



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

**TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN
HEMOTERAPIA Y BANCO DE SANGRE**

TÍTULO:

**CAPACIDAD DE LA SOLUCIÓN COCTEL Y LISADO PLAQUETARIO VERSUS
DIMETIL SULFÓXIDO Y SUERO BOVINO FETAL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE
CÉLULAS MESENQUIMALES DE CORDÓN UMBILICAL EN EL INSTITUTO DE
HEMAFÉRESIS Y TERAPIA CELULAR.**

AUTORA:

LIC.TM KAISSY MILAGROS PAREDES GUERRA

**LIMA-PERÚ
2020**

Asesor(es) de trabajo académico:

Mg. Marco Álvarez Ángeles

Mg. Jorge Luis Fernández Baldeón

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a Dios, porque ÉL permite que puedan darse todas las cosas. A mi familia por haberme cedido del tiempo que tenía para ellos y a mis asesores quienes confiaron en nuestra propuesta y nos enriquecieron con su amplia experiencia en el tema.

El presente trabajo de investigación será presentado a INNOVATE PERÚ y CONCYTEC para su financiamiento.

Declaración del autor

Declaro que el presente proyecto de tesis es de mi autoría por lo tanto cedo los derechos a la Universidad Peruana Cayetano Heredia para que pueda ser utilizada en la biblioteca como documento de lectura y consulta.

Tabla de contenido

1. RESUMEN	
2. INTRODUCCIÓN	1
3. OBJETIVOS E HIPOTESIS	3
3.1. General	3
3.2. Específicos	3
3.3. Hipótesis.....	4
4. MATERIAL Y MÉTODOS	4
4.1. Diseño del estudio	4
4.2. Población y lugar de estudio	4
4.2.1. Criterios de Inclusión:	4
4.2.2. Criterios de exclusión:.....	4
4.3. Marco muestral y muestra	5
4.4. Operacionalización de variables.....	5
4.5. Procedimientos y técnicas	6
4.6. Aspectos éticos	9
4.7. Análisis de datos.....	9
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	9
6. PRESUPUESTO	10
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
8. ANEXOS	14
Anexo 1: Consentimiento informado	14
Anexo 2: Esquema de Procedimientos y Técnicas empleadas.....	17

1. RESUMEN

El cordón umbilical humano se ha convertido en una fuente de células mesenquimales con múltiples ventajas en terapias regenerativas, por tanto, su almacenamiento eficiente mediante la criopreservación determina su adecuado uso futuro. Los crioprotectores usados contienen sustancias tóxicas y xenobióticas, por lo que su uso ha sido cuestionado. El uso del dimetil sulfoxido (DMSO), coctel de azúcares, suero bovino fetal, factores de crecimiento, lisado plaquetario, y la combinación de ellos ha mostrado variables niveles de viabilidad al momento de recuperar células criopreservadas. **Objetivo:** Evaluar la viabilidad, recuperación y proliferación celular, con solución coctel y lisado plaquetario comparado con la combinación de DMSO y suero bovino fetal. **Material y métodos:** Estudio experimental, con un muestreo no probabilístico. Un total de 20 muestras de cordón umbilical de partos del Hospital Carlos Lanfranco la Hoz, serán recolectados para proceder con el aislamiento de células madres. Luego, las células serán criopreservadas utilizando la combinación de solución coctel y lisado plaquetario, así como la combinación de DMSO y suero bovino. Las células serán almacenadas por un periodo de tres meses. Luego, las células serán descongeladas y se procederá a contabilizarlas para evaluar la recuperación celular, posteriormente se medirá la viabilidad y proliferación celular. Los parámetros serán descritos utilizando estadística descriptiva y mediante una prueba bivariada para observaciones pareadas considerando un valor de p menor a 0.05 como significativo.

Palabras clave: Cordón umbilical, Criopreservación, Crioprotectores, células mesenquimales.

2. INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (MSC) son células multipotentes adultas frecuentemente aisladas del tejido conectivo. Las MSC tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tejidos; adiposo, óseo y tejido condrocítico, además, presentan escasa inmunoreactividad y secretan factores con efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores in vivo, y participan en la regeneración de lesiones por ser inmunológicamente inmaduras. (1,2) Por tanto, las MSC poseen un notable potencial en aplicaciones terapéuticas inmunorreguladoras. (2,3) En tal sentido, su uso en diversos tratamientos regenerativos y trastornos humanos es frecuente a nivel global. (3)

Las MSC obtenidas de médula ósea son consideradas como el estándar de oro para uso clínico en adultos (4), sin embargo, la colección invasiva y el número de punciones para extraerlas representan una limitante importante. Recientemente, diversos estudios sugieren que el tejido de cordón, el cual es un residuo biomédico, es una fuente rica de MSC. (5-7)

La criopreservación tiene por objeto conservar la funcionalidad y viabilidad de las células a temperaturas bajas, durante un tiempo corto o incluso durante años. Las células criopreservadas se almacenan en nitrógeno líquido a -196°C , no existiendo fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas a dicha temperatura. Por tanto, la afección a nivel celular no se da por el almacenamiento sino por el proceso de congelación y descongelación. (8) También, una eficaz criopreservación no sólo depende de la velocidad de enfriamiento, sino del crioprotector que se elija, el cual tiene que cuidar el comportamiento físico y químico de las soluciones acuosas.

