



Universidad de Valladolid



Máster en Investigación Biomédica

“Viabilidad del producto de Terapia Avanzada MSV[®] en matriz de fibrina”

Trabajo de Fin de Máster

Presentado por:

Marta Redondo Marcos

Dirigido por:

Dra. Verónica García Díaz

Valladolid, curso 2022-2023

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este Trabajo de Fin de Máster:

A la Universidad de Valladolid, al IBGM, y al Biobanco del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, a la Dra. Ana Sánchez García y al Dr. Javier García-Sancho por ofrecerme los recursos necesarios y haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo.

A mi tutora Verónica García por su dedicación guiándome a lo largo de todo el proceso, su apoyo y por haberme aportado todos sus conocimientos.

A todo el personal de Citospin por haberme ofrecido siempre su ayuda, paciencia, cariño y dedicación todos estos meses. En especial a las técnicas de producción: Berta, Inés, Victoria, Ana, María... y también a la Dra. Mercedes Alberca por sus consejos.

Por último, a mi familia y amigos por el apoyo y motivación incondicional.

Gracias a todos.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN	1
1. CÉLULAS MADRE.....	1
1.1 Concepto y definición	1
1.2 Clasificación células madre.....	1
2. PRODUCTO DE TERAPIA AVANZADA MSV®.....	4
2.1 Medicamento de terapia avanzada (ATMP).....	4
2.2 Producto MSV®.....	4
2.3 Ingeniería tisular.....	7
2.4 Matrices celularizadas.....	9
2.5 Mejoras producto MSV®.....	10
3. HIPÓTESIS.....	11
4. OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
1. OBTENCIÓN DEL PRODUCTO MSV®.....	12
2. FABRICACIÓN DE LA MATRIZ DE FIBRINA.....	16
3. ELABORACIÓN DE EXPLANTES.....	17
4. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR	18
RESULTADOS.....	19
1. OBTENCIÓN DEL PRODUCTO MSV®.....	19
2. FABRICACIÓN DEL GEL DE PLASMA.....	21
3. ELABORACIÓN DE EXPLANTES.....	22
4. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES EN LA MATRIZ DE	23
FIBRINA.....	23
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27

LISTADO DE ABREVIATURAS

- **AEMPS:** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.
- **ATMP:** (*Advanced Therapy Product*): Medicamento de Terapia Avanzada.
- **CMN:** Células mononucleadas.
- **DMEM:** (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*): Medio Eagle modificado de Dulbecco.
- **ESCs:** (*Embryonic Stem Cells*): Células madre embrionarias.
- **FBS:** (*Fetal Bovine Serum*): Suero Bovino Fetal.
- **GMP/NCF:** (*Good Manufacturing Practice*): Normas de Correcta Fabricación.
- **IBGM:** Instituto de Biomedicina y Genética Molecular de Valladolid.
- **iPS:** (*Induced Pluripotent Stem cells*): Células madre pluripotenciales inducidas.
- **ISCT:** (*International Society for Cellular Therapy*): Sociedad Internacional para la Terapia Celular.
- **MSCs:** (*Mesenchymal Stem Cells*): Células madre mesenquimales.
- **MSV[®]:** Células Mesenquimales de Valladolid.
- **PBS:** (*Phosphate buffer saline*): Tampón fosfato salino.
- **UPC:** Unidad de Producción Celular.

RESUMEN

El desarrollo de las terapias avanzadas supone una transformación revolucionaria tanto en la investigación biomédica como en su aplicación clínica, configurando la medicina del futuro. La ingeniería tisular ofrece resultados prometedores en la medicina regenerativa que permiten no solo la reparación, sino también la regeneración de órganos o tejidos dañados. Por ejemplo, en la clínica existen defectos óseos generados por traumatismos, anomalías congénitas o tumores. El tratamiento de estas afecciones suele ser complejo, pudiendo llegar a darse la pérdida o sacrificio de hueso, generando secuelas estéticas y funcionales para el paciente. A partir de ahí, planteamos la posibilidad de generar un soporte natural combinado con células madre mesenquimales de médula ósea que fuese biodegradable, biocompatible y osteoconductor, y que a su vez permitiese la adhesión y proliferación celular. El objetivo de este trabajo consiste en fabricar una matriz de fibrina con el medicamento de terapia avanzada MSV[®] (ATMP MSV[®]), y analizar la viabilidad y su capacidad de proliferación y expansión. Con los resultados obtenidos, se pudo confirmar que es posible la elaboración de una matriz con células viables en su interior. Por ello, a pesar de la necesidad de establecer protocolos estandarizados que garanticen la seguridad y eficacia del producto a través de ensayos clínicos, este trabajo contribuye a abrir nuevos caminos para el desarrollo de la medicina regenerativa del futuro.

Palabras clave: Ingeniería Tisular, Matrices Biodegradables, ATMP, células madre mesenquimales y Medicina Regenerativa.

ABSTRACT

The development of advanced therapies represents a revolutionary transformation in both biomedical research and clinical application, shaping the medicine of the future. Tissue engineering offers promising results in regenerative medicine that allow not only the repair but also the regeneration of damaged organs or tissues. For example, in the clinic there are bone defects caused by trauma, congenital anomalies or tumors. The treatment of these conditions is usually complex, and the loss or sacrifice of bone can occur, generating aesthetic and functional sequelae for the patient. From there, we proposed the possibility of generating a natural support combined with bone marrow mesenchymal stem cells that would be biodegradable, biocompatible and osteoconductive, while allowing cell adhesion and proliferation. The aim of this work is to fabricate a fibrin matrix with the advanced therapy drug MSV[®] (ATMP MSV[®]), and to analyze the viability and its capacity for proliferation and expansion. With the results obtained, it was possible to confirm that it is possible to produce a matrix with viable cells inside. Therefore, despite the need to establish standardized protocols that guarantee the safety and efficacy of the product through clinical trials, this work contributes to opening new paths for the development of regenerative medicine in the future.

Key words: Tissue Engineering, Biodegradable Matrix, ATMP, Mesenchymal Stem Cells and Regenerative Medicine.

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS MADRE

1.1 Concepto y definición

Las **células madre** o “*stem cells*” se definen como un tipo de células indiferenciadas que tienen la capacidad de autorrenovarse (proliferación ilimitada conservando su estado de indiferenciación) y diferenciarse hacia células maduras pertenecientes a diferentes linajes, lo que les confiere un gran potencial en el campo de la medicina regenerativa (1). Sus propiedades les permiten tanto trasplantarse en tejidos sanos (para mejorar una función) como en tejidos dañados (para su reparación). (Figura 1)

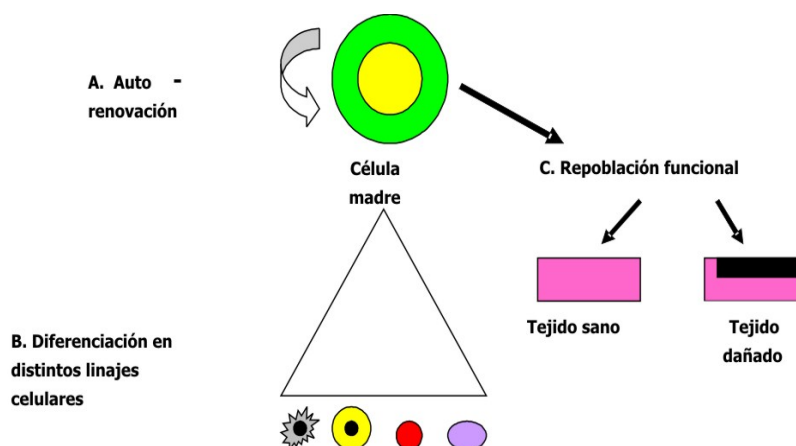


Figura 1. Propiedades células madre.

Fuente: Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. ISSN 0864-0289

1.2 Clasificación células madre

Las células madre se pueden clasificar según su grado de diferenciación o potencialidad, y según su origen.

- **Según su grado de diferenciación o potencialidad**

Se diferencian cuatro tipos de células madre en función de la capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos celulares (Figura 2):

1. Células madre totipotentes. Son células con la capacidad de constituir o crear nuevos embriones y formar un organismo completo, ya que pueden diferenciarse en cualquiera de los tipos celulares: tejido embrionario (ectodermo, mesodermo y endodermo) y tejido extraembrionario (placenta, amnios, saco vitelino, alantoides y corion). La célula madre totipotente por excelencia es el cigoto, y este mantiene su totipotencia hasta la etapa de 8 a 16 células.

Este tipo de células madre tiene un uso restringido en terapia celular por diferentes controversias en cuanto a su potencial carcinogénico, ya que una vez implantadas pueden dar lugar a teratomas o teratocarcinomas, y además presentan problemas éticos, ya que se obtienen a partir de embriones humanos.

2. Células madre pluripotentes. Son las células madre embrionarias aisladas de la masa celular interna del blastocisto; no forman un organismo completo, pero pueden dar lugar a cualquier tipo celular de los tres linajes embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo) y a las células de la línea germinal. Las células pluripotentes más estudiadas son las células madre embrionarias (ESCs).
3. Células madre multipotentes. Son células capaces de generar células de su misma capa embrionaria, es decir, tejidos del endodermo, mesodermo y ectodermo. Estas células se encuentran en los tejidos adultos donde se encargan de la reparación de los mismos como ocurre en huesos, epitelios, células de la sangre y músculo esquelético. Se pueden obtener de una gran variedad de fuentes, entre las que destacan la médula ósea y el cordón umbilical. El ejemplo más conocido de células multipotenciales son las hematopoyéticas.
4. Células madre unipotentes. Son las células madre que presentan la menor potencialidad, ya que solo pueden especializarse a un único linaje celular. Por ejemplo, los neumocitos tipo II en el pulmón normal se comportan de esta manera dando lugar a la generación de neumocitos tipo I tras la apoptosis o lesión de estos.

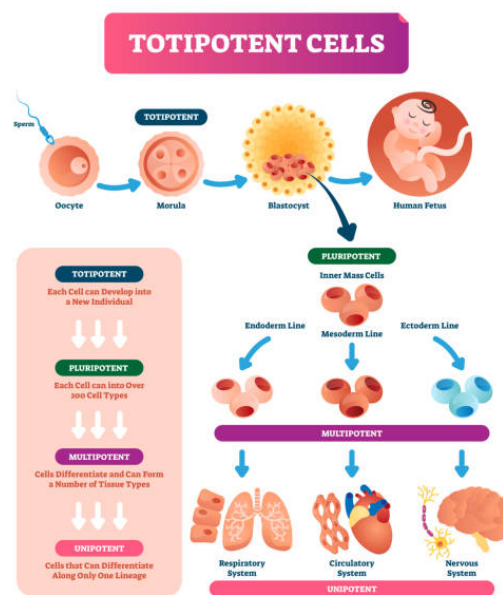


Figura 2. Clasificación células madre según su potencialidad.

Fuente: Imagen web iStock.

- **Según su origen**

Las células madre según su origen se pueden clasificar en dos grandes grupos (2):

1. Células madre embrionarias ("Embryonic stem cells" o ESCs): son células pluripotentes que se obtienen a partir de la masa celular interna de un embrión en estado de blastocisto, es decir, de 4 a 7 días tras la fecundación dependiendo de la especie. Estos embriones son obtenidos mediante fecundación *in vitro* en tratamientos de infertilidad y donados para su uso en investigación.

