niveles de inmunosupresores, así como quimiocinas y moléculas de adhesión, incluyendo ligandos de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular celular-1 (VCAM-1). Su acción lleva a la acumulación de células inmunes en corta proximidad a las MSCs, y a la fabricación de un microambiente en donde los efectos de los factores de acción locales producidos por las MSCs son amplificados y encaminados a potenciar la inmunosupresión (Ma *et al.*, 2014).

Las MSCs reducen la proliferación y la función de los linfocitos T, linfocitos citotóxicos naturales, linfocitos B, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Hynes *et al.*, 2016). Las MSCs inhiben la proliferación de linfocitos T cooperadores al detener la diferenciación hacia los fenotipos TH1 y TH17, y promueven la generación de linfocitos T reguladores (Chen *et al.*, 2015). Esos efectos son mediados por la producción de factores inmunomoduladores, como óxido nítrico, indolamina 2,3-dioxigenasa, prostaglandina E2, e IL-10 (Ma *et al.*, 2014).

La apoptosis de los linfocitos T resultante de la inhibición por MSCs ha demostrado ser capaz de inducir a los macrófagos a producir el factor de crecimiento transformante (TGF), el cual también promueve la producción de linfocitos T reguladores. Adicionalmente, el recambio de los macrófagos de fenotipo tipo 1 proinflamatorio a tipo 2 antiinflamatorio se cree es la verdadera razón de los efectos terapéuticos de MSCs. Las MSCs pueden regular la activación de los linfocitos citotóxicos naturales por medio de IL-2 o IL-15 (Fig. 8) (Wang *et al.*, 2014). Las MSCs también tienen efectos antibacterianos que contribuyen a disminuir la reacción inflamatoria,

directamente con la secreción de IL-37 o indirectamente mejorando la fagocitosis de los macrófagos (Chen *et al.*, 2015).

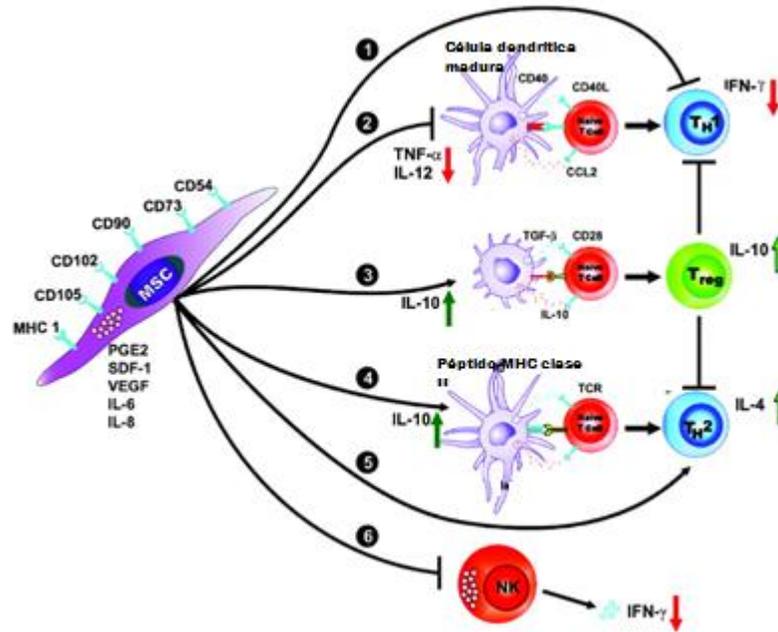


Figura 9. Esquema de los mecanismos de inmunoregulación de las MSCs sobre diferentes células del sistema inmunológico; Aggarwal and Pittenger 2005.

El primer uso exitoso de la terapia con MSCs se realizó con células provenientes de médula ósea en pacientes con enfermedad injerto contra huésped resistencia grado IV a ciclosporina y esteroides (Wang *et al.*, 2014). Además, las MSCs del tejido adiposo o de la médula ósea han logrado reducir la severidad de la Esclerosis Múltiple en modelos murinos (D'souza *et al.*, 2015).

Debido a sus propiedades inmunomoduladoras, las MSCs tienen potencial clínico como soporte en la hematopoyesis al promover la implantación de células madre hematopoyéticas (Yi *et al.*, 2016).; también en el tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico, Escleroderma, y Artritis Reumatoide (Liu *et al.*, 2016). Las MSCs autólogas ayudaron a mejorar las lesiones de la enfermedad de Crohn (Pileggi, 2012).

Se ha visto que la administración de MSC en pacientes pediátricos o adultos es segura, sin efectos adversos o tóxicos durante el tratamiento (D'souza *et al.*, 2015). Además, hay una recuperación más rápida de neutrófilos y plaquetas (Castro-Manreza y Montesinos-Montesinos, 2015).

Estudios clínicos apoyan la evidencia de que la terapia con MSCs puede inducir tolerancia a largo plazo en el alotrasplante altamente inmunogénico *in vivo*, mejorar la supervivencia y función del tejido y reducir las dosis de inmunosupresores necesarios (Heyes *et al.*, 2016).

Aparte de la inmunomodulación, las MSC pueden estimular la neurogénesis por medio de la secreción del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Un estudio por Ukai *et al.* en ratas demostró que la infusión intravenosa de MSCs resultaba en la reducción del tamaño del infarto, aumento del flujo sanguíneo cerebral, inducción de angiogénesis, acumulación de MSCs en el tejido isquémico y mejora del comportamiento (Ukai *et al.*, 2007).

Estudios por D'souza *et al.* mostraron que las MSCs obtenidas de médula ósea de ratones fueron capaces de mejorar la función cardíaca, disminuyendo el área infartada y promoviendo la remodelación del tejido cardíaco. Los mecanismos planteados que median esos efectos son la neovascularización, citoprotección y regeneración cardíaca endógena.

Otros estudios realizados por D'souza *et al.* en fibrosis pulmonar demostraron que la administración de MSCs atenuaba el daño pulmonar y la fibrosis. Los mecanismos que explican la reducción de la fibrosis son la regulación de respuestas proinflamatorias por las MSCs, como TNF- α y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-2, mientras incrementan la interleucina antiinflamatoria (IL)-10 (D'souza *et al.*, 2015).

Las MSCs derivadas de la médula ósea o del cordón umbilical fueron introducidas en estudios de cirrosis y falla hepática en estadios avanzados, resultando en una mejoría de la función hepática y reducción de la ascitis. Los mecanismos propuestos para explicar el efecto terapéutico son los siguientes: diferenciación en hepatocitos, secreción de moléculas tróficas y supresión de la inflamación (D'souza *et al.*, 2015).

Aunque el efecto trófico de las MSC en los islotes pancreáticos no está completamente definido, muchos factores secretados por estas células como IL-6, VEGF-A, HGF, y TGF- β parecen promover la viabilidad y función de las células de los islotes, por medio de la inhibición de la apoptosis, la inducción de la proliferación de las células β y el incremento de la producción de insulina en respuesta a hiperglucemia (D'souza *et al.*, 2015).

Las MSCs han sido investigadas desde hace tiempo para la reparación de tejidos óseo, solas o en combinación con factores osteoinductivos como la BMP-2. La BMP-2 liberada por las MSCs incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina, la mineralización y la proliferación celular, induce la formación de hueso, sana defectos en el tamaño del mismo y reparan fracturas *in vivo*. El tratamiento con MSCs también inhibe la osteoclastogénesis, posiblemente por medio de la elevación de la expresión de osteoprotegerina (OPG) e IL-10 (Hynes *et al.*, 2016).

Similarmente, la destrucción del tejido causada por inflamación persistente, como artritis reumatoide, es un posible blanco clínico para la reparación de cartílago utilizando MSCs de médula ósea. Estudios, en su mayoría realizados en modelos animales, han lanzado información interesante del potencial de las MSCs para suprimir inflamación local y el daño tisular. Otros estudios atribuyen la reducción significativa de la artritis a la habilidad de las MSCs para la regulación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IFN- γ , y el concomitante aumento de IL-10 (D'souza *et al.*, 2015; Hynes *et al.*, 2016).

JUSTIFICACIÓN

Las células madre mesenquimales pueden implantarse en pacientes y servir de apoyo en el desarrollo de terapias clínicas (D'souza *et al.*, 2015). La médula ósea es la fuente ideal de obtención de células madre mesenquimales por sus propiedades autoregenerativas e inmunomoduladoras, que no están presentes en todas las fuentes (Chen *et al.*, 2015). No obstante, el aspirado de médula ósea como fuente de aislamiento de MSCs es altamente invasivo y doloroso para el donador, por lo tanto, se han buscado nuevas alternativas que permitan la obtención de las células y proporcionen los mismos resultados (Rodríguez-Pardo *et al.*, 2010; Heyes *et al.*, 2016). Así mismo, células con un potencial similar pero obtenidas de sangre periférica, son una fuente alternativa viable debido a su elevada capacidad de recuperación, autorenovación, diferenciación e inmunomodulación similar a la presente en médula ósea (Ukai *et al.*, 2007).