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles que se introducen en el espacio celular en un estado de sobre-enfriamiento entre los 4°C y los -10°C . Luego, favorecen que se alcance un equilibrio termodinámico entre el espacio intracelular y extracelular, seguido por un proceso lento y seguro en el cual el agua celular sale de la estructura. (8) En el proceso de descongelación, el cambio de ósmosis se produce de forma inversa al proceso de congelación, esto es, a medida que la concentración de solutos se va reduciendo progresivamente en el medio extracelular, la célula se hidrata para compensar la diferencia de concentraciones entre el exterior y el interior. (8)

Los crioprotectores se clasifican como penetrantes y no penetrantes. El dimetilsulfóxido (DMSO) es un agente no penetrante frecuentemente utilizado, el cual evita la formación de cristales de hielo que destruyen la estructura de la membrana e inhibe también la acumulación excesiva de electrolitos. (9) Los agentes crioprotectores no penetrantes actúan promoviendo la rápida deshidratación de la célula, y suelen utilizarse asociados a los agentes penetrantes. (8) La solución coctel, la cual es una mezcla de crioprotectores no penetrantes (glucosa 0,05 M, sacarosa 0,05 M) y crioprotectores intracelulares penetrantes (etilenglicol), es una combinación frecuentemente utilizada en investigación, así como en la práctica regenerativa. (8,9). Se ha informado que la criosolución con agentes no permeables como agentes permeables tiene más

ventajas que las soluciones que contienen sólo agentes permeables, ya que el efecto de protección de tejidos o células posiblemente se daría a través de un posible mecanismo sinérgico. En tal sentido, el uso de diversas combinaciones ha sido descrita como una solución que favorece la mejora de viabilidad luego de los procesos de descongelamiento. (10-15) Por otro lado, el uso de suplementos a los crioprotectores, como el suero bovino fetal (SBF) o el lisado plaquetario (LP) proporcionan nutrientes importantes y factores de crecimiento que favorecen la hemostasia, la reparación y regeneración celular. (16, 17)

Las células madre son frecuentemente criopreservadas con DMSO al 10%. (9) Sin embargo, el DMSO es tóxico para las células, y la exposición al DMSO podría causar cambios inesperados como inducir a la diferenciación. (11). Del mismo modo, la exposición al DMSO induce inestabilidad genética, por lo cual es importante eliminar el DMSO mediante lavados en los preparados celulares, así como eliminar la exposición al operador y receptor debido a posibles complicaciones médicas. (12,13)

La citotoxicidad por DMSO ha sido reducida por los lavados celulares post descongelación, no obstante, es posible que existan remanentes de DMSO en células descongeladas. Algunas investigaciones sugieren que el efecto nocivo se debe al choque frío, el cual puede ser evitado usando combinaciones con azúcares, u otros crioprotectores, de tal forma que, se ejerza un efecto sinérgico para mejorar la supervivencia celular y disminuir la toxicidad. (15) Otra limitación del protocolo de crioconservación actual es el uso del SBF y suero de ternera fetal, que, por ser sustancias altamente proteicas, siempre se acompañan de riesgo de infección o reacción alérgica en pacientes debido a su origen xenobiótico (13-17). Por lo tanto, el desarrollo de un crioprotector libre de sustancias xenobióticas y tóxicos es altamente deseable para la seguridad clínica en los receptores del trasplante.

En China, recientemente se evaluó la utilización de la trehalosa con DMSO al 2% como crioprotector, en comparación a DMSO al 10%. Los resultados post congelación sugieren que el número de células totales y la viabilidad celular fue mayor usando trehalosa y DMSO al 2%. Los autores sugieren que el uso de trehalosa favorece la supervivencia y diferenciación celular. (14) En Corea, se evaluó reemplazar el SBF como suplemento de los crioprotectores mediante la comparación de DMSO 10%, polivinilpirrolidona 10% y una solución coctel (glucosa 0.05 M, sacarosa 0.05 M y etilenglicol 1.5 M). En todos los experimentos, se observó una reducción en la viabilidad tras la eliminación completa del SBF. La solución con DMSO mostró mayor eficiencia, que la solución coctel y la polivinilpirrolidona 10%. (15)

En el trabajo desarrollado por Shivakumar y colaboradores (16), se evaluó el efecto del DMSO y solución coctel en presencia de SBF al 10%, siguiendo dos protocolos de congelación diferentes. Los experimentos sugieren que la capacidad de recuperación celular post-descongelamiento fue mayor con el uso de solución coctel y SBF. La supervivencia celular fue superior en todos los experimentos en donde la solución coctel y SBF fueron utilizados.