La pluripotencialidad de las ESCs las hace ser de gran interés para uso terapéutico, ya que les confiere la capacidad de diferenciarse hacia cualquier linaje celular del organismo. Sin embargo, su utilización clínica puede generar diversos problemas: éticos y legales (uso de embriones para su obtención), de bioseguridad (elevado potencial teratogénico) e inmuno-histocompatibilidad.(3), (4)

Actualmente, los problemas éticos se han solventado con la utilización de células madre pluripotenciales inducidas (iPS) obtenidas en 2006 a partir de células de ratón (5) y en el 2007 (6) a partir de células humanas. Estas células presentan ventajas importantes respecto a las ESCs, ya que no generan rechazo inmunológico, debido a que pueden obtenerse a partir de las células del propio paciente; no requieren la utilización de óvulos humanos y son de fácil obtención.

2. **Células madre adultas.** Son células multipotentes que poseen la capacidad de clonarse creando copias de sí mismas, y de diferenciarse para dar lugar a las células adultas del tejido en el que se encuentran. Esta población de células se encuentra en los tejidos adultos donde su papel fundamental es conservar y restaurar el tejido donde se encuentran.

Las células madre adultas más conocidas por su aplicación en medicina regenerativa son las **células madre mesenquimales** (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs). Estas células se originan a partir del mesodermo embrionario, presentan una morfología fibroblástica, y tienen la capacidad de diferenciarse hacia diversos tipos celulares como osteocitos, condrocitos y adipocitos, cuando se mantienen en un ambiente condicionado.

Los primeros trabajos se realizaron con MSCs aisladas de la médula ósea (7) pero actualmente pueden obtenerse a partir de diferentes tejidos (Figura 3): tejido adiposo, músculo, tendón, pulpa dental, ligamento periodontal, sangre del cordón umbilical, placenta, periostio, hígado, tejido cartilaginoso, líquido sinovial, bazo e hígado (8), (9), (10).

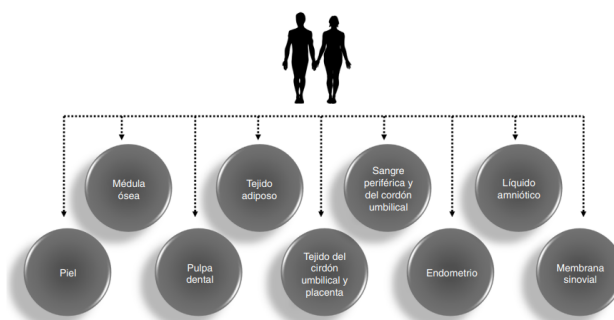


Figura 3. Principales fuentes de obtención de células mesenquimales humanas.

Fuente: J.A. Guadix et al. / Med Clin (Barc). 2017;148(9):408–414

2. PRODUCTO DE TERAPIA AVANZADA MSV®

2.1 Medicamento de terapia avanzada (ATMP)

“Se define como medicamento de terapia avanzada a los medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Estas terapias constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuye a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces” (2).

Los ATMPs están a la vanguardia de la innovación científica y son productos complejos cuya obtención a pequeña o gran escala para su uso clínico implica que deben ser fabricados según la legislación vigente. Las células se han considerado medicamentos desde el año 2004, por lo tanto, a partir de ese momento se deben fabricar según las normas de correcta fabricación (NCF) o “*Good Manufacture Practice*” (GMP) (11) en instalaciones acreditadas y con todos los procesos autorizados por las agencias reguladoras, en el caso de España por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). El cumplimiento de esta normativa nos permite obtener un ATMP con una calidad garantizada para su utilización en ensayos clínicos experimentales y tratamientos establecidos de terapia celular.

El Instituto de Biomedicina y Genética Molecular de Valladolid (IBGM) cuenta con un laboratorio acreditado por la AEMPS desde el año 2006 para la fabricación de productos terapia avanzada, destacando el producto MSV®.

2.2 Producto MSV®

MSV®, acrónimo para “Células Mesenquimales de Valladolid”, es el medicamento en investigación de Terapia Avanzada producido en la Unidad de Producción Celular del IBGM (12), (13), (14), (15), (16).

El ATMP MSV® está compuesto por “células mesenquimales troncales adultas de médula ósea expandidas”, según la nomenclatura recomendada por la AEMPS y está autorizado para aplicación autóloga (receptor y donante son el mismo individuo) y alogénica (receptor diferente al donante).

El producto celular MSV® (PEI: 10-134) está compuesto por células progenitoras mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea de un donante sano y expandidas *in vitro* bajo NCF en el IBGM. Este producto se considera un Medicamento de Terapia Celular Somática, como se señala en la Directriz sobre medicamentos basados en células humanas (EMA/CHMP/410869/2006) y en la Parte IV de la Directiva 2003/63/CE, *Advanced Therapy Medicinal Products*, ya que se compone de células somáticas vivas cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación, la cual consiste en la expansión de poblaciones celulares *ex vivo* para obtener un efecto terapéutico.

El producto MSV® se obtiene a partir de un aspirado de médula ósea que es procesado en la UPC (Unidad de Producción Celular) para la selección, obtención y expansión de las células madre mesenquimales que van a formar el principio activo de este ATMP. (Patente WO/2020/058324: *Method for obtaining an enriched population of functional mesenchymal stem cells, cells obtained thereof and compositions comprising the same*)

INTRODUCCIÓN

El medicamento MSV[®] se administra al paciente en una suspensión celular inyectable de células mesenquimales en un medio isotónico. Se presenta en jeringas Luer Lock de distintos tamaños (1, 3, 5 y 10 ml), conteniendo de 1 a 40 millones células en distintos volúmenes (hasta 8 ml), en función de la dosis y concentración requeridas para cada aplicación terapéutica. Este producto tiene una viabilidad celular durante 72 horas a una temperatura de 2-8°C. (Ver Figura 4).



Figura 4. Producto MSV[®].

Las especificaciones del producto MSV[®] (Tabla 1) nos indican que está compuesto por una suspensión celular blanquecina estéril y libre de micoplasma, que contiene células mesenquimales de médula ósea expandidas, con una viabilidad $\geq 90\%$, un número de duplicaciones acumuladas ≤ 5 , y que las células presentan un patrón inmunofenotípico característico de células mesenquimales, con una expresión $\leq 10\%$ para los marcadores de células hematopoyéticas CD14, CD34, CD45 y para el antígeno leucocitario humano HLA-DR (antígeno mayor de histocompatibilidad clase II); y una expresión $\geq 90\%$ de los marcadores característicos de células mesenquimales CD105, CD166, CD73, CD90. (17) (18).

Origen	Células MSV [®] derivadas de médula ósea expandidas
Aspecto	Suspensión celular blanquecina
Envase	Jeringa Luer Lock
Micoplasma	Ausencia
Viabilidad	$\geq 90\%$
Duplicaciones acumuladas	≤ 5
Identidad (inmunofenotipo)	$\leq 10\%$: CD14, CD34, CD45, HLA-DR $\geq 90\%$: CD105, CD166, CD73, CD90
Esterilidad	Estéril

Tabla 1. Especificaciones producto MSV[®].

El auge de la medicina regenerativa se ha producido fundamentalmente por la generación de nuevos conocimientos sobre las células madre y su potencial uso terapéutico, ya que el uso de estas células como herramienta terapéutica frente a diversas enfermedades representa una de las áreas más prometedoras en investigación biomédica. A pesar de esto, y tras más de 15 años de conocimiento en investigación básica, el paso a la práctica clínica es un proceso largo y complicado, ya que a pesar de la gran cantidad de productos ATMPs que inician el proceso con ensayos clínicos fase I y II, son muy pocos los datos de eficacia obtenidos en fase II, I y todavía menor el número de productos que alcanzan la fase de autorización (fase IV) para su comercialización.

INTRODUCCIÓN

En el caso de los ATMPs, las primeras fases de desarrollo, que conllevan el descubrimiento, la investigación preclínica y los ensayos de seguridad, se desarrollan en grupos académicos o en pequeñas y medianas empresas, que carecen de los recursos para llevar a cabo los ensayos clínicos correspondientes y completar el proceso de desarrollo del ATMP y el desarrollo de estos productos se detiene en las primeras fases de estudios de seguridad y eficacia (fases I y II).

El producto MSV[®] es un ATMP en investigación que comenzó su desarrollo en el año 2006 con un Ensayo Clínico en fase I para valorar la eficacia y seguridad de la inyección trasendocárdica de células mesenquimales autólogas para regeneración cardíaca en enfermedad isquémica crónica. A partir de este momento, se ha utilizado en 12 ensayos clínicos fases I y II principalmente para la regeneración osteoarticular por la capacidad de multipotencia que presentan las células mesenquimales, y por sus propiedades inmunomoduladoras que se han aplicado en tratamientos de nefritis lúpica, en el fallo respiratorio agudo de pacientes con neumonía por COVID-19 y xerostomía por radioterapia. En la mayoría de los ensayos clínicos se ha utilizado el producto MSV[®], que se ha aplicado en suspensión en una cavidad delimitada como es el caso de la regeneración osteoarticular o xerostomía o infusión intravenosa como es el caso del lupus eritematoso. (Ver Figura 5)

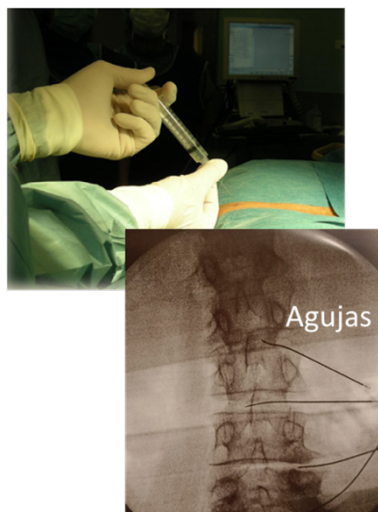
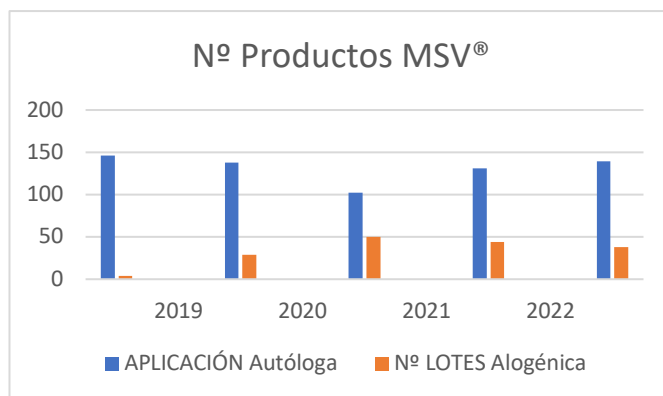


Figura 5. Aplicación en disco intervertebral del producto MSV[®]

Actualmente en la UPC del IBGM se fabrican más de 100 productos ATMP MSV[®] anuales, la mayoría de aplicación autóloga, aunque en los últimos años están aumentando los tratamientos alogénicos como se puede observar en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Productos MSV[®] fabricados en los últimos 5 años.

2.3 Ingeniería tisular

La ingeniería tisular se define como un área de estudio multidisciplinar que pretende, mediante la implantación de materiales que funcionan como andamiaje, remodelar, reemplazar y/o regenerar determinados tejidos u órganos con el fin de mantener o conservar la estructura ya existente, o promover el crecimiento y proliferación de nuevos tejidos.