En el mundo los estudios de obtención de MSCs a partir de sangre periférica son escasos, y en México éste es el primero de su tipo en presentarse.

HIPÓTESIS

Es posible obtener células madre mesenquimales a partir de aféresis de sangre periférica de donante, las cuales conservan características morfológicas e inmunofenotípicas similares a las de médula ósea para ser utilizadas en terapia celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Material de Partida

- Muestra de aféresis de sangre periférica. La muestra es una alícuota sobrante y representativa, donada por individuos aparentemente sanos y que cumplieron con los criterios de aceptación establecidos en la Norma oficial mexicana 253-SSA1-2012, (antes 003-SSA2-1993) para la obtención de sangre y componentes sanguíneos con fines terapéuticos, diagnóstica, preventiva o en investigación; esta última, es la finalidad del presente trabajo.
- Plasma autólogo del donante y/o lisado plaquetario.

Reactivos:

- Medio de cultivo para leucocitos X-VIVO™ 10.
- Tripsina TrypLE™ Express gibco®.
- Lymphoprep™.
- Buffer Fosfato Salino de Dulbecco (DPBS) Lonza™.
- Heparina sódica Pisa®

Equipo de laboratorio:

- Incubadora de células humidificada a 37°C, conectada a tanque de CO₂
- Pipeteador.
- Campana de flujo laminar de clase II tipo A/B3.
- Pipetas graduadas estériles. Volúmenes de 25 y 10mL.
- Cajas Petri 35 x 10mm y frascos de cultivo de 25 cm².
- Tubos de centrifuga con tapa rosca, 15mL.
- Jeringas. Volúmenes 3mL, 5mL, 10mL.
- Micropipeta.

Metodología

Obtención de Células Mononucleares

El método estándar de purificación de células mononucleares a partir de sangre total es por medio de centrifugación por gradiente de densidad (Pierini *et al.*, 2012). Por medio de esta técnica se separan las células mononucleares para posteriormente proceder a su cultivo.

Este método es ideal para separar células cuyas densidades difieren en más de 0.02 g/mL. Para ello se aplican campos gravitatorios de baja intensidad, y la separación se consigue haciendo sedimentar las células en un gradiente cuya densidad aumenta con la profundidad del tubo, depositándose así en donde su densidad iguale a la del medio (EHU, 2016). En la investigación se utilizó Lymphoprep™, un polisacárido altamente ramificado soluble en soluciones acuosas.

Primero se diluyó la muestra con Buffer Fosfato Salino (PBS) hasta alcanzar un volumen de 10mL. Seguido se centrifugó sobre Lymphoprep™ por 20 minutos a 1,270 rpm. Se retiró el plasma y se aisló la capa de células mononucleares, la cual se lavó dos veces con PBS, centrifugándose durante tres minutos a 2000 rpm. Finalmente, el botón celular se resuspendió en 1mL de medio de cultivo para leucocitos (Fig.10).

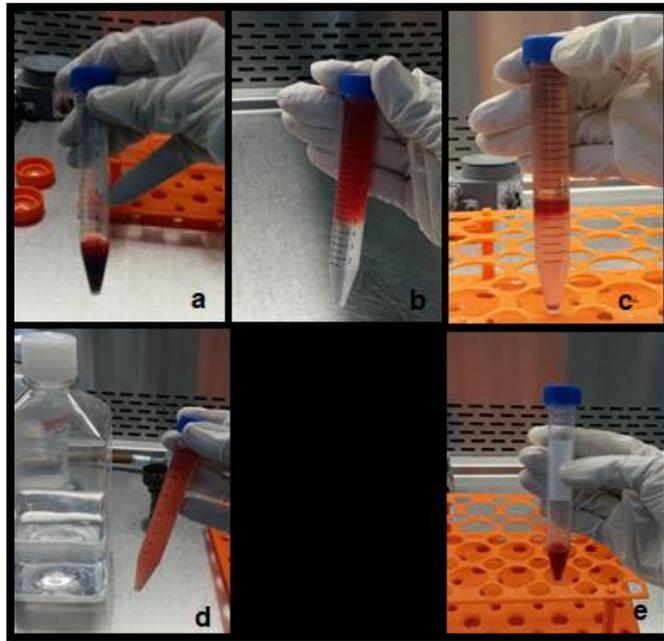


Figura 10. Obtención de células mononucleares: a) Muestra de sangre periférica; b) Muestra diluída sobre Lymphoprep™; c) Separación de plasma, células mononucleares y eritrocitos; d) Lavado con PBS; e) Células mononucleares resuspendidas en medio de cultivo.

Cultivo y Aislamiento de MSCs

Una vez obtenida la capa de células mononucleares, se llevó a cabo el cultivo celular en un medio para crecimiento de leucocitos (X-VIVO™ 10) que ya incluía antibiótico, sembrándose una alícuota de 2,000 células/ μ L. El cultivo se llevó a cabo en placas de 35 x 10mm (Fig.11) o en frascos de cultivo de 25cm² (Fig.12). El uso de uno u otro era según su disponibilidad en el laboratorio.

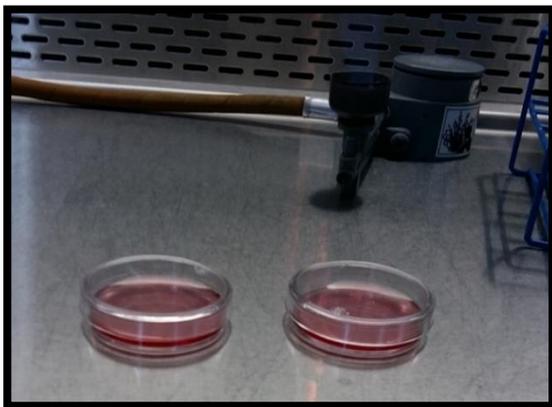


Figura 11. Cultivo de células mononucleares en placa de 35 x 10mm.



Figura 12. Cultivo de células mononucleares en frasco de 25cm².

Se utilizaron tres variantes de medio de cultivo, pero ambos tenían de base el medio X-VIVO™ 10. El primero fue suplementado con 10% de plasma autólogo y anticoagulante; el segundo contenía 10% de lisado plaquetario del donante junto con anticoagulante; el tercero no incluía plasma autólogo y/o lisado plaquetario ni anticoagulante. Los tres se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Se realizó cambio del mismo cada tercer o cuarto día, así como observación al microscopio para la determinación de la confluencia de las células.

Alcanzada la confluencia, aproximadamente 80%, se retiró todo el medio de cultivo de la placa y/o del frasco, se lavó con PBS estéril y se incubó con tripsina TrypLE™ Express gibco® 0.05% 1X durante 8 minutos a 37°C. Posteriormente, se neutralizó la acción de la tripsina añadiendo la misma cantidad de medio de cultivo. Para aumentar el número de células, éstas se sembraron de nuevo en frascos de cultivo. Tras el pase 1 las células aisladas fueron caracterizadas por citometría de flujo. La cantidad de células obtenidas fue subóptima para realizar un procedimiento médico; el resto de las mismas fue criopreservado para futuras investigaciones.

Inmunotipificación

La caracterización inmunofenotípica se realizó en las MSCs empleando el siguiente panel de anticuerpos monoclonales: CD44, CD105, CD106, CD45, CD73, CD90, y CD34, marcados con el fluorocromo correspondiente, según los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular. En todos los casos se utilizaron como control, células de la misma muestra sin marcar con anticuerpos. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Enseguida, las células se resuspendieron en buffer y fueron analizadas en el citómetro de flujo CyAn ADP, marca Dako Cytomation. Los resultados fueron recolectados y cuantificados utilizando el software adjunto al citómetro (Summit™).

RESULTADOS

Obtención del Cultivo Celular

Se llevaron a cabo diversos cultivos celulares utilizando las variantes de medio antes mencionadas. Para las muestras 1 y 2 se empleó medio de cultivo para leucocitos suplementado con 10% de plasma autólogo. Para las muestras 3 y 5 se utilizó medio de cultivo sin suplementos. En el caso de la muestra 4 se empleó una combinación: se utilizó medio suplementado con 10% de plasma autólogo la primera semana, hasta la aparición de las primeras formas fibroblastoides, y después de ello se utilizó medio de cultivo sin suplementos como mantenimiento. En la muestra 6 se empleó medio suplementado con 10% de lisado plaquetario. Las características se

describen en la tabla 1. Una vez alcanzada la confluencia aproximada de 80%, se realizaron los pases de las placas de cultivo.