Un reciente estudio evaluó la aplicación del LP como alternativa al suero bovino xenogénico. En dicho estudio se evaluó el uso de diferentes combinaciones de tres agentes crioprotectores para criopreservar tejido adiposo. Los resultados sugieren que, el uso del LP con concentraciones bajas de DMSO favorece la mejora de la viabilidad celular en comparación a las combinaciones de DMSO y SBF en diferentes concentraciones. Por tanto, los autores sugieren que el LP es un candidato prometedor en reemplazo del SBF como suplemento proteico. (17)

Teniendo en cuenta, el estudio de Shivakumar y colaboradores (16), en el que se obtuvieron buenos resultados con la solución coctel pero utilizando el FSB como suplemento y el estudio de Wang CH y colaboradores (17), que sugiere que el LP es útil como suplemento nutritivo en mezcla con el DMSO a bajas concentraciones. (12) En tal sentido, la evidencia sugiere que la mezcla de la solución coctel y LP como suplemento proteico, podrían poseer las adecuadas propiedades para ser considerados como crioprotectores óptimos.

El presente estudio investigará la capacidad de criopreservación de la solución coctel con LP en comparación con el criopreservante convencional. De encontrar resultados favorables, a futuro se podría optimizar el almacenamiento de CMM, logrando así alcanzar niveles biológicos seguros para todos los productos celulares con el fin de evitar daños colaterales en los receptores trasfundidos. Por tanto, es indispensable responder la siguiente pregunta de investigación; ¿Cuál es el efecto de la solución coctel y lisado plaquetario, en comparación al uso de dimetilsulfóxido y suero bovino fetal, en tres parámetros celulares luego de la criopreservación de las células mesenquimales de cordón umbilical?

3. OBJETIVOS E HIPOTESIS

3.1. General

- Evaluar el efecto de la solución coctel y lisado plaquetario en comparación al uso de dimetilsulfóxido y suero bovino fetal en tres parámetros celulares luego de la criopreservación de células mesenquimales de cordón umbilical

3.2. Específicos

- Evaluar y comparar la viabilidad de las células mesenquimales almacenadas con solución coctel y lisado plaquetario en comparación a células almacenadas con dimetilsulfóxido y suero bovino fetal
- Evaluar y comparar la proliferación celular de las células mesenquimales almacenadas con solución coctel y lisado plaquetario en comparación a células almacenadas con dimetilsulfóxido y suero bovino fetal

- Evaluar y comparar la recuperación celular de las células mesenquimales almacenadas con solución coctel y lisado plaquetario en comparación a células almacenadas con dimetilsulfóxido y suero bovino fetal.

3.3. Hipótesis

- Ha: La solución coctel y lisado plaquetario en comparación al uso de dimetilsulfóxido y suero bovino fetal tienen un efecto positivo en la viabilidad, proliferación celular y recuperación celular luego de la criopreservación de células mesenquimales de cordón umbilical.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

El diseño del proyecto es experimental, con un diseño factorial de dos vías.

4.2. Población y lugar de estudio

Muestras de cordón umbilical que ingresan como donación al Instituto Hemoterapia y Terapia Celular, donados del centro obstétrico del Hospital Carlos Lanfranco La Hoz. Debido a la naturaleza del estudio, los resultados del experimento permitirán un mejor manejo al nivel de laboratorio de las células almacenadas. Del mismo modo, dada la naturaleza del estudio, el trabajo a nivel poblacional no es necesario. El estudio será desarrollado en los laboratorios del Instituto Hemoterapia y Terapia Celular.

4.2.1. Criterios de Inclusión:

Muestra de cordón umbilical que venga acompañada de un consentimiento informado firmado por parte de al menos uno de los progenitores del recién nacido vivo. Muestra de cordón umbilical de un recién con peso mayor o igual a 3 kilos. Muestra de cordón conservada en solución salina fisiológica al momento de su transporte. Además, la muestra de cordón deberá provenir de una madre entre 20 a 35 años de edad, con embarazo a término sea parto vaginal o cesárea, y con controles gestacionales completos y normales.