Todo ello lleva a la necesidad de generar sustitutos para los tejidos naturales degenerados o dañados. Más que un simple reemplazo la ingeniería tisular trata de regenerar el tejido natural, combinando células, matrices y/o factores de crecimiento. (Figura 6)

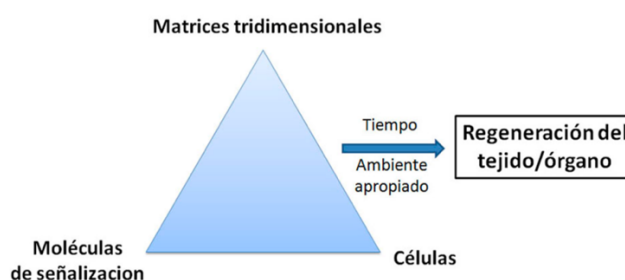


Figura 6. Triángulo o Tríada de elementos de la Ingeniería Tisular.

Fuente: Martín-Piedra, A. & Martín-Piedra, L. Matrices para Ingeniería del tejido óseo. *Actualidad Médica* (2019) 104(806):36-45

En este punto cabe destacar la importancia de los biomateriales que se emplean para realizar las matrices o soportes, ya que deben poseer determinadas características para estimular respuestas celulares adecuadas y que paralelamente sean reemplazados paulatinamente a medida que se forma el nuevo tejido.

Por ejemplo, si pensamos en la ingeniería de tejidos aplicada a la reparación de defectos óseos, necesitamos que las características los biomateriales empleados en las matrices presenten:

- **Biocompatibilidad.** Deben integrarse en el organismo receptor sin generar respuesta inmunológica.
- **Porosidad.** Las matrices deben ser porosas, lo que aumenta la superficie expuesta al cultivo celular y facilita la distribución de las células en su interior. En este punto es muy importante el tamaño del poro, que debe estar en un rango de 200 a 900 μm , para permitir la penetración celular, la formación de matriz extracelular y la neovascularización a partir de los tejidos circundantes.
- **Propiedades de superficie.** Los biomateriales deben tener unas características químicas y topográficas que permitan adhesión y proliferación celular, tanto de las células incluidas en el soporte como de las células de los tejidos adyacentes.
- **Osteoinductividad.** Consiste en la capacidad de reclutar células osteogénicas del hueso sano adyacente y estimular la diferenciación osteogénica de las células incluidas en la matriz para la formación del nuevo tejido.

INTRODUCCIÓN

- Propiedades mecánicas. La matriz debe aportar resistencia mecánica para soportar la presión y mantener la forma requerida para el crecimiento celular y la producción de matriz extracelular.
- Biodegradabilidad. Es esencial que la matriz se degrade de forma paulatina a medida que se forma el nuevo tejido, y que los productos de degradación no sean tóxicos y se eliminen fácilmente.

El campo de los biomateriales ha experimentado un gran avance en los últimos años, ya que han aumentado su durabilidad, su éxito y las técnicas utilizadas para su uso.

Inicialmente, en los años 50 se buscaban simplemente materiales de relleno que sustituyeran el tejido dañado sin tener en cuenta su estructura o características, el objetivo principal de estos biomateriales era no generar rechazo. Sin embargo, a partir de los años 80, se buscan materiales que interactúen con el tejido a reparar, es decir, que sean biodegradables y bioactivos; por lo tanto, en este campo se ha dado el salto de reparar un tejido a regenerarlo. Actualmente existen múltiples opciones de biomateriales para el desarrollo de las matrices tridimensionales en ingeniería de tejidos.

En primer lugar, tenemos los METALES (cobalto, cromo, titanio, aluminio...) que son materiales utilizados para la fabricación de implantes que deben soportar carga, como son las prótesis de cadera. Estos deben ser tolerados por el organismo y resistentes a la corrosión. Un segundo grupo de materiales serían las CERÁMICAS (hidroxiapatita, biovidrios, fosfato tricálcico, etc.), que son materiales más frágiles que los metales, por lo que se utilizan en implantes que no soporten carga. Estos materiales tienen una gran estabilidad química y resistencia a la compresión; se utilizan como elementos de relleno o para el recubrimiento de implantes metálicos. Sin embargo, el mayor grupo de biomateriales es el de los POLÍMEROS, que son macromoléculas principalmente orgánicas formadas por pequeñas unidades llamadas monómeros, lo que permite realizar diferentes combinaciones modificando así las características de dureza, plasticidad y densidad del mismo. Estos polímeros se utilizan para los implantes en tejidos blandos o duros, y como agentes de liberación de fármacos. (19).

En este grupo, podemos diferenciar entre polímeros naturales, donde encontramos la celulosa, el alginato de sodio, el caucho natural, colágeno, heparina, albúmina, quitosán, coral, etc. O sintéticos como el ácido poliláctico (PLA) o el poliglicólico (PGA), ampliamente utilizados en suturas reabsorbibles.

La ventaja de estos polímeros es que son biodegradables y biocompatibles, ya que facilitan la adhesión, migración y diferenciación celular, así como la deposición de matriz extracelular, promoviendo la regeneración del tejido dañado. Pero tienen la desventaja de poder generar respuesta inmunológica y además, existe un riesgo de transmisión viral cuando se utilizan de origen animal. Dentro de los polímeros naturales, la UPC tiene experiencia con las matrices de fibrina (para la fabricación de equivalentes dérmicos) (20) y de albúmina (para la fabricación de matrices tridimensionales), ambas utilizadas de origen humano y en ensayos clínicos previos. (Eudra CT: 2008-003665-12, Eudra CT: 2009-016965-26, Eudra CT 2010-024246-30).

La fibrina es una proteína fibrilar con capacidad de formar redes tridimensionales, desempeñando un papel importante en los procesos de coagulación. Esta proteína se obtiene a partir de la acción de la trombina sobre el fibrinógeno plasmático y actúa como un sustrato para la migración de las células, acelerando la revascularización (21). Sin embargo, las matrices de fibrina son de rápida degradación y escasa resistencia mecánica, por lo que se utilizan principalmente en forma de geles.

La albúmina es la proteína principal de la sangre, se sintetiza en el hígado y su función principal es mantener la presión oncótica y el transporte de sustancias (hormonas, fármacos y drogas). Representa el 60% de las proteínas que contiene el suero o el plasma, lo que permite la fabricación de matrices autólogas a partir de una muestra de sangre del paciente.

2.4 Matrices celularizadas

La idea central actual en ingeniería tisular es utilizar células mesenquimales incluidas en diferentes tipos de matrices, formando **matrices celularizadas** capaces de promover la diferenciación celular, soportar la formación de tejidos permitiendo la migración celular y la proliferación de las mismas para regenerar los tejidos dañados. Estas células poseen el potencial de diferenciarse hacia tejidos mesodérmicos (hueso, cartílago, etc.), por eso son las primeras candidatas para la reparación de lesiones osteoarticulares (19)

Se sabe que el tejido óseo se origina a partir de células de origen mesenquimal y además, es un tejido que se regenera persé; aproximadamente nuestro esqueleto se regenera cada 10 años. El problema aparece cuando esta regeneración falla debido a la existencia de traumatismos, enfermedades congénitas como la osteogénesis imperfecta, tumores, malformaciones, quistes o infecciones; en estos casos se generan los defectos óseos que son de notable importancia en el ámbito clínico, sobre todo en el campo de la cirugía maxilofacial donde la pérdida de hueso origina alteraciones estéticas y funcionales. Estos defectos tienen elevada prevalencia, ya que el 40% de la población mayor de 40 años presenta periodontitis lo que conlleva a la pérdida de soporte óseo alveolar.

La UPC en colaboración con el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Universitario Río Hortega (HURH) ha desarrollado ya un medicamento de ingeniería tisular conocido como "BIOMAX", compuesto por una matriz de albúmina autóloga entrecruzada (obtenida de sangre periférica del paciente) (Patente WO 2008/119855) y células MSV-H (células mesenquimales de hueso) obtenidas a partir de un *punch* de hueso mandibular y prediferenciadas hacia tejido óseo durante 21 días para reparar defectos óseos maxilares (Figura 7).



Enucleación del quiste maxilar



Aplicación bioimplante "BIOMAX"

Figura 7. Bioimplante "BIOMAX" y técnica quirúrgica para su aplicación.

El producto "BIOMAX" se ha utilizado en el ensayo clínico (EUDRACT 2010-024246-30) fase I/II, donde se han tratado 9 pacientes que presentaban un defecto quístico mandibular y cuyos resultados han sido satisfactorios, ya que no ha habido reacciones adversas, se ha completado el estudio y además, se ha observado un aumento de la densidad ósea en la zona tratada respecto a una zona control no tratada como se puede ver en la Figura 8 (13)

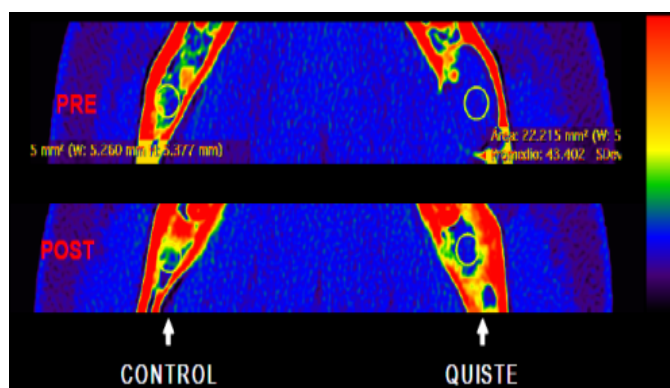


Figura 8. Resultados del estudio con el producto BIOMAX.

2.5 Mejoras producto MSV®

Actualmente, el ATMP MSV® está compuesto por una suspensión de células mesenquimales en un medio isotónico, es de fácil aplicación en compartimentos cerrados, al igual que el producto BIOMAX, que se utiliza como material de relleno en defectos localizados. Sin embargo, presenta limitaciones para su aplicación en defectos abiertos, por lo que surge la necesidad de combinar el producto MSV® con diferentes matrices que faciliten la aplicación de las células mesenquimales en un defecto abierto y que se mantengan presentes en el mismo para su regeneración. En este punto, destacamos la necesidad de buscar tratamientos alternativos para la osteonecrosis secundaria a medicación de los maxilares en los pacientes con tratamiento con fármacos antirresortivos óseos (Bifosfonatos/Denosumab) y antiangiogénicos. (Figura 9)



Figura 9. Imagen osteonecrosis maxilares.

Los bifosfonatos son un grupo de medicamentos utilizados para la prevención y tratamiento de enfermedades con resorción ósea (22) como la osteoporosis y el cáncer con metástasis ósea, como el cáncer de mama, próstata y mieloma.

En pacientes con osteoporosis, tratados con bisfosfonatos, la condición patológica de la necrosis de los maxilares es poco frecuente, con una incidencia de 0,001-0,15% por año de exposición. Esta frecuencia es ligeramente superior a la población general y no significativa estadísticamente. Por el contrario, la incidencia de necrosis de los maxilares en pacientes oncológicos tratados con bisfosfonatos vía endovenosa (4 mg /mes, 1%) o Denosumab (120 mg/mes, 0,7-1,9 %) es 100 veces mayor que en los pacientes no tratados con esta terapia, por lo que surge la necesidad de investigar sobre un nuevo formato de aplicación del producto MSV® que nos permita regenerar este tipo de defectos.