Tabla 1. Características del cultivo celular primario.

Muestra	Semana 1	Semana 2	Observación
1	Inicio de desarrollo	Confluencia 60%	Células focalizadas
2	Inicio de desarrollo	Confluencia 60%	Células focalizadas
3	Inicio de desarrollo	Confluencia 80%	Células distribuidas
4	Inicio de desarrollo	Confluencia 80%	Células distribuidas
5	Inicio de desarrollo	Confluencia 80%	Células distribuidas
6	Inicio de desarrollo	Confluencia 60%	Células focalizadas

El tiempo promedio de desarrollo de las primeras células fibroblastoides fue de 7 días en todos los casos.

En cuanto a la proporción de células obtenidas en el cultivo se observó que en los medios sin aditivos y combinado las células fueron más abundantes que en aquellos en donde se empleó medio suplementado (Fig. 13).

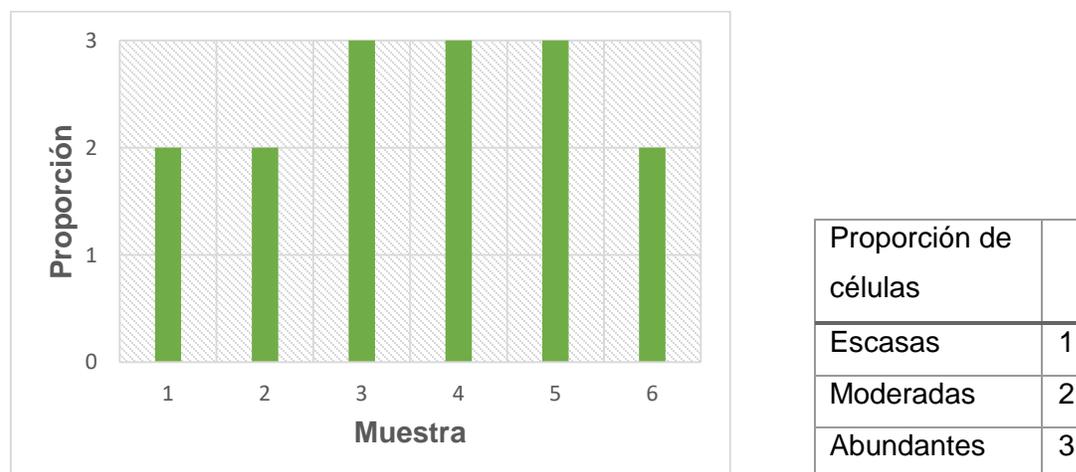


Figura 13. Proporción de células obtenidas en el cultivo.

La fig. 14 incluye las fotografías que ilustran las etapas del cultivo mencionadas en la tabla 1, así como la proporción de células en las que se basó la figura 13.

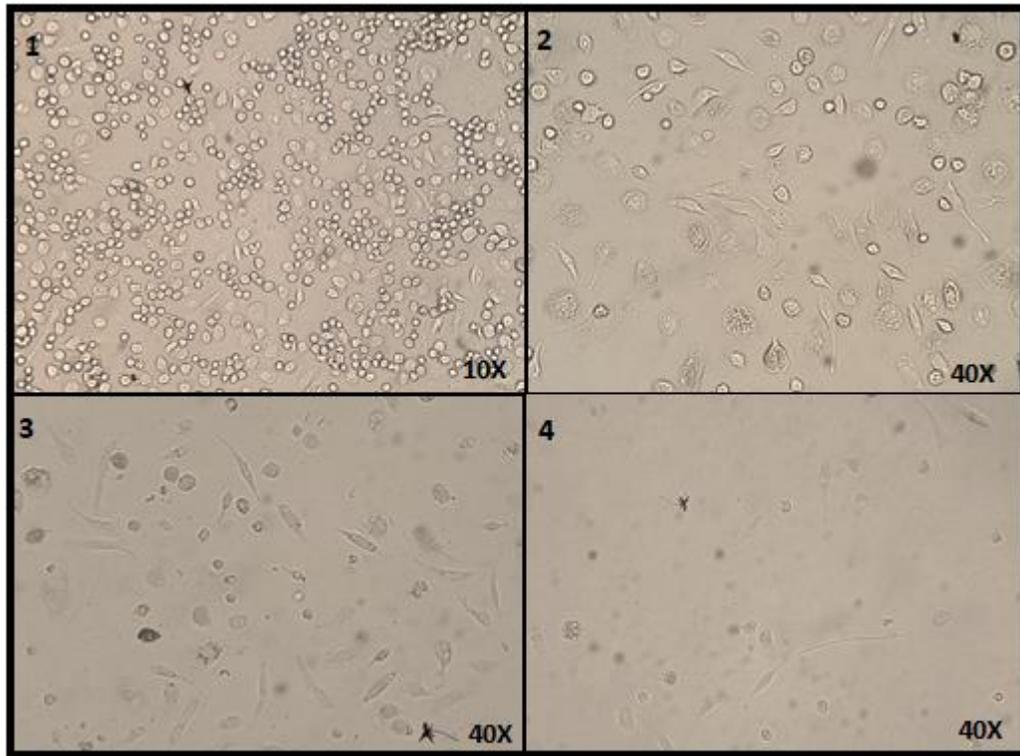


Figura 14. Fotografías de las etapas del cultivo celular: 1. Cultivo de células mononucleares, aparición de primeras formas fibroblastoides; 2. Abundantes células fibroblastoides; 3. Moderadas células fibroblastoides; 4. Escasas células fibroblastoides (Microscopio invertido).

Las fotografías 1 y 2 de la fig. 16 muestran cultivos de células fibroblastoides al 80% de confluencia.

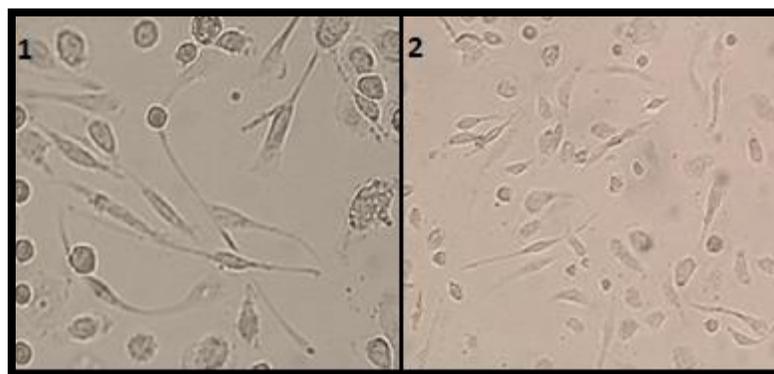


Figura 15. Cultivos de células fibroblastoides al 80% de confluencia (microscopio invertido-100X).

Expansión y Aislamiento de Células Madre Mesenquimales

Por regla general los pases deben realizarse una vez alcanzada la confluencia de 80%. Sin embargo, algunos cultivos solamente alcanzaron una confluencia del 60% aproximadamente, por lo que así se continuó con la expansión.

Las muestras 1 y 2 mostraron buena confluencia para la separación y la realización del inmunofenotipo, pero al momento de realizar la expansión las células no desarrollaron después del primer pase. La muestra 6 se contaminó al llegar a la confluencia de 60%, por lo que no continuó su estudio.

Se prosiguió con la expansión de los cultivos de las muestras 3, 4 y 5, aunque sólo se logró llegar hasta el pase 2. En los 3 casos al continuar con el cultivo no había crecimiento celular, aun cuando la confluencia era del 80%, e incluso la población celular disminuyó a partir de la semana 3. Las características del cultivo del pase 1 se incluyen en la tabla 2. El tiempo de cultivo necesario para alcanzar la confluencia del 80% fue de 14 días en los 3 casos.

Tabla 2. Características del cultivo de pase 1.

Muestra	Semana 1	Semana 2
1	Moderadas células	Sin crecimiento
2	Moderadas células	Sin crecimiento
3	Moderadas células	Confluencia 80%
4	Moderadas células	Confluencia 80%
5	Moderadas células	Confluencia 80%

Inmunotipificación

Se realizó la inmunotipificación de los cultivos a partir del pase 1 con la finalidad de comprobar la presencia de marcadores de MSCs en las células aisladas a partir de aféresis de sangre periférica. En todos los casos, las células adherentes a la superficie plástica mostraron un inmunofenotipo CD105+ CD90+ CD44+ CD106+ CD34- CD73+ CD45-, el cual es compatible con las MSCs de médula ósea. El método utilizado fue la citometría de flujo con 6 parámetros de fluorescencia para los marcadores: CD44, CD105, CD106, CD45, CD73, CD90, y CD34. En las figuras 16,17 y 18 se incluyen algunos de los histogramas de los inmunofenotipos realizados; el cuadrante superior derecho muestra las células con fenotipo positivo, mientras que el cuadrante inferior derecho ilustra las células cuyo fenotipo fue negativo.