4.2.2. Criterios de exclusión:

Muestras de cordón con tamizaje de sangre de cordón reactivo a uno o más de uno de los siguientes marcadores; HIV, HTLV, HVC, Chagas, Sífilis, HBcore o HbAg. Muestra de cordón perteneciente a un recién nacido con disfunción evidente. Muestra de cordón que provenga de una madre con uno o más de uno de los siguientes exámenes con valores patológicos; hemoglobina <12 mg/dl, RPR Reactivo, HIV Reactivo o con resultados anómalos en el examen de orina.

4.3. Marco muestral y muestra

El marco muestral está conformado por los registros de partos naturales o cesáreas del departamento de Ginecología del Hospital Carlos Lanfranco la Hoz durante abril del 2021, siendo la unidad de análisis del estudio una muestra de cordón umbilical. El cálculo de tamaño de muestra para este estudio se realizó mediante la comparación de promedios y considerando la falta de observaciones independientes dado que las células obtenidas de un mismo cordón serán criopreservadas con ambas soluciones. El cálculo de tamaño de muestra considera una potencia estadística de 80% y un valor de confianza igual al 95%. Se estimó una diferencia de promedios de 0.3 y una desviación estándar de 11.6 para la viabilidad estimada para la solución coctel y una desviación estándar de 4.1 para la combinación de DMSO. Los parámetros fueron obtenidos de publicaciones previas (14-16) y considerando la falta de independencia de promedios. El tamaño de muestra final fue estimado en 13 pares. Al ser un estudio experimental, y trabajar con remanentes del cordón umbilical, este estudio propone duplicar la cantidad de experimentos con el objetivo de mejorar la potencia estadística y precisión de los estimados. De este modo, el tamaño final será de 26 pares de experimentos, los cuales provendrán de 26 muestras de cordón umbilical.

EN PUBLICACIONES PREVIAS	DMSO	SOL.COCTEL
Promedios De Viabilidad	85,6	85,3
Desviación Estándar	4,1	11,6

Debido a la existencia de un marco muestral definido y dada la programación de partos, se procederá a utilizar un muestreo sistemático considerando como número semilla el 5 e iniciando el día 1 de abril del 2021. El estudio coleccionará muestras hasta alcanzar el tamaño de muestra propuesto.

4.4. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Tipo, subtipo y escala de medición
Agente crioprotector	Medio líquido empleado para criopreservar células constituido por una serie de componentes biológicos y químicos	Uso de una combinación de soluciones que favorecen procesos posteriores al descongelamiento de las células. En este estudio se propone evaluar: a) solución coctel y lisado plaquetario, así como b) DMSO y suero bovino fetal	Solución coctel y lisado plaquetario. DMSO y suero bovino fetal	Categorica, dicotómica, nominal

Células nucleadas	Número total de células nucleadas (vivas y muertas) en una suspensión celular	Número de células totales en los cuadrantes por 104 que son registradas en la fichas de trabajo según criterios de caracterización establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia.	número de células por millón	Numérica, continua, de razón
Viabilidad	Células que se encuentran biológicamente vivas en una población celular en un momento específico del tiempo	Porcentaje de células vivas en relación al número total de células Nucleadas (vivas + muertas). Número total de células vivas / total de células por 100. Registro acorde a lo establecido por la Sociedad Internacional de Terapia.	Porcentaje	Numérica, continua, de razón
Proliferación celular	Tiempo que requieren las células para alcanzar doble población celular.	Se expresa por el tiempo de duplicación celular evaluadas en un tiempo determinado. Criterio acorde a lo establecido por la Sociedad Internacional de Terapia.	Número de horas	Numérica, continua, de razón
Recuperación celular	Células que permanecen vivas luego de someter a una población inicial de establecido células a un tratamiento	Porcentaje de células que permanecen vivas en un criovial luego de ser descongelados, en relación al número de células que había inicialmente en el criovial para ser criopreservadas. Criterio establecido por la Sociedad Internacional de Terapia celular.	Porcentaje	Numérica, continua, de razón

4.5. Procedimientos y técnicas

A. Selección de las donantes

Se realizarán las coordinaciones respectivas con el Departamento de Ginecobstetricia del Hospital Carlos Lanfranco la Hoz, para la donación de cordones umbilicales, quienes nos apoyarán

brindándonos información sobre las fechas programadas de parto. De forma articulada y consensuada, la madre y padre serán invitados a participar del estudio a través de un consentimiento informado (Anexo 1). Cualquier coordinación será tomada de forma articulada con el equipo médico y/o ginecólogo.

B. Obtención de la sangre de cordón

Inmediatamente después del nacimiento, el cordón umbilical será pinzado a 5-7 cm del ombligo. El cordón será seccionado y se esterilizará con alcohol 