3. HIPÓTESIS

La fibrina es una proteína natural que permite la fabricación de geles tridimensionales, por lo que si se combinan las células mesenquimales que componen el ATMP MSV® y la matriz de fibrina, se puede realizar un producto de ingeniería tisular que permita la aplicación de las células madre mesenquimales para la regeneración de defectos óseos abiertos.

4. OBJETIVOS

El **objetivo general** de este Trabajo de Fin de Máster consiste en fabricar una matriz de fibrina en la que se incluyen las células madre mesenquimales que componen el ATMP MSV®.

Los **objetivos específicos** planteados son los siguientes:

- Obtener células madre mesenquimales a partir de médula ósea equivalentes al ATMP MSV®.
- Evaluar la capacidad de proliferación y crecimiento de las células madre mesenquimales en la matriz de fibrina.
- Evaluar la viabilidad de las células madre mesenquimales incluidas en la matriz de fibrina.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención del producto MSV[®]

Las células mesenquimales MSV[®] se obtienen a partir de una muestra de aspirado de médula ósea de donantes sanos procedentes de la UPC del Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM).

Todos los donantes utilizados han sido informados clara y cuidadosamente del procedimiento que se realiza para la fabricación del producto ATMP MSV[®] y han firmado un consentimiento de donación.

En este estudio participaron tres donantes sanos. Las células madre mesenquimales se han seleccionado mediante una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll que permite separar las células mononucleares de las células sanguíneas. En este trabajo se parte de 50 ml de médula ósea previamente diluida y filtrada en la UPC, por lo que se realiza directamente la centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll Paque[™] PLUS (Cytiva). Para ello seguimos los siguientes pasos:

- Separar la médula ósea en dos tubos estériles con 25 ml cada uno.
- Añadir 5 ml de Tampón Fosfato Salino (PBS) (Gibco) + 20 % HSA (Behring 200 g/l) a cada tubo estéril.
- Colocar 20 ml de Ficoll Paque[™] PLUS (Cytiva) en un tubo estéril y añadir lentamente los 30 ml de médula ósea diluida y filtrada. Este proceso se realiza dos veces.
- Centrifugar a 1400 rpm durante 20 min sin freno.
- Recoger las interfases, que es donde se encuentra la fracción de células mononucleadas, en un tubo estéril y llevarlo en enrase con PBS (Gibco) + 20 % HSA (Behring 200 g/l).
- Centrifugar 10 min a 1400 rpm (Figura 10).
- Retirar y desechar el sobrenadante y realizar un segundo lavado con PBS (Gibco) + 20 % HSA (Behring 200 g/l).
- Centrifugar 10 min a 1400 rpm.
- Retirar y desechar el sobrenadante, y resuspender en medio de cultivo (DMEM 4,5 g/l de glucosa (Gibco) + 20% FBS (Gibco) + 0.5% gentamicina (10mg/ml Gibco)).
- Muestrear 20 μ l para ensayos de conteo y viabilidad.

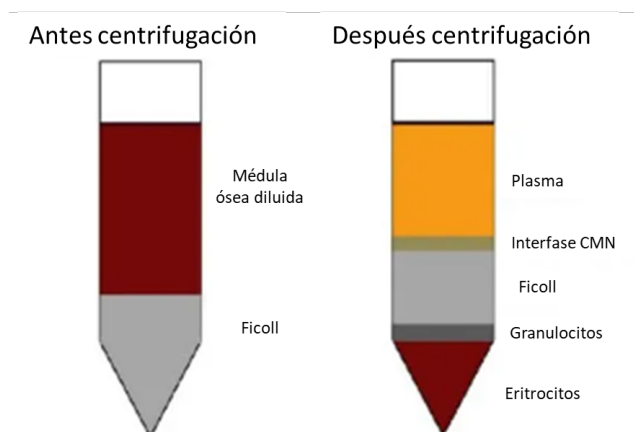


Figura 10. Imagen de centrifugación con gradiente de densidad con Ficoll.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los **ensayos de conteo y viabilidad** se realizan con la cámara de Neubauer (Figura 11). Se toma una muestra de 20 μl de la suspensión células y se diluye con Trypan-Blue (Biochrom, A.G), lo que permite diferenciar las células vivas de las células muertas o dañadas, ya que éstas últimas se tiñen de color azul, y de esta forma podemos calcular el porcentaje de viabilidad.



Figura 11. Cámara de Neubauer.

Se monta la cámara de Neubauer y, acercando la punta de la pipeta al borde del cubre, se introduce la mezcla lentamente, llenando completamente el retículo de la cámara por capilaridad. Se cuentan los 4 cuadrantes de 16 cuadrados y se calcula el número medio de células por cuadrante. De esta manera, se calcula el número de células por ml (Figura 12). También se contabilizan las células muertas para calcular la viabilidad global.

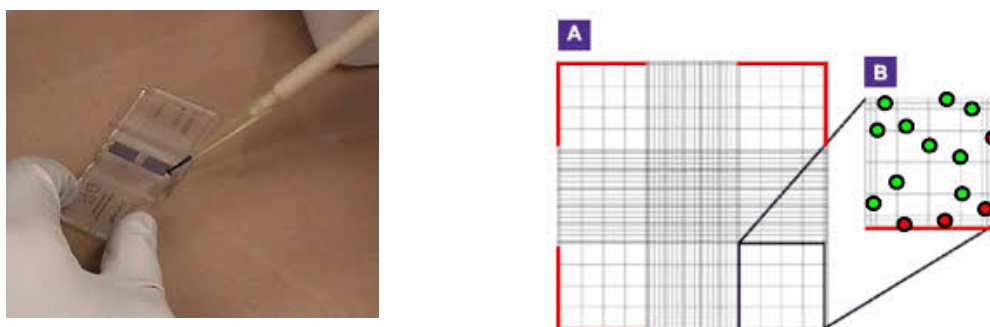


Figura 12. Montaje de la cámara de Neubauer e imagen del cuadrante.

Para calcular el número de células, es necesario realizar la siguiente fórmula:

\bar{X} células por cuadrante $\times 10^4$ (volumen cámara) \times volumen ml (volumen de la muestra) $\times 2$ (1/2, que es la dilución) = n° de células totales

\bar{X} células por cuadrante $\times 2 \times 10^4$ = n° células/ml

Viabilidad = (n° células vivas / n° células totales) $\times 100$

Las células mononucleadas obtenidas fueron sembradas en frascos de cultivo de 175 cm^2 a una densidad de 175.000 células/ cm^2 , con 50 ml de medio de cultivo que se renueva dos veces a la semana. El cultivo se mantiene en el incubador a 37° C y 10% de CO_2 durante aproximadamente 10 días, y esto nos permite seleccionar las células adherentes, capacidad característica que presentan las células madre mesenquimales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuando el cultivo celular está confluyente, es decir, cuando presenta un porcentaje de crecimiento entre el 80-90%, se realiza la tripsinización y expansión celular. La expansión celular se lleva a cabo a partir de los siguientes pasos:

- Retirar por completo el sobrenadante del medio de cultivo del frasco.
- Añadir 30 ml de PBS (Gibco) haciendo movimientos circulares lentos para lavar el frasco. A continuación, retirar por completo el PBS del recipiente.
- Añadir 15 ml de tripsina/EDTA (Gibco), incubar 5 minutos en el incubador a 37°C y comprobar al microscopio si las células se han despegado completamente de la superficie del frasco, sino es así, dejar un par de minutos más.
- Neutralizar con 15 ml de medio de cultivo para inactivar la acción de la tripsina. Recoger la suspensión y llevarla a un tubo estéril con ayuda de una pipeta.
- Lavar el frasco con 5 ml de medio de cultivo y añadir al tubo estéril con la suspensión celular.
- Centrifugar 10 minutos a 1400 rpm.
- Retirar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 5 ml de medio de cultivo.
- Se toma una muestra de 20 µl de la suspensión celular y se llevan a cabo los estudios de conteo y viabilidad celular con la ayuda de la cámara de Neubauer.

Estas células obtenidas tras el proceso de expansión en Pase 0, se siembran en 2 frascos de 175 cm² a una densidad de 1.000 células/cm², con 50 ml de medio de cultivo que se renueva dos veces a la semana. El cultivo se mantiene en el incubador a 37° C y 10% CO₂ hasta que llegue a confluencia, aproximadamente 12 días, momento en el que se realiza de nuevo el proceso de disociación celular con Tripsina/EDTA (Gibco) para obtener las células mesenquimales purificadas que se resuspenden en un medio isotónico y que forman el **producto MSV[®]**.

Al producto MSV[®] se le realizan diferentes controles para garantizar su calidad: conteo y viabilidad, número de duplicaciones, ensayo de esterilidad y micoplasma y estudio del inmunofenotipo por citometría de flujo. En este estudio hemos realizado todos los controles excepto los ensayos de esterilidad y micoplasma, ya que al trabajar fuera del área estéril hemos reproducido el proceso de fabricación del producto MSV[®], pero a diferencia del proceso de fabricación en la sala blanca, utilizamos en todos los procesos medio de cultivo con antibiótico (DMEM 4,5 g/l de glucosa (Gibco) + 20% FBS (Gibco) + 0.5% gentamicina (10 mg/ml Gibco)).

- **Contaje y viabilidad**

Se toma una muestra de 20 µl de la suspensión celular y se llevan a cabo los estudios de conteo y viabilidad celular con la ayuda de la cámara de Neubauer.

El producto MSV[®] debe tener el número suficiente de células para los tratamientos solicitados y una viabilidad $\geq 90\%$.

- **Determinación del número de duplicaciones**

La capacidad replicativa o de expansión se mide normalmente por el número de duplicaciones que puede llevar a cabo una población celular. El número de duplicaciones celulares depende del tipo celular, la edad y la especie del individuo. Las células de individuos más viejos tienen menos replicaciones que las células de individuos más jóvenes, y éstas, menos que las de un feto. La pérdida paulatina de la capacidad replicativa de una población celular no se debe a falta de nutrientes o factores

MATERIAL Y MÉTODOS

de crecimiento, ya que éstos se encuentran en abundancia en el medio de cultivo, sino que se debe a la senescencia replicativa o senescencia celular. Este es un fenómeno que no refleja el comportamiento de una célula individual, sino de una población, pues la disminución de la capacidad replicativa no se debe a que las células se vayan dividiendo más lentamente, sino a la disminución en el número de células que continúan dividiéndose.

El cálculo del número de duplicaciones se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$n = (\log N_h - \log N_i) \log 2$$

n = nº duplicaciones

N_h = nº células finales

N_i = nº células iniciales

El producto MSV[®] debe tener un número de duplicaciones acumuladas ≤5.

- **Estudio del inmunofenotipo por citometría de flujo**

El estudio del inmunofenotipo se realizó mediante un análisis de los antígenos de superficie por citometría de flujo, lo que nos permitió comprobar la presencia de los marcadores específicos de células mesenquimales establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). En 2015 se estableció que, para que una célula fuera considerada mesenquimal, debía mostrar un fenotipo de marcadores de superficie con expresión positiva (≥ 90%) para los marcadores CD105, CD73 y CD90, y sin expresión de marcadores hematopoyéticos (≤10 %) CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD79 alfa o CD19 y HLA-DR.