Del total de células analizadas por el citómetro de flujo, un 93% correspondían a células madre mesenquimales viables. Esto fue determinado por medio del conteo simultáneo de perlas.

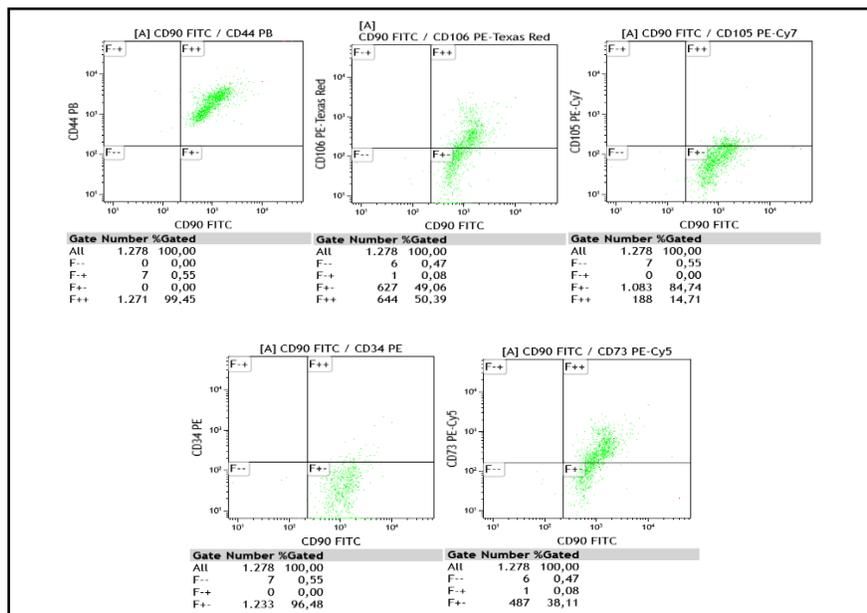


Figura 16. Inmunofenotipo de células adherentes de muestra 1.

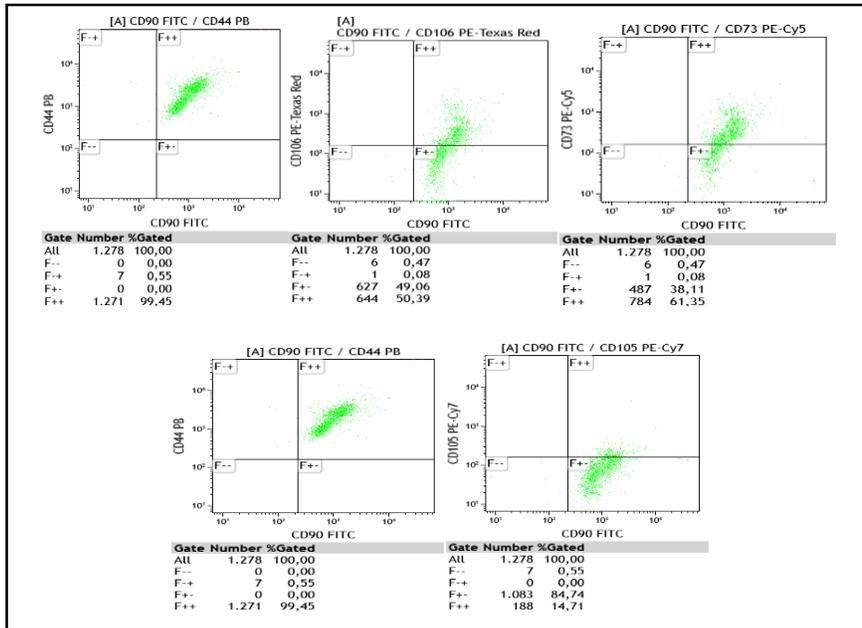


Figura 17. Inmunofenotipo células adherentes de muestra 2.

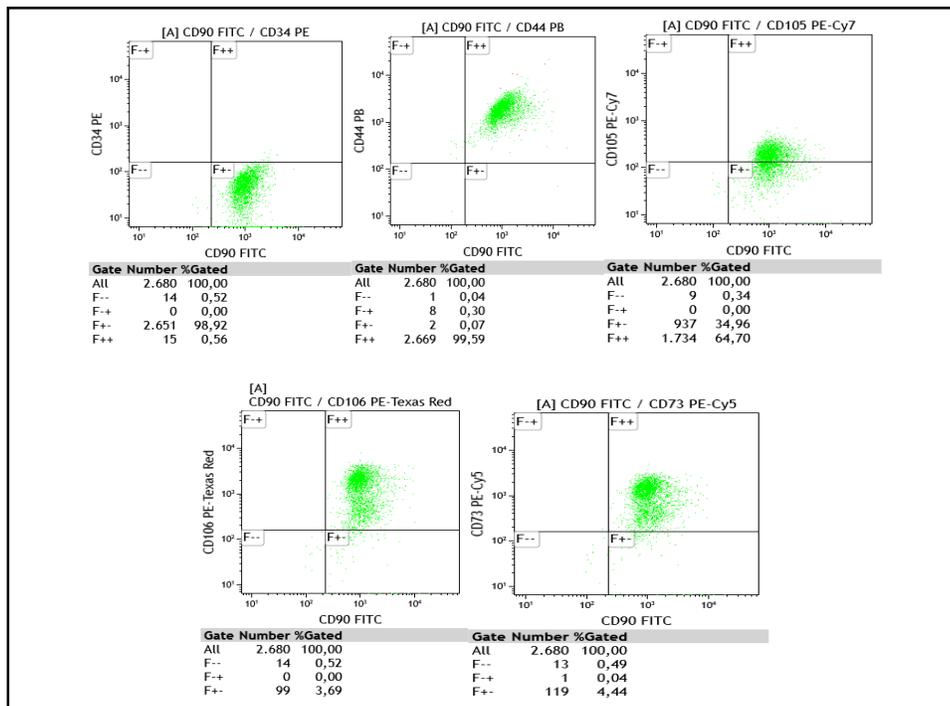


Figura 18. Inmunofenotipo de células adherentes de muestra 3.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la obtención eficiente de Células Madre Mesenquimales (MSCs) a partir de aféresis de sangre periférica es fundamental la búsqueda de las mejores condiciones de cultivo, incluyendo la composición del medio a utilizar. Aunque, hay que dejar claro que los factores como el estado de salud del donante, la edad del donador, fuentes de obtención y el microambiente de la fuente pueden influir en las características funcionales de las MSC, como el crecimiento, potencial de diferenciación etc. (Jaiswal *et al.*, 1997).

En la investigación se observó que, al añadir menor cantidad de suplementos al cultivo las células crecían mejor con una mayor distribución en la caja de cultivo, a diferencia de aquellas que contaban con plasma autólogo y/o lisado plaquetario. Esto contrasta con otras investigaciones en las que se añadía suero fetal bovino o lisado plaquetario para suplementar el medio (Chong *et al.*, 2012; Heyes *et al.*, 2016). Blázquez-Prunera *et al.* (2017) mencionan que, para utilizar suplementos para el cultivo celular derivados plasma autólogo, es recomendable realizar una mezcla de 1000 donadores sanos, reduciendo la variabilidad y obteniendo mejores resultados. Una de las probables razones para las diferencias en la proliferación de MSCs cultivadas con plasma autólogo puede ser atribuida a la variación de las fuentes de obtención y los métodos de preparación.

El tiempo promedio de desarrollo de las primeras formas fibroblastoides no varió entre cultivos, ya que en todos los casos fue de 7 días independientemente del tipo de medio empleado, lo que concuerda con las investigaciones de Trivanovic *et al.* (2013) y Zvaifler *et al.* (2000).

El tiempo necesario para alcanzar la confluencia del 80% fue de 14 días, sin embargo, los cultivos con plasma autólogo y lisado plaquetario no desarrollaron más allá del 60%. Además, las células estaban concentradas en focos o conglomerados muy separados. Este mismo resultado fue observado por John Wiley *et al.* al utilizar suero humano en MSCs obtenidas de cordón umbilical, pero, no se explicaron que causaba el aumento de factores de adherencia entre células.