El panel utilizado en este estudio para la caracterización de las células MSV[®] incluye los anticuerpos hematopoyéticos de exclusión CD14, CD34, CD45 y HLA-DR, y los marcadores característicos de células mesenquimales CD73, CD90, CD105 y CD166.

Este análisis se realiza en una suspensión de 10⁶ células MSV[®] diluidas en 0.5 ml de PBS (Gibco).

Se repartieron las células en 4 tubos Eppendorf (250.000 células/tubo, en 125 µl) y se marcaron con el patrón de anticuerpos (ImmunoStep[®]) que se muestra en la Tabla 2, en las dosis recomendadas por el fabricante.

Tubo	MARCAJE		
1	CONTROL		
2	CD 14	CD 166	CD 34
3	CD 45	CD 73	CD 90
4	CD 105	HLA-DR	CD 90

Tabla 2. Patrón de anticuerpos para análisis por citometría de flujo.

Los tubos Eppendorf se incuban en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado este tiempo se añaden 2 ml de PBS (Gibco) para lavar y se centrifugan durante 5 minutos a 2000 rpm. Retiramos el sobrenadante, resuspendemos el pellet celular en 500 µl de PBS (Gibco) y adquirimos la muestra en el citómetro de flujo Guava easyCyte[®] para su estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los resultados obtenidos en el citómetro se analizan con el software Kaluza, y se obtiene una imagen como se muestra en la Figura 13, donde se puede ver la comparación de las células a estudio marcadas con los anticuerpos (color azul) frente a las células control sin marcaje (color amarillo), con el porcentaje de expresión de cada anticuerpo.

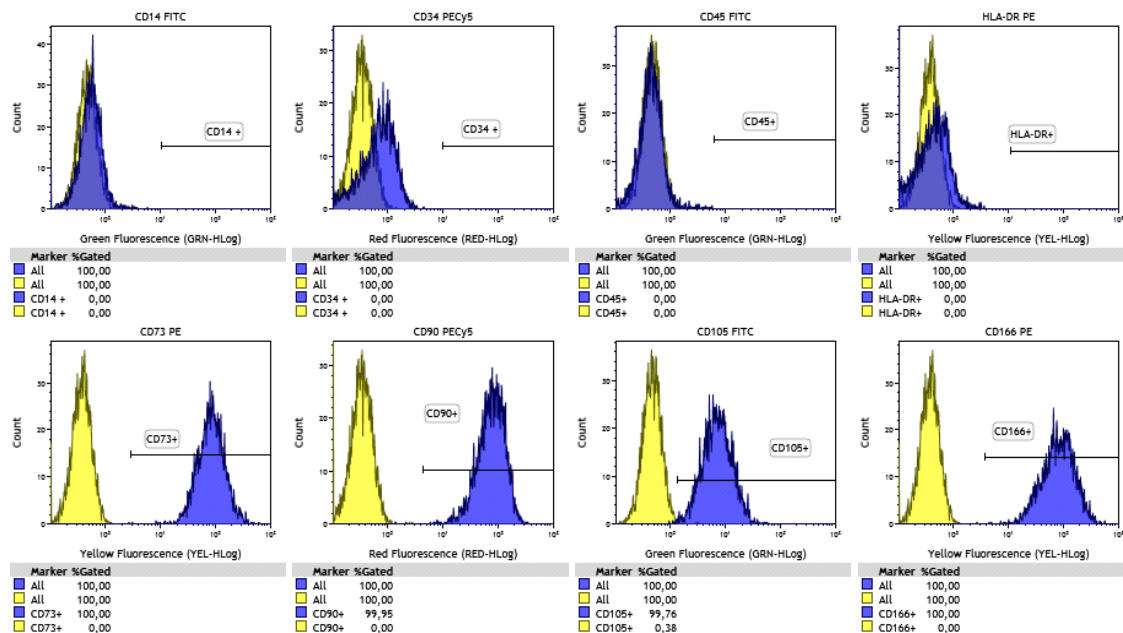


Figura 13. Ejemplo de caracterización inmunofenotípica del producto MSV®.

2. Fabricación de la matriz de fibrina

La matriz de fibrina se realiza a partir de plasma obtenido de donantes sanos anónimos del “Biobanco del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León”.

En este estudio se ha evaluado la viabilidad de las células MSV® en una matriz de fibrina o gel de plasma.

La fabricación del gel de plasma se lleva a cabo en una placa de seis pocillos y consiste en una serie de pasos que se describen a continuación y se ilustran en la Figura 14:

1. Preparación de los materiales.
2. Añadir 3 ml de plasma en cada pocillo.
3. Añadir 0.5 ml de suspensión celular con 250.000 células MSV® en medio de cultivo (DMEM 4,5 g/l de glucosa (Gibco)+ 20% FBS (Gibco) + 0.5% gentamicina (10 mg/ml Gibco))
4. Añadimos 50 µl de Amchafibrin (Mylan 100 mg/ml) a cada pocillo. El Amchafibrin es ácido tranexámico, un antifibrinolítico que evita la degradación de la matriz de fibrina.
5. Añadimos 0,5 ml de Cloruro cálcico (Braun 100 mg/ml) a cada pocillo que activa la coagulación del fibrinógeno.
6. Dejamos aproximadamente 30 min en el incubador a 37°C y 10 % CO₂ para que coagule.
7. Una vez coagulado, añadimos 3 ml de medio de cultivo cuidadosamente a cada pocillo, e incubamos a 37°C y 10% CO₂.

MATERIAL Y MÉTODOS

El medio de cultivo se cambia dos veces por semana durante 10 días, y tras cada cambio se comprobó el aspecto, la morfología y la proliferación de las células con la ayuda de un microscopio de contraste de fases.

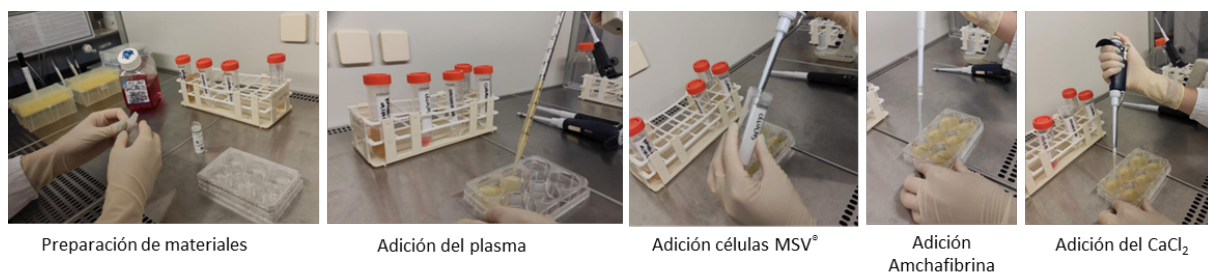


Figura 14. Elaboración de la matriz de fibrina o gel de plasma.

3. Elaboración de explantes

El cultivo por el método de explantes consiste en obtener fragmentos (explantes) de un tejido o matriz, que se siembran sobre una superficie celular adherente, con el fin de visualizar una migración y proliferación de las células incluidas en la matriz sobre la superficie del soporte. Esta técnica nos permite comprobar que las células MSV® incluidas en el gel de plasma mantienen la capacidad de proliferación y expansión tras 10 días de cultivo en la matriz de fibrina.

La preparación de los explantes consistió en una serie de pasos que se describen a continuación, y se muestran en la Figura 15:

1. Retirar por completo el medio de cultivo de cada pocillo.
2. Levantar el gel del pocillo con la ayuda de una espátula y colocarlo sobre una placa de Petri, donde se llevará a cabo la elaboración manual los explantes con la base de una punta o *tip* de pipeta automática de 1000 μ l (0.8 cm de diámetro) para obtener el fragmento de matriz de fibrina con células MSV®.
3. Colocar los explantes en una placa de seis pocillos (un explante por pocillo) en posición central equidistante.
4. Dejar en el incubador aproximadamente 30 minutos para que el explante se quede adherido a la placa.
5. Cubrir cuidadosamente con medio de cultivo añadiéndolo lentamente dejándolo resbalar por las paredes (DMEM 4.5 g/l glucosa (Gibco) + 20% FBS (Gibco) + 0.5% gentamicina (10 mg/ml Gibco)).
6. Incubar la placa con los explantes a 37°C y 10% de CO₂.

El medio de cultivo se cambia dos veces por semana y se realiza un seguimiento visual con el microscopio de contraste de fases para comprobar el crecimiento y migración celular a partir de los explantes.

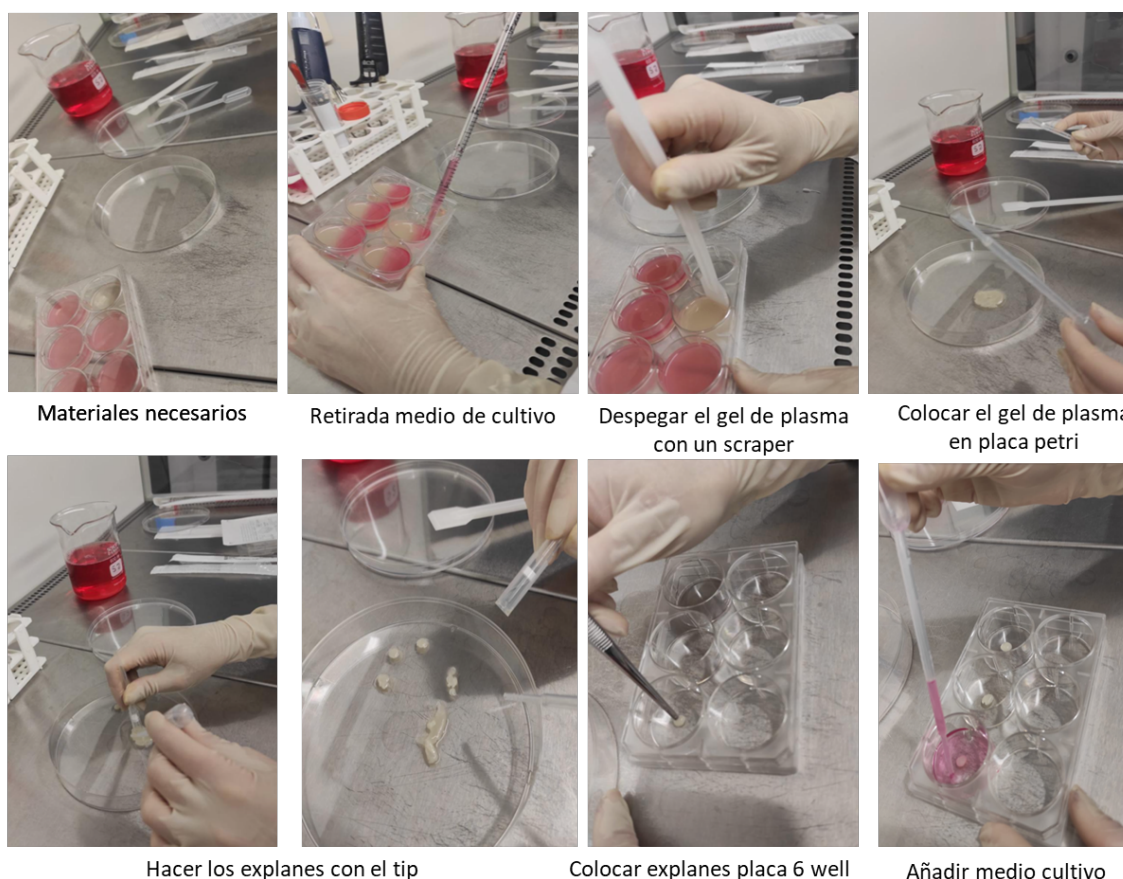


Figura 15. Elaboración de explantes.

4. Estudios de viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad y capacidad de supervivencia de las células embebidas en la matriz de fibrina, se utilizó un indicador de viabilidad por fluorescencia (FluoroQuench® One Lambda, Thermo Fisher, EEUU). Este colorante es capaz de incorporarse en el interior de las células y aportar fluorescencia verde a las células que presentan una membrana celular intacta (vivas) y rojo-naranjado a aquellas que tienen una membrana rota o dañada (muertas).

Para realizar las tinciones se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Retirar por completo el medio de cultivo del gel de fibrina.
2. Lavar con PBS (Gibco) para eliminar los restos que puedan quedar de medio de cultivo.
3. Añadir aproximadamente 2 ml de FluoroQuench®.
4. Incubar 24 horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad para que el colorante penetre en la totalidad del gel.
5. Retirar Fluoroquench®.
6. Lavar con PBS (Gibco).
7. Observar al microscopio invertido de fluorescencia, donde las células vivas se observan teñidas de color verde y las muertas de color rojo.

RESULTADOS**1. Obtención del producto MSV®**

El producto MSV® ha sido obtenido a partir de 50 ml de médula ósea diluida de tres donantes diferentes de la UPC:

- Donante E05423 se corresponde con el lote 1.
- Donante E05523 se corresponde con el lote 2.
- Donante E05623 se corresponde con el lote 3.

La Tabla 3 nos muestra las células mononucleadas (CMN) obtenidas tras el gradiente de densidad con Ficoll y la viabilidad de las mismas; así como el rendimiento obtenido en número de células tras el proceso de expansión, ya que en todos los donantes se ha sembrado la misma superficie.

	CMN		Pase 0	
	Nº Células	Viabilidad	Nº Células	Viabilidad
Lote 1	97.786.667	100%	844.800	99%
Lote 2	206.400.000	99%	4.188.000	99%
Lote 3	149.898.667	99%	2.400.000	99%

Tabla 3. CMN y Células obtenidas en P0.

Las células mesenquimales se mantuvieron en cultivo para realizar el proceso de expansión y purificación de las mismas, realizando un seguimiento con el microscopio invertido de contraste de fases. Se tomaron diferentes imágenes donde podemos comprobar que las células presentaban morfología fibroblástica a medida que se iba purificando el cultivo debido a su capacidad de adhesión al frasco de cultivo. (Figura 16)

Las células obtenidas en fase 0 se expanden durante 10 días cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días y cuando el cultivo llega a confluencia se obtienen las células mesenquimales purificadas que componen el producto de terapia avanzada MSV®.

La Tabla 4 muestra los resultados de los controles de calidad de contaje, viabilidad y número de duplicaciones de los productos MSV® obtenidos tras el proceso de expansión y purificación.

	Nº Células	Viabilidad	Duplicaciones
Lote 1	9.492.925	98%	5
Lote 2	6.987.893	99%	4
Lote 3	5.490.303	96%	3

Tabla 4. Resultados de los controles de calidad del producto MSV®

RESULTADOS

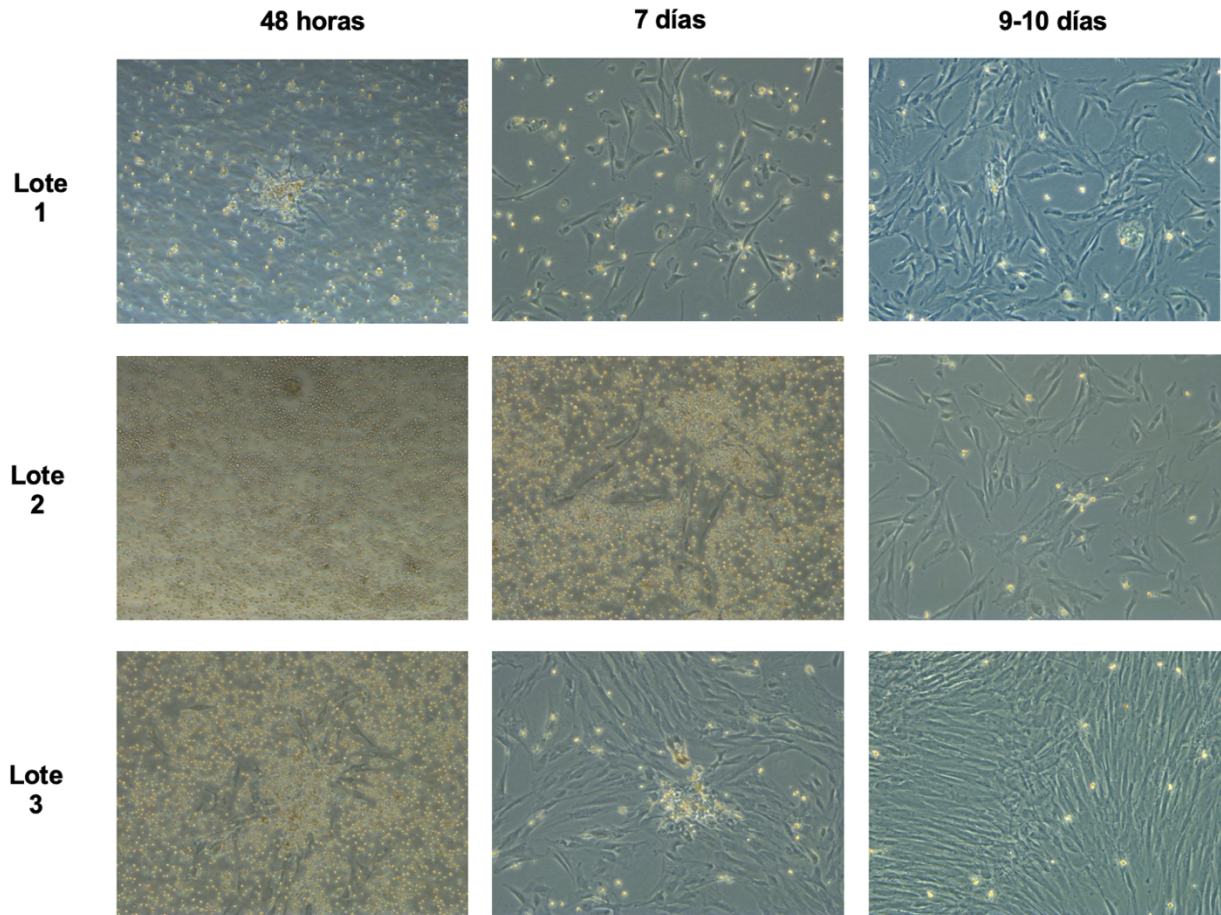
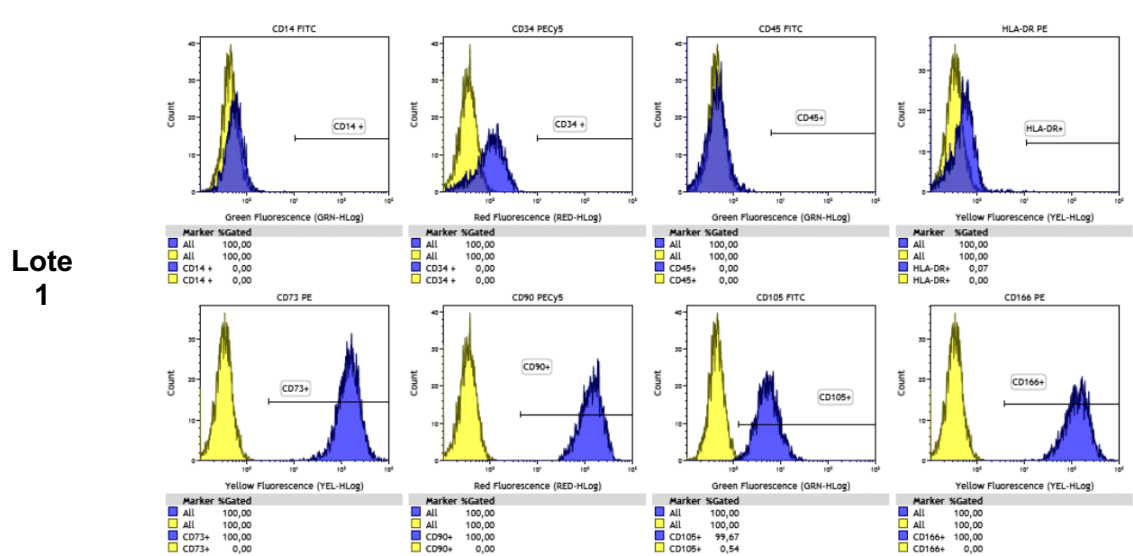


Figura 16. Imágenes tomadas de las células MSV® en cultivo con microscopio de contraste de fases (10X).

Además, a estos productos ATMP se les ha realizado un estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo que nos muestra que este producto está compuesto por células que presentan un patrón de células mesenquimales con expresión positiva de los marcadores CD73, CD90, CD105 y CD66, y ausencia de expresión de los marcadores hematopoyéticos CD14, CD34 y CD45. Las imágenes de este control se muestran en la Figura 17.