Una desventaja de la obtención de las MSCs por gradiente de densidad es que en las primeras resiembras se encuentran tanto células endoteliales como macrófagos acompañando a los cultivos, por lo que éstos son muy heterogéneos (Flores–Figuerola *et al.*, 2006). El objetivo de realizar pases es el de obtener una población uniforme de células madre mesenquimales, al ir removiendo las células mononucleares acompañantes. En nuestro caso no se logró obtener un cultivo puro de MSCs y solamente se llegó hasta el pase 2 con la confluencia apropiada, dado que el medio utilizado era general para el crecimiento de leucocitos y no fue el ideal para potenciar la proliferación de las células; al realizar el cultivo del pase 2 no se obtuvo el crecimiento esperado e inclusive disminuyó la población celular (muestras 3, 4 y 5).

Según Chong *et al.* (2012) la cantidad de MSCs recuperada de sangre periférica es limitada en comparación de la obtenida de médula ósea y en nuestro caso ocurrió lo mismo. Al final del pase 2 se obtuvo una cantidad subóptima de células insuficiente para desarrollar una terapia celular. Se recomienda que para empleo en terapia celular se tomen cantidades mayores de muestra, para una mejor recuperación de MSCs, así como contar con el medio de cultivo adecuado que favorezca la proliferación de las células.

En cuanto a la caracterización por citometría de flujo, se llevó a cabo con el fin de identificar los marcadores generales que se utilizan para identificar a las células madre mesenquimales. En todos los casos analizados las células adherentes mostraron un inmunofenotipo positivo para las MSCs, lo que indica que las células de sangre periférica cultivadas sí eran las esperadas. No obstante, es necesario llevar a cabo los estudios de diferenciación en osteocitos, adipocitos y condrocitos para confirmar los resultados. El conteo por medio de perlas en el citómetro de flujo indicó que del total de células analizadas un 93% eran MSCs viables, demostrando que la sangre periférica sí es una fuente adecuada para la obtención de este tipo de células.

CONCLUSIONES

1. Fue posible la obtención de células madre mesenquimales a partir de sangre periférica proveniente de aféresis.
2. El medio de cultivo X-VIVO™ 10 sin plasma autólogo y/o lisado plaquetario mostró mejores resultados en el desarrollo de células madre mesenquimales, a pesar de que no fue el adecuado para realizar la expansión después del segundo pase.
3. El inmunofenotipo característico de las células madre mesenquimales se demostró en las células cultivadas de sangre periférica.
4. Se obtuvo un 93% de células madre mesenquimales a partir de sangre periférica en los cultivos realizados.

RECOMENDACIONES

Con el fin de ayudar en el desarrollo de proyectos futuros se plantean las siguientes recomendaciones:

1. Probar otros tipos de medios de cultivo específicos que favorezcan la proliferación de las células madre mesenquimales.
2. Buscar nuevas formas de suplementar el cultivo, ya sean productos de origen humano o sintético, con el fin de incrementar el número de células madre mesenquimales.
3. Realizar la diferenciación de al menos dos líneas celulares para corroborar la naturaleza de las células obtenidas de sangre periférica.

GLOSARIO

- ap2: Proteína activadora 2
- BMPs: Proteínas morfogénicas óseas
- BSP: Proteína siálica del hueso
- C/EBP: Proteínas de unión al potenciador-CCAAT
- CM: Células madre
- CMAs: Células madre adultas
- CMEs: Células madre embrionarias
- CMHs: Células madre hematopoyéticas
- COMP: Proteína oligomérica de la matriz del cartílago
- EGF: Factor de crecimiento epidermal
- FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos
- HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos
- IFN: Interferón
- IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina
- IL-6: Interleucina-6
- ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular
- MSCs: Células madre mesenquimales

OSE2: Elemento osteocalcino-específico 2
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PPAR- γ : Receptor Nuclear de Proliferadores de Peroxisomas- γ
Runx2: Factor de transcripción 2 relativo a runt
SOX9: Región determinante de sexo γ -caja 9
TGF: Factor de crecimiento transformante
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
TNF: Factor de necrosis tumoral
VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, S. & M. F. Pittenger (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105, 1815.
- Arévalo Romero, J. A., D. M. Páez Guerrero & V. M. Rodríguez Pardo. 2007. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. . 101-212. NOVA-PUBLICACIÓN CIENTÍFICA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS.
- Barrera Ramírez, L. M., M. E. Drago Serrano, J. Pérez Ramos, T. D. R. Sainz Espuñes, A. C. Zamora, F. Gómez Arroyo & F. Mendoza Pérez (2004) CITOMETRÍA DE FLUJO: VÍNCULO ENTRE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y LA APLICACIÓN CLÍNICA. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17, 42-55.
- Bateman, M. E., A. L. Strong, J. A. McLachlan, M. E. Burow & B. A. Bunnell (2016) The Effects of Endocrine Disruptors on Adipogenesis and Osteogenesis in Mesenchymal Stem Cells: A Review. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 171.
- Bentivegna, A., G. Roversi, G. Riva, L. Paoletta, S. Redaelli, M. Miloso, G. Tredici & L. Dalprà (2016) The Effect of Culture on Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Focus on DNA Methylation Profiles. *Stem Cells Int*, 2016.
- Bernard, A. 2010. Biotecnología Aplicada a la Salud Humana. In *Biotecnología de las células madre*. Madrid, España: Edikamed.

- Blázquez-Prunera, A., J. M. Díez, R. Gajardo & S. Grancha (2017). Human mesenchymal stem cells maintain their phenotype, multipotentiality, and genetic stability when cultured using a defined xeno-free human plasma fraction. In *Stem Cell Res Ther*. London.
- Castro Manreza, M. E. & J. J. Montesinos Montesinos. 2015. Células troncales mesenquimales: biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas. México: Rev Med UV.
- Chen, D., H. Hao, X. Fu & W. Han. 2015. Insight into Reepithelialization: How Do Mesenchymal Stem Cells Perform? . China: Hindawi Publishing Corporation.
- Chi-Chien, N., L. Song-Shu, Y. Li-Jen, C. Lih-Huei, P. Tai-Long, Y. Chuen-Yung, L. Po-Liang & C. Wen-Jer (2014) Identification of mesenchymal stem cells and osteogenic factors in bone marrow aspirate and peripheral blood for spinal fusion by flow cytometry and proteomic analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery & Research*, 9, 1-22.
- Chong, P.-P., L. Selvaratnam, A. A. Abbas & T. Kamarul (2012) Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 30, 634-642.
- CNB. 2001. Citometría de flujo. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Cohnheim J. Über Entzündung und Eiterung. *J Arch Path Anat Physiol Klin Med*. 1867;40:1–79.
- Díaz Martínez, V. & M. C. Martos. 2011. Citometría de flujo: midiendo células. Biotech Spain.
- D'souza, N., F. Rossignoli, G. Golinelli, G. Grisendi, C. Spano, O. Candini, S. Osturu, F. Catani, P. Paolucci, E. M. Horwitz & M. Dominici. 2015. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies Italia: BMC Medicine.
- EHU. 2016. Separación de células. España: Universidad del País Vasco.
- Flores–Figueroa, E., J. J. Montesinos & H. Mayani. 2006. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. 498-511. México: Revista de Investigación Clínica.
- Friedenstein A, Gorskaja J, Kulagina N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4:267–74.
- Fuentes Lacouture, M. F. 2008. Optimización del sistema de cultivo y caracterización de células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea humana. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Gimble, J. M., A. J. Katz & B. A. Bunnell (2007) Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circulation Research*, 100, 1249.

- Heyes, R., A. Iarocci, Y. Tchoukalova & D. G. Lott (2016) Immunomodulatory Role of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Vascularized Composite Allotransplantation. *Journal of Transplantation*, 2016, 6951693.
- Hofer, H. R. & R. S. Tuan (2016) Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Research & Therapy*, 7, 1-14.
- Hynes, K., R. Bright, S. Proudman, D. Haynes, S. Gronthos & M. Bartold (2016) Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cell in experimental arthritis in rat and mouse models: A systematic review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 46, 1-19.
- Jaime Pérez, J. C., I. Garza Veloz & R. Ortiz López. 2007. Células madre. 130-40 Monterrey, México: Medicina Universitaria.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI et al (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 64:295-312.
- John Wiley & Sons, Perinatal Stem Cells, *Wiley-Blackwell*, 2010. 267 pág.
- Kadir, R. A., S. H. Z. Ariffin, R. M. A. Wahab & S. Senafi (2012) Molecular characterisation of human peripheral blood stem cells. *South African Journal of Science*, 108, 1-7.
- Kassis, I., L. Zangi, R. Rivkin, L. Levdansky, S. Samuel, G. Marx & R. Gorodetsky. 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads 967–976. Israel: *Bone Marrow Transplantation*
- Leticia, M. 2006. Aféresis terapéutica. . 77-80. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*.
- Li, G., X. a. Zhang, H. Wang, X. Wang, C. I. Meng, C. y. Chan, D. T. W. Yew, K. S. Tsang, K. Li, S. n. Tsai, S. m. Ngai, Z. C. Han, M. C. m. Lin, M. I. He & H. f. Kung (2009) Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: Implication in the migration. *PROTEOMICS*, 9, 20-30.
- Liu, R., W. Chang, H. Wei & K. Zhang. 2016. Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Skin. 12. *Stem Cells International*.
- López Lucas, M. D. 2015. “Células Madre Mesenquimales de Médula Ósea Fucosiladas. ¿Es Posible una Producción a Escala Clínica?”. 210. España: Universidad de Murcia.
- Lordméndez-Jácome, D. 2005. Donación de componentes sanguíneos por aféresis. México: Revista Médica del IMSS.
- Lyahyai, J., D. R. Mediano, B. Ranera, A. Sanz, A. R. Remacha, R. Bolea, P. Zaragoza, C. Rodellar & I. Martín-Burriel (2012) Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Veterinary Research*, 8, 169-178.

- Ma, S., N. Xie, W. Li, B. Yuan, Y. Shi & Y. Wang (2014) Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21, 216-225.
- Mata-Miranda, M., G. J. Vázquez-Zapién & V. Sánchez-Monroy. 2013. Generalidades y aplicaciones de las células madre. 194-199. México: Perinatología y reproducción humana.
- Maximow A. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiol Rev.* 1924;4:533–63.
- Muntión Olave, M. S. 2010. Estudio de células stem mesenquimales en pacientes con osteoporosis. 131. Salamanca, España: Universidad de Salamanca.
- Owen M, Friedenstein A. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988;136:42–60.
- Pierini, M., B. Dozza, E. Lucarelli, P. L. Tazzari, F. Ricci, D. Remondini, C. di Bella, S. Giannini & D. Donati (2012) Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Cytotherapy (Taylor & Francis Ltd)*, 14, 686-693.
- Pileggi, A. 2012. Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Diabetes. DIABETES.
- Pérez de Prada, M. T. 2007. Las células madre o progenitoras. Madrid: Hospital Clínico San Carlos.
- Ranera Beltrán, B. 2012. Células madre mesenquimales equinas: Obtención y análisis de sus propiedades in vitro. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.
- Ratajczak, M. Z., K. Bujko & W. Wojakowski. 2016. Stem cells and clinical practice: new advances and challenges at the time of emerging problems with induced pluripotent stem cell therapies. Estados Unidos: Pol Arch Med Wewn.
- Rodríguez-Pardo, V. M., M. F. Fuentes-Lacouture, J. A. Aristizabal-Castellanos & J. P. Vernot Hernandez (2010) Aislamiento y caracterización de células "stem" mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Universitas Scientiarum*, 15, 224-239.
- Salerno, S., A. Messina, F. Giordano, A. Bader, E. Drioli & L. De Bartolo (2017) Dermal-epidermal membrane systems by using human keratinocytes and mesenchymal stem cells isolated from dermis. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 71, 943-953.
- Salgado Lynn, M. 2002. Citometría de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
- Shi, Y., J. Su, A. I. Roberts, P. Shou, A. B. Rabson & G. Ren. 2012. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses Shanghai, China: Trends in Immunology.

- Swamynathan P., Venugopal P., Kannan S., Thej C., Kolkundar U., Bhagwat S., Ta M., Majumdar A. S., Balasubramanian S. (2014) Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells? A comparative study. *Stem Cell Research & Therapy*; 5:88.
- Trivanovic, D., J. Kocic, S. Mojsilovic, A. Krstic, V. Ilic, I. O. Djordjevic, J. F. Santibanez, G. Jovic, M. Terzic & D. Bugarski (2013) Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp Arh Celok Lek*, 141, 178-86.
- Ukai, R. Y. O., O. Honmou, K. Harada, K. Houkin, H. Hamada & J. D. Kocsis (2007) Mesenchymal Stem Cells Derived from Peripheral Blood Protects against Ischemia. *Journal of neurotrauma*, 24, 508-520.
- Wang, Y., X. Chen, W. Cao & Y. Shi (2014) Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*, 15, 1009-1016.
- Yi, H. G., S.-A. Yahng, I. Kim, J.-H. Lee, C.-K. Min, J. H. Kim, C. S. Kim & S. U. Song (2016) Allogeneic clonal mesenchymal stem cell therapy for refractory graft-versus-host disease to standard treatment: a phase I study. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 20, 63-67.
- Zhang, W., F. Zhang, H. Shi, R. Tan, S. Han, G. Ye, S. Pan, F. Sun & X. Liu (2014) Comparisons of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Isolation and Culture Methods In Vitro. *PLoS ONE*, 9, 1-8.
- Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C. J. Edwards, J. Moss, J. A. Burger & R. N. Maini. 2000. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. 477–488 Reino Unido: Arthritis Research.

ANEXO 1



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

DATOS GENERALES	
Título:	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES A PARTIR DE AFÉRESIS DE SANGRE PERIFÉRICA POR TÉCNICAS CONVENCIONALES Y MICROESPECTROSCOPIA RAMAN
Clave del proyecto:	USO313003343
Fecha de solicitud de registro:	10 de Febrero de 2017
Naturaleza del proyecto:	DISCIPLINARIA
Ámbito de Impacto:	INTERNACIONAL
Tipo de cooperación con otras instituciones:	INTERNACIONAL
Tipo de financiamiento:	INTERNO
Tipo de Investigación:	BÁSICA ORIENTADA
Área de Conocimiento:	CIENCIAS DE LA SALUD
Disciplina:	INVESTIGACIÓN EN SALUD
Subdisciplina:	BIOMEDICINA
Sectores beneficiados:	<ul style="list-style-type: none"> • PRODUCTIVO SERVICIOS ◦ SALUD

TIEMPOS Y FINANCIAMIENTO	
Periodo de tiempo convenido:	Fecha Inicial: 03/02/2017. Fecha final: 03/02/2020. Duración: 36 meses.
Presentación de informes técnicos:	<ol style="list-style-type: none"> 1. 03/02/2018, INFORME PARCIAL 2. 03/02/2019, INFORME PARCIAL 3. 03/08/2020, INFORME FINAL
Tipo de financiamiento:	INTERNO
Monto total aprobado:	\$0
Patrocinadores:	<ul style="list-style-type: none"> • DEPARTAMENTO DE CS. QUIMICO BIOLÓGICAS

PROTOCOLO DEL PROYECTO	
Resumen:	<p>Resumen: Las células estromales mesenquimales (MSCs) o células madre mesenquimales (mesenchymal stem cells MSCs), son una población de células adultas adherentes fibroblastoides, con capacidad de diferenciación en células que tienen origen en el mesodermo, incluyendo osteoblastos, adipocitos y condrocitos; pero también del ectodermo por su conocida plasticidad celular. Además, tienen la característica de no presentar marcadores hematopoyéticos. Las MSCs son células progenitoras pluripotenciales particularmente atractivas en terapia celular génica para regeneración de tejidos y en cáncer, debido a sus propiedades específicas, incluyendo su pluripotencialidad, apoyo en la hematopoyesis, son potencialmente inmunomoduladoras y presentan propiedades autoregenerativas; además pueden ayudar a suprimir la respuesta inmune durante el trasplante de órganos y tejidos. Resulta relevante contar con protocolos de obtención, cultivo y diferenciación validados para que estas células puedan ser potencialmente utilizadas con fines terapéuticos y terapias en base a MSCs mejorando la calidad de vida de la población afectada con enfermedades crónicas degenerativas o lesiones físicas. Estas células son aisladas a partir del estroma de médula ósea; procedimiento invasivo y doloroso, por lo que se han buscado nuevas alternativas que permitan obtener los mismos resultados sin causar daño adicional al paciente; entre ellos, el tejido adiposo, músculo esquelético, sangre del cordón umbilical por citar algunos. En el presente proyecto se emplearán muestras de aféresis de sangre periférica de donantes aparentemente sanos de acuerdo a la Norma oficial mexicana 253-SSA1-2012. Las MSCs se han descrito como una población heterogénea y uno de los principales problemas para su caracterización inmunofenotípica es la falta de un marcador específico. Clínicamente, los criterios mínimos establecidos para la identificación de las MSCs es la presencia del fenotipo CD105+, CD73+, CD90+ y la ausencia de CD34, CD45, CD11b, CD79? o CD19 y HLA-DR y la capacidad de diferenciación in vitro a osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de diferenciación. La citometría de flujo se utiliza convencionalmente para la identificación fenotípica, sin</p>

embargo, la determinación no es rápida, ya que se requieren de varios marcadores simultáneos, lo que no siempre es posible. Por ello, se requiere caracterizar las MSCs y las células derivadas mediante otras metodologías que proporcionen información efectiva para su identificación. En este sentido, la micro-espectroscopia Raman que se ha usado recientemente para estudiar las células en tejido o cultivo para una gran variedad de aplicaciones biológicas y la microscopia de fuerza atómica (AFM) para la caracterización e identificación de propiedades morfológicas y biomecánicas de las MSCs. Estas técnicas podrían ser una mejor alternativa para la caracterización fenotípica de MSCs. La micro-espectroscopia Raman debido a la vibración espectral específica de los diferentes grupos moleculares, revela la huella molecular (molecular fingerprint) de materiales biológicos, además de ser una técnica no invasiva, libre de marcadores, rápida y no destructiva. La composición molecular y los cambios en la estructura celular pueden ser detectados por variaciones en el espectro Raman celular, durante la diferenciación celular o en un proceso patológico. Por lo tanto, cualquier cambio en el espectro suficientemente específico para un estado de diferenciación celular puede ser utilizado como marcador fenotípico. La aplicación biomédica o clínica de la micro-espectroscopia Raman es reciente y novedosa por lo que los datos espectrales deben ser validados con los parámetros convencionales establecidos. El objetivo del presente proyecto es obtener y caracterizar las células estromales mesenquimales a partir de aféresis de sangre periférica siguiendo los criterios estándares de identificación y complementar con la huella bioquímica mediante micro-espectroscopia Raman, para obtener un protocolo validado con potencial uso clínico.

ANEXO 2

Lymphoprep™

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Lymphoprep™ es una solución lista para su uso, estéril y testada frente a endotoxinas para el aislamiento de suspensiones puras de linfocitos. La solución contiene diatrizoato sódico y polisacárido en las concentraciones siguientes:

Diatrizoato sódico	9,1% (p/v)
Polisacárido	5,7% (p/v)

Características físico-químicas:

Densidad:	1.077 ± 0.001 g/ml
Osmolaridad:	290 ± 15 mOsm

FUNDAMENTO DEL PROCESO DE SEPARACIÓN

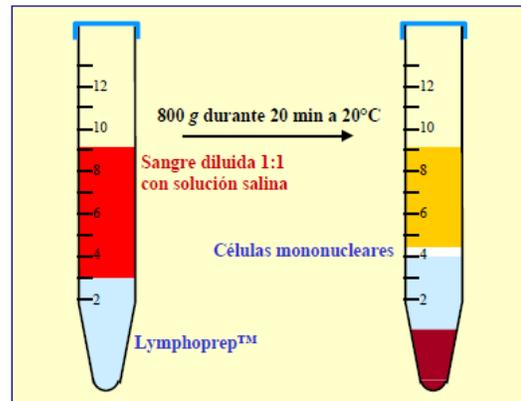
La técnica más común de separación de leucocitos es la de mezclar sangre con un componente el cual agrega los eritrocitos, incrementando de este modo su ratio de sedimentación. La sedimentación de los leucocitos se ve afectada sólo ligeramente y puede ser recogida de la parte superior del tubo cuando los eritrocitos han sedimentado. Usando una mezcla de metrizoato sódico y polisacárido, Bøyum (1968) desarrolló una técnica de centrifugación de un paso para el aislamiento de linfocitos. Thorsby y Bratlie (1970) usaron esta técnica con sólo ligeras modificaciones en la preparación de suspensión pura de linfocitos para tests de citotoxicidad y cultivos de linfocitos. Remarcado también por otros autores, Harris y Ukayiofo (1969), Ting y Morris (1971), éste es un método fidedigno, simple y rápido apropiado para la preparación de las preparaciones de linfocitos en sangre de cadáver y de sangre con anticoagulante conservada a temperatura ambiente hasta un máximo de 6 horas.

ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN

Lymphoprep™ es estable durante 3 años si la solución es mantenida estéril y protegida de la luz. Exposiciones prolongadas a la luz solar directa conduce a la liberación de yodo de la molécula de diatrizoato sódico. Este efecto es insignificante cuando se trabaja con esta solución en el día a día. Lymphoprep™ debe ser conservado a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN (ver imagen)

1. Colectar sangre en untubo con anticoagulante (EDTA, heparina, ACD) o usar sangre desfibrinada.
2. Diluir la sangre añadiendo el mismo volumen de solución NaCl 0,9%.
3. Añadir cuidadosamente una capa de 6 ml de sangre diluida sobre 3 ml de Lymphoprep™ en un tubo de centrifuga de 12–15 mm. Alternativamente, Lymphoprep™ puede depositarse en una capa por debajo de la sangre diluida. Evitar mezclar la sangre con el fluido de separación. Tapar el tubo para prevenir la formación de aerosoles.
4. Centrifugar a 800 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) en un rotor oscilante. Si la sangre es almacenada durante más de 2 horas, incrementar el tiempo de centrifugación a 30 minutos.
5. Después de la centrifugación, las células mononucleares forman una banda distinta en la interfase muestra/medio, tal como se indica en la figura. Las células son recogidas mejor de la interfase usando una pipeta Pasteur evitando recoger la capa superior.
6. Diluir la fracción obtenida con solución NaCl 0,9% o un medio para reducir la densidad de la solución y sedimentar la células por centrifugación durante 10 minutos a 250 x g.



PUREZA Y VIABILIDAD

El método descrito ha sido encontrado para ser rápido, simple y fidedigno y da unos resultados excelentes con muestras de sangre en la gran mayoría de individuos normales y de pacientes. La técnica puede ser también usada en la preparación de suspensiones de linfocitos para tests de cultivo mixto de linfocitos. La contaminación de eritrocitos en las suspensiones de linfocitos es usualmente entre 1 - 5% del número total de células. Algunos granulocitos inmaduros pueden seguir a los linfocitos durante terapias inmunosupresoras intensas. Cuando es usada sangre heparinizada, es esencial eliminar la mayoría de las plaquetas, en base a evitar la inhibición en el test de citotoxicidad. El proceso de lavado descrito es usualmente suficiente.

REFERENCIAS

- Bøyum, A. (1968): Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97.
- Favour, C.B. (1964): Antigen-antibody reactions in tissue culture. Immunological Methods, ed. J.R. Ackroyd, pp. 195-223. Blackwell Scientific Publ., Oxford.
- Harris, R. & Ukayiofo, E.V. (1969): Rapid preparation for lymphocytes for tissue typing. Lancet 327, 7615.
- Ting, A. & Morris, P.J. (1971): A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. Vox Sang. 20, 561.
- Thorsby, E. & Bratlie, A. (1970): A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions. Histocompatibility Testing 1970, ed. P.I. Terasaki, p. 655 Munksgaard, Copenhagen.

INFORMACIÓN CÓDIGOS

Lymphoprep™ Prod. no. 1114544	1 x 250 ml
Lymphoprep™ Prod. no. 1114545	4 x 250 ml
Lymphoprep™ Prod. no. 1114547	6 x 500 ml
Lymphoprep™ Prod. no. 1115757	20 x 250 ml
Lymphoprep™ Prod. no. 1115758	12 x 500 ml

Fabricante:

Alere Technologies AS
P.O. Box 6863 Rodeløkka
N-0504 Oslo, Norway
Phone: +47 24 05 60 00
Fax: +47 24 05 60 10

www.axis-shield-density-gradient-media.com

Empresa certificada ISO 9001 e ISO 13485

ANEXO 3

BioWhittaker® X-VIVO™ Media Systems General Information

Contents:

Section	Description	Page
I	Introduction	1
II	X-VIVO™ 10	1
III	X-VIVO™ 15	1
IV	X-VIVO™ 20	2
V	Additional Applications	2
VI	Selected List of Cell Types Grown with X-VIVO™ Media	2
VII	Storage	2
VIII	Ordering Information	2

I. Introduction

Lonza's R&D efforts and involvement with numerous clinical trials have provided us with the tools and expertise to support developments in adoptive immunotherapy, cancer therapy, genetic therapy and other cellular therapies. Our philosophy for the development of serum-free formulations for use in cellular therapy is to provide a nutritionally complete and balanced environment for the cells. Our X-VIVO™ Media do not contain any exogenous growth factors, artificial stimulators of cellular proliferation or undefined supplements.

The products are devoid of any protein-kinase C stimulators and are suitable for the investigation of second messenger systems in the activation of human and murine lymphocytes. The formulations are complete and contain pharmaceutical-grade

III. X-VIVO™ 15 Medium

X-VIVO™ 15 Medium is similar in composition to X-VIVO™ 10 Medium and has been optimized for the proliferation of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) under serum-free conditions. The formulation supports the proliferation of purified CD3⁺ cells isolated from peripheral blood and human tumors. X-VIVO™ 15 Medium has also been used to support the growth of human monocytes, macrophage cells and cell lines, PBL, granulocytes and natural killer (NK) cells. In addition, X-VIVO™ 15 Medium provides a serum-free environment for the expansion of HUT-78 and related human lymphocytic cell lines.

IV. X-VIVO™ 20 Medium

X-VIVO™ 20 Medium was developed and optimized to support the generation of LAK cells from monocyte-depleted PBL at high density. Initial cell densities between 2.0- 3.0 x 10⁷ cells/ml were successfully used to generate LAK cells. X-VIVO™ Medium 20 may also be used as a growth medium for PBL and TIL.

V. Additional Applications

- Proliferation of PBL
- Proliferation of TIL
- Cryopreservation and transplantation of organs
- Cultivation of human monocytes and macrophages
- Cultivation of stem cells
- Cultivation of dendritic cells

VI. Selected List of Cell Types Grown with X-VIVO™ Media

- Human and murine LAK cells
- Peripheral blood Lymphocytes

human albumin, recombinant human insulin and pasteurized human transferrin. All X-VIVO™ Medium products are manufactured under current GMPs and are listed with the FDA in a Product Master File. Permission to cross-reference the Master File may be obtained by contacting Lonza.

For answers to frequently asked questions regarding these products, please visit our FAQ Database: www.lonza.com/faq

For citations citing the use of these products, please visit our Citations Database: www.lonza.com/citations

II. X-VIVO™ 10 Medium

The X-VIVO™ 10 Medium formulation is designed to support the generation of Lymphokine Activated Killer (LAK) cells in a serum-free environment. The original protocols involved the incubation of patient or normal donor Peripheral Blood Lymphocytes (PBL) at 1.0-3.0 x 10⁵ cells/ml for a period of 3 days in the presence of 1,000 Cetus units of rIL-2/ml. Optimal LAK cell generation is achieved when PBL are incubated for 3 to 10 days at a density of 1.0-6.0 x 10⁵ cells/ml in the presence of 100 – 1,000 Cetus units of rIL-2. X-VIVO™ 10 Medium is available as a 1X liquid in several convenient configurations.

VII. Ordering Information

Cat. No.	Product	Size
04-380Q	X-VIVO™ 10 Medium with L-glutamine, gentamicin and phenol red	1 L
04-743Q	X-VIVO™ 10 Medium with L-glutamine, without gentamicin and phenol red	1 L
BE04-743Q	X-VIVO™ 10 Medium with L-glutamine, gentamicin and phenol red	1 L
BE02-055Q	X-VIVO™ 10 Medium with L-glutamine, without gentamicin and phenol red, contains recombinant transferrin	1 L
04-744Q	X-VIVO™ 15 Medium with L-glutamine, without gentamicin and phenol red	1 L
04-418Q	X-VIVO™ 15 Medium with L-glutamine, gentamicin and phenol red	1 L
BE02-053Q	X-VIVO™ 15 Medium with L-glutamine, gentamicin and phenol red, contains recombinant transferrin	1 L
BE02-054Q	X-VIVO™ 15 Medium with L-glutamine, without gentamicin and phenol red, contains recombinant transferrin	1 L
04-448Q	X-VIVO™ 20 Medium with L-glutamine, gentamicin and phenol red	1 L

Product Use Statement

THESE PRODUCTS ARE FOR RESEARCH USE ONLY. Not approved for human or veterinary use, for application to humans or animals, or for use in clinical or *in vitro* diagnostic procedures.

All trademarks belong to Lonza or its affiliates or to their respective third party owners.

- Human and murine TIL
- Human T cells
- Human and murine macrophages
- Human and murine hematopoietic stem cells (colony formation and proliferation)
- Cryopreservation of human tissue
- Proliferation of draining lymph node lymphocytes

VII. Storage

X-VIVO™ Medium should be stored at 2-8°C.

Protect from light.

I. Introducción

Los esfuerzos de Lonza y la participación en numerosos ensayos clínicos, nos han brindado las herramientas y los conocimientos específicos para apoyo en la inmunoterapia, terapia contra el cáncer, terapia génica y otras terapias celulares. Nuestra filosofía en el desarrollo de medios libres de suero para uso en terapia celular es proveer un microambiente nutricionalmente completo y balanceado para las células. Nuestro medio X-VIVO™ no contiene ningún factor de crecimiento exógeno, estimuladores artificiales de proliferación celular o suplementos indefinidos.

Los productos están desprovistos de cualquier estimulador de la proteína quinasa-C y son adecuados para la investigación de sistemas de segundo mensajero en la activación de linfocitos humanos y murinos. Las formulas son completas y contienen albúmina humana grado farmacéutico, insulina recombinante humana y transferrina humana pasteurizada. Todos los medios X-VIVO™ son manufacturados bajo las normas GMPs actuales y están incluidos en la lista de productos de la FDA. El permiso para hacer una referencia cruzada se puede hacer en contacto con Lonza.

II. Medio X-VIVO™ 10

La composición del medio X-VIVO™ 10 está diseñada para apoyar la generación de linfocitos citolíticos activados en ambientes libres de suero. Los protocolos originales incluyen la incubación de $1.0-3.0 \times 10^6$ linfocitos de sangre periférica de un paciente o donante por un periodo de 3 días en la presencia de 100-1,000 unidades Cetus de rIL-2. El medio X-VIVO™ 10 está disponible como líquido 1X en varias presentaciones.

ANEXO 4

Viernes 26 de octubre de 2012

DIARIO OFICIAL (Tercera Sección)

TERCERA SECCION

PODER EJECUTIVO

SECRETARIA DE SALUD

NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en lo dispuesto por el artículo 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o. fracciones XVI, XXVI, 13 apartados A fracción I y B fracción I 17 Bis fracciones III y VIII, 45, 313 fracciones I y III, 314 fracciones III, IV, VI y XIII, 315, 316, 317, 319, 321, 322, 323 fracción II, 325, 327, 340, 341, 341 Bis, 342 y 375 fracción VI, 459, 460, 461 fracción IV, 462 fracción II de la Ley General de Salud; 3o., fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, II, III y XI, 41, 43, 47 fracción IV y 51 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 4, 6, 20, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 53 y 54 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Organos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos; 2 literal C fracción X del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, 3 fracción I inciso a y 10 fracciones IV y VIII, he tenido a bien ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación de la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

CONSIDERANDO

Que con fecha 18 de julio de 1994, se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos y entró en vigor al día siguiente de su publicación.

Que con fecha 20 de agosto de 2009, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el Centro Nacional de la Transfusión

Sanguínea presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 23 de septiembre de 2011, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que con fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en los términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que con fecha 23 de septiembre de 2011, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que con fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en los términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-253-SSA1-2012, PARA LA DISPOSICION DE SANGRE HUMANA Y SUS COMPONENTES CON FINES TERAPEUTICOS

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma participaron las unidades administrativas e instituciones siguientes:

SECRETARIA DE SALUD.

Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea.

Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH/SIDA.

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad.

Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades.
Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura.
Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud.
Dirección General de Promoción de la Salud.

SECRETARIA DE SALUD DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL.
Dirección General de Servicios Médicos y Urgencias.

SECRETARIA DE LA DEFENSA NACIONAL.
Dirección General de Sanidad Militar.

SECRETARIA DE MARINA.
Dirección General de Sanidad Naval.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.
Dirección de Prestaciones Médicas.
Coordinación de Unidades Médicas de Alta Especialidad.

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO.
Subdirección General Médica.

PETROLEOS MEXICANOS.
Subdirección Corporativa de Servicios Médicos.
Gerencia de Servicios Médicos.

CRUZ ROJA MEXICANA.
Coordinación Nacional de Centros de Sangre.

ASOCIACION MEXICANA DE MEDICINA TRANSFUSIONAL, A.C.

La norma completa se encuentra en la siguiente liga:

[https://www.gob.mx/cnts/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-253-ssa1-2012-para-la-disposicion-de-sangre-humana-y-sus-componentes-con-fines-terapeuticos.](https://www.gob.mx/cnts/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-253-ssa1-2012-para-la-disposicion-de-sangre-humana-y-sus-componentes-con-fines-terapeuticos)