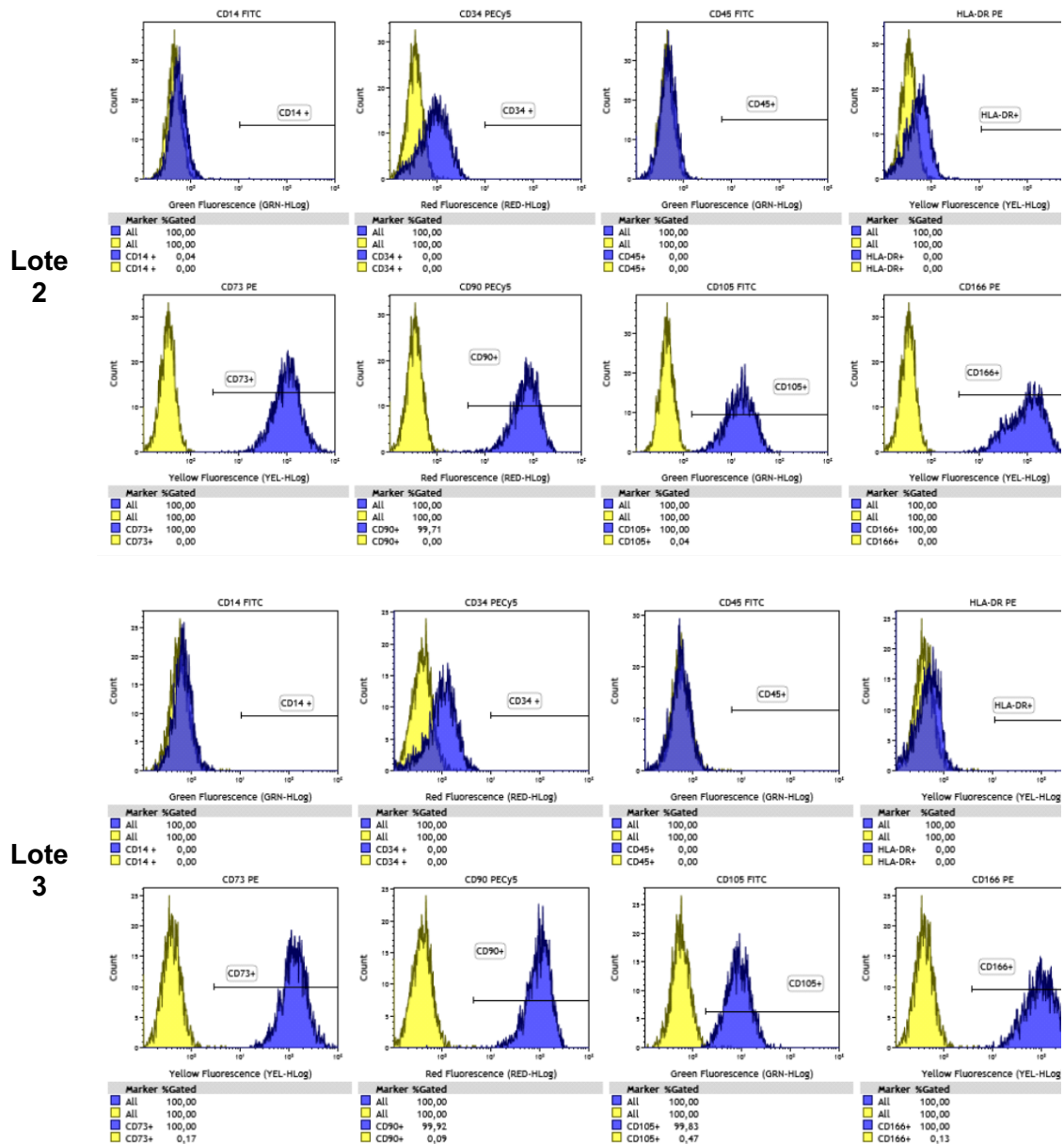


Figura 17. Estudio inmunofenotipo por citometría de flujo.

2. Fabricación del gel de plasma

Las células de los productos MSV[®] se han incluido en un gel de plasma y se han mantenido en cultivo durante 10 días cambiando el medio de cultivo dos veces a la semana. Se han realizado 12 geles por cada uno de los lotes a estudio. Durante el cultivo se realizó el seguimiento del crecimiento celular con el microscopio de contraste de fases, pero al ser un cultivo tridimensional no fue posible observar nítidamente las células, como se puede apreciar en la imagen de la Figura 18.

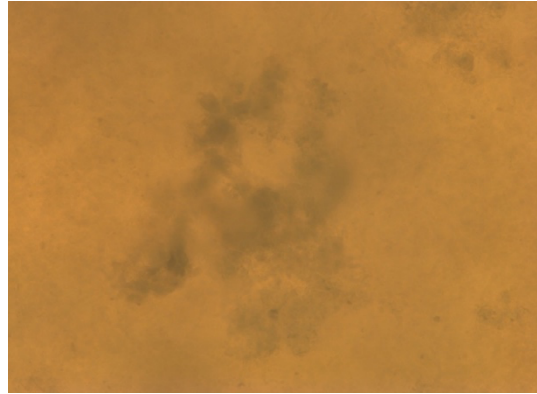
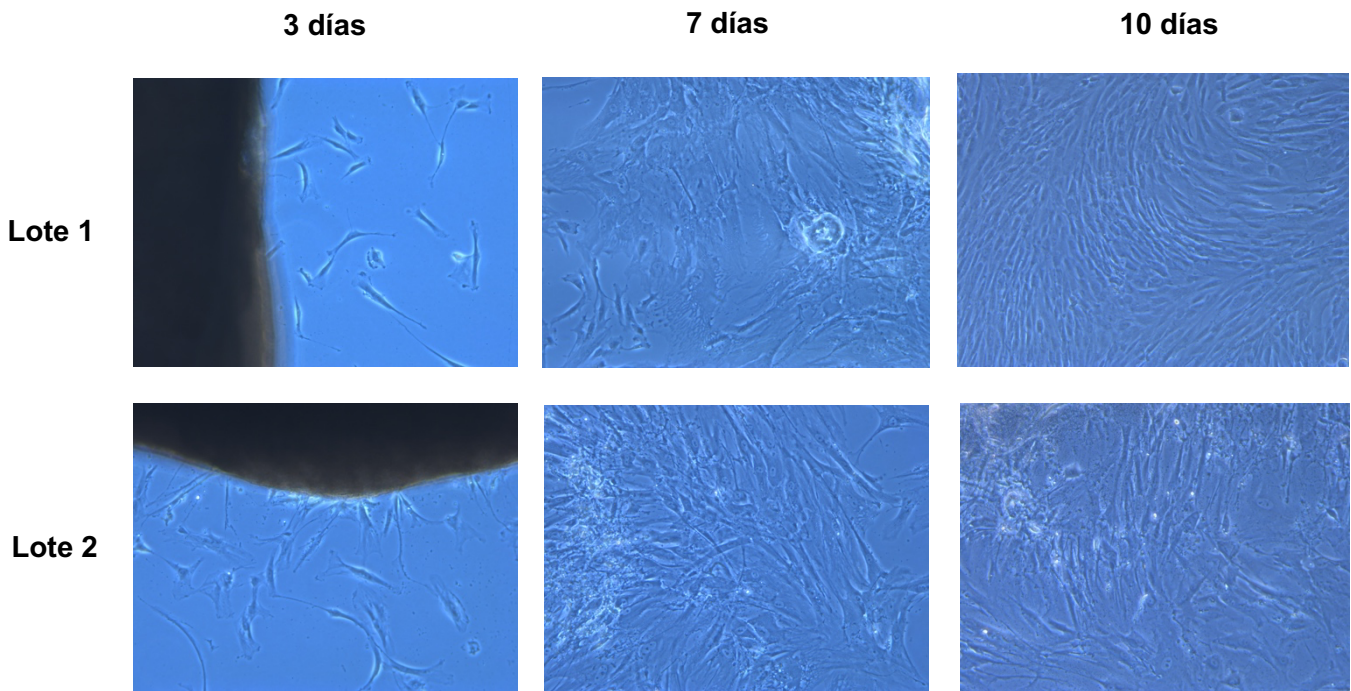


Figura 18. Imagen al microscopio del gel de plasma con células mesenquimales (10x).

3. Elaboración de explantes

A partir de los geles de plasma fabricados de cada donante, se obtuvieron diferentes explantes que se sembraron en placas de 6 pocillos. Tras varios días de cultivo, tal y como se muestra en la Figura 19, se puede observar como las células MSV[®] incluidas en la matriz de fibrina van migrando hacia el exterior partiendo del explante, Todos los lotes siguieron un crecimiento celular similar: a los 3 días de cultivo las primeras células comenzaron su proceso de expansión; a los 7 días ya era posible observar grandes nichos celulares, y a los 10 días los cultivos adquirieron un mayor porcentaje de confluencia. Asimismo, se pudo observar como las células MSV[®] conservaban su morfología fibroblástica característica de las células madre mesenquimales, así como su capacidad de adhesión a la superficie del recipiente.



Lote 3

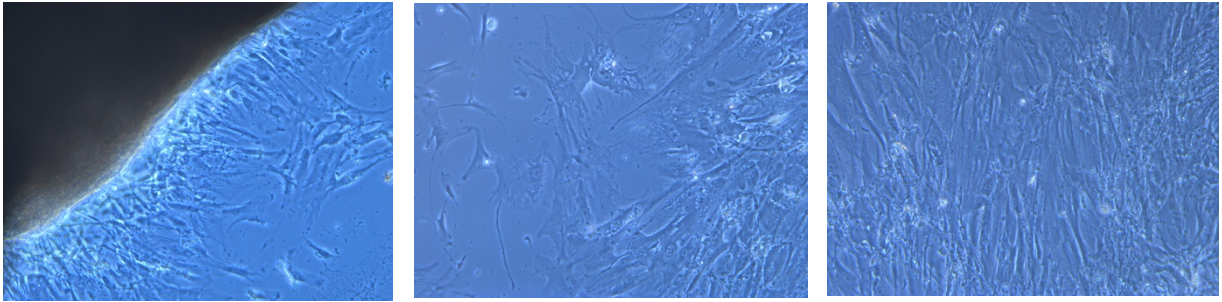


Figura 19. Imágenes de los explantes en cultivo (10x).

4. Estudio de la viabilidad de las células mesenquimales en la matriz de fibrina

Para llevar a cabo el estudio de viabilidad celular en la matriz de fibrina, se tiñeron dos geles de plasma pertenecientes a cada donante con el reactivo comercial FluoroQuench. Este colorante nos permite diferenciar las células vivas representadas en color verde, de las muertas en rojo. Los geles de plasma se visualizaron en el microscopio invertido de fluorescencia con una cámara acoplada, y se observaron los resultados que se muestran a continuación en la Figura 20, donde se puede ver un alto porcentaje de células vivas y muy pocas muertas,

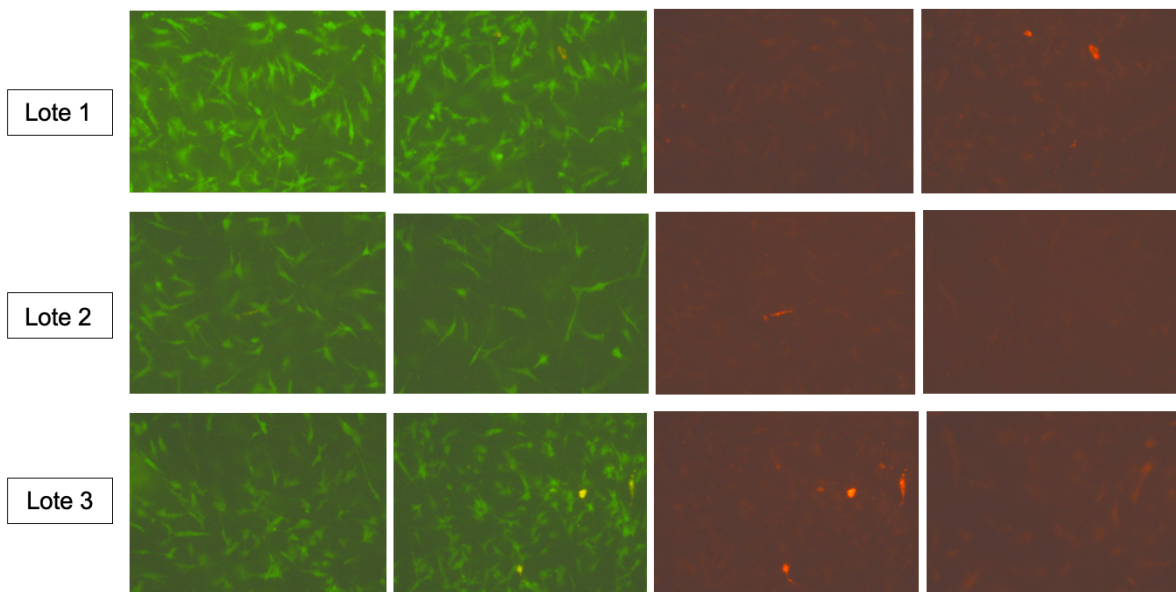


Figura 20. Imágenes de los ensayos de viabilidad celular por fluorescencia (verde: vivo; rojo: muerto) aumento 40x.

DISCUSIÓN

En este trabajo de Fin de Máster hemos logrado cumplir con éxito los objetivos que se habían marcado inicialmente, así como confirmar la hipótesis planteada en un principio. El estudio buscaba conseguir elaborar una matriz de fibrina compuesta por el producto de Terapia Avanzada MSV[®], donde éste lograrse mantener su viabilidad y supervivencia en el interior del gel con la idea de ser utilizado en futuras aplicaciones terapéuticas para la regeneración de defectos óseos abiertos.

En primer lugar, las células madre mesenquimales MSV[®] fueron obtenidas con éxito a partir de una muestra de aspirado de médula ósea de tres donantes sanos procedentes de la UPC del IBGM, siguiendo los protocolos establecidos, a excepción de la utilización de antibiótico. Estas células mononucleares fueron aisladas de las células sanguíneas por gradiente de densidad con Ficoll y mantenidas en cultivo hasta alcanzar confluencia. En un principio los cultivos presentaron distintos subtipos de células mononucleadas, destacando los monocitos y las células mesenquimales, ya que ambas tienen capacidad de adherencia al frasco de cultivo. Sin embargo, el mantenimiento del cultivo, con los diferentes cambios de medio y el proceso de expansión permitió purificar y obtener un cultivo homogéneo compuesto por células madre mesenquimales con una morfología fibroblástica y fusiforme, confirmando así la obtención del producto de terapia avanzada MSV[®] (Figura 16).

El estudio del inmunofenotipo de los tres donantes mediante citometría de flujo corroboró que nuestro producto ATMP estaba compuesto por células mesenquimales, ya que estas presentaban el patrón de marcadores específicos de células mesenquimales establecidos por la ISCT, con una expresión positiva $\geq 90\%$ en todos los donantes, para los marcadores CD166, CD105, CD73 y CD90, y una ausencia de expresión de los marcadores hematopoyéticos con una expresión $\leq 10\%$ CD34, CD45, CD14 y HLA-DR (Figura 17).

Con la fabricación de los geles de plasma buscamos elaborar un sistema de andamiaje físico que pudiese replicar *in vitro* una estructura tridimensional para permitir una regeneración tisular en el caso de defectos abiertos, y que a su vez proporcionase el ambiente necesario para que se diesen las interacciones entre las células y los componentes de la matriz, así como la adhesión, expansión, proliferación, diferenciación y maduración celular imitando el comportamiento que tendrían *in vivo*.

Mecánicamente, este proceso resultó ser un procedimiento relativamente rápido y sencillo que no supuso una excesiva complicación técnica, lo que facilitó y agilizó los experimentos. Los geles de plasma generados adquirieron con éxito el aspecto, morfología y consistencia deseados. El único inconveniente inicial fue no poder visualizar con claridad la morfología de las células embebidas en el gel por el grosor del mismo (Figura 18), aunque posteriormente si se pudieron observar gracias a la tinción por fluorescencia empleando el reactivo FluoroQuench[®] con el que fuimos capaces de confirmar la presencia de células en el interior de la matriz de fibrina. Con ayuda del microscopio invertido de fluorescencia se pudieron observar las células viables de color verde, y las células dañadas o muertas en color rojo (Figura 20). Como hemos visto en el apartado de los resultados, en los geles realizados con las células de los tres donantes, las células se mantienen viables dentro de la matriz de fibrina, ya que apenas se han detectado células de coloración roja. Este resultado nos permite concluir que las células madre que componen el ATMP MSV[®] se mantienen viables dentro del gel o matriz de fibrina.

La elaboración de los explantes se llevó a cabo a partir de los geles de plasma de cada donante. Manualmente consistió en un proceso no demasiado complejo, pero para el

que se necesita una destreza de trabajo dentro de la cabina de flujo laminar ya que, a pesar de no haber presentado los resultados, los primeros explantes realizados sufrieron una contaminación. A lo largo de los diferentes días en cultivo, se pudo observar como las células comenzaban a migrar partiendo del explante hacia el exterior y extendiéndose sobre la superficie de cultivo, tal y como se muestra en la Figura 19. Esta técnica ha permitido nuevamente confirmar la presencia de células mesenquimales dentro del gel de plasma, y además estas mantienen su capacidad de migración, expansión y adhesión al plástico, así como su característica morfología fibroblástica. A estudios futuros resultaría interesante identificar y caracterizar estas células por citometría de flujo para confirmar su identidad mesenquimal. Asimismo, podrían plantearse diferentes estudios de diferenciación para evaluar si estas células poseen la capacidad de diferenciación hacia otras líneas mesodérmicas como tejido adiposo, óseo y cartílago.

Por otro lado, resulta interesante destacar un novedoso sistema de obtención de fibrina autóloga rica en plaquetas mediante el procesamiento de 120 ml de sangre del paciente, conocido como Vivostat[®]. Aunque no ha sido utilizado en este trabajo, sí que ha sido posible emplearlo en un único ensayo en el Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid donde, a partir de sangre periférica, se han obtenido 6.3 ml de fibrina concentrada con la se realizó un gel con células mesenquimales obtenidas en el área estéril de la UPC del IBGM. Se pudo observar una migración celular, lo que nos indicó que las células se mantenían viables en el mismo conservando la capacidad de división y crecimiento. Además, con un fragmento de geles de fibrina se realizó la observación con microscopia electrónica de barrido en el servicio del Parque Científico de la UVA y se pudo observar la formación de una matriz de superficie irregular, que presenta algunos poros y no se pudieron identificar las células porque no se realizó ninguna tinción. Esto sería un trabajo pendiente que nos permitiría observar si las células se integran en la matriz de fibrina o se adhieren a la superficie por su naturaleza proteica.

En cuanto a los resultados descritos anteriormente, estos nos permiten confirmar el objetivo inicial del trabajo que consistía en elaborar una matriz o gel de plasma de fibrina que incluye en su interior el Medicamento de Terapia Avanzada MSV[®].

Aunque supone un triunfo poder recrear un biomaterial con células viables, tal y como se puede ver en las revisiones científicas realizadas, aún falta camino por recorrer, ya que todavía no existe una concordancia general en los procedimientos y evaluaciones, lo que nos indica la necesidad de fijar una estandarización unánime en las técnicas y protocolos. Pero a pesar de que replicar a la naturaleza es complicado, los avances científicos y tecnológicos más recientes indican que es posible desarrollar matrices óseas que puedan desempeñar satisfactoriamente las funciones biológicas tanto a nivel local como sistémico. Para lograrlo es necesario profundizar en la obtención de los conocimientos básicos, así como incrementar el número de ensayos clínicos y evaluaciones, y en este caso, llevar a cabo un seguimiento a largo plazo del hueso generado.(19).

Asimismo, la elaboración y obtención de matrices supone una práctica prometedora porque no resulta ser un proceso complejo, es de bajo coste y no presenta toxicidad, ya que se puede utilizar plasma como fuente de fibrina que no produce reacciones inmunogénicas (23).

Los avances en la investigación biomédica aplicada a la medicina regenerativa se han producido principalmente gracias a los nuevos conocimientos adquiridos sobre las células madre y su potencial uso terapéutico. Este ensayo nos brinda nuevos caminos para continuar investigando, optimizando y refinando este tipo de terapias para que la investigación traslacional y la medicina personalizada sean una realidad en el futuro.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Máster nos permiten concluir los siguientes puntos:

- A partir de un aspirado medular se pueden obtener células madre mesenquimales con las mismas características morfológicas e inmunofenotípicas que el producto ATMP MSV[®].
- Podemos afirmar que la matriz fabricada con un polímero natural, como es la fibrina, posee la capacidad de promover la proliferación celular por su naturaleza proteica.
- Las células madre mesenquimales que componen el ATMP MSV[®] conservan su viabilidad cuando se encuentran embebidas en el interior de la matriz de fibrina.
- Tras la elaboración de los explantes a partir de los geles de fibrina, podemos confirmar que las células madre mesenquimales que componen el ATMP MSV[®] mantienen la capacidad de crecimiento y expansión.
- La creación y obtención de matrices no se revela como un procedimiento complejo, tiene un costo reducido y carece de toxicidad, lo que las convierte en una herramienta terapéutica con un gran potencial.
- Es necesario continuar con la investigación biomédica, pero se abren nuevos horizontes para implementar el uso de matrices en defectos óseos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3–10.
2. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Reports*. 2020;16(1):3–32.
3. Neri S. Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2019 May 15 [cited 2022 Apr 17];20(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31096604>
4. Musiał-Wysocka A, Kot M, Majka M. The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Transplant [Internet]*. 2019 [cited 2022 Apr 17];28(7):801–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31018669>
5. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
6. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.
7. Friedenstein BAJ. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. 1966;16(December).
8. Arthur A, Shi S, Zannettino ACW, Fujii N, Gronthos S, Koblar SA. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells*. 2009;27(9):2229–37.
9. Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Med Clin (Barc)*. 2017 May;148(9):408–14.
10. Guadix JA, López-Beas J, Clares B, Soriano-Ruiz JL, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Principal criteria for evaluating the quality, safety and efficacy of hMSC-based products in clinical practice: Current approaches and challenges. *Pharmaceutics*. 2019;11(11).
11. Tulina MA, Pyatigorskaya N V. Specificity of Good Manufacturing Practice (GMP) for Biomedical Cell Products. *Bull Exp Biol Med*. 2018;164(4):579–82.

BIBLIOGRAFÍA

12. Barbado J, Tabera S, Sánchez A, García-Sancho J. Therapeutic potential of allogeneic mesenchymal stromal cells transplantation for lupus nephritis. *Lupus* [Internet]. 2018 Nov [cited 2022 Apr 16];27(13):2161–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30290717>
13. Redondo LM, García V, Peral B, Verrier A, Becerra J, Sánchez A, et al. Repair of maxillary cystic bone defects with mesenchymal stem cells seeded on a cross-linked serum scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* [Internet]. 2018 Feb [cited 2022 Apr 16];46(2):222–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29229365>
14. Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F, Alberca M, García V, Munar A, et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation* [Internet]. 2015 Aug [cited 2022 Apr 16];99(8):1681–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822648>
15. Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sánchez A, García-Sancho J. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation* [Internet]. 2011 Oct 15 [cited 2022 Apr 16];92(7):822–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792091>
16. Noriega DC, Ardura F, Hernández-Ramajo R, Martín-Ferrero MÁ, Sánchez-Lite I, Toribio B, et al. Intervertebral Disc Repair by Allogeneic Mesenchymal Bone Marrow Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation*. 2017 Aug;101(8):1945–51.
17. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 17];7(5):393–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236628>
18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006 [cited 2022 Apr 17];8(4):315–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
19. Martín-Piedra A, Martín-Piedra L. Scaffolds for bone tissue engineering. *Actual Medica*. 2019;104(806):36–45.
20. Llames S, García E, García V, del Río M, Larcher F, Jorcano JL, et al. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank*. 2006;7(1):47–53.
21. Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine*.

BIBLIOGRAFÍA

- 2017;12:4937–61.
22. Tur MIR, Concepción YT. Utilización de bisfosfonatos en las enfermedades de los huesos. *Rev Cuba Farm.* 2012;46(4):457–69.
 23. López-Pagán E, Pascual-Serna AC. Fibrina rica en plaquetas en la cicatrización de los tejidos periodontales. *Odontol Sanmarquina.* 2020;23(1):43–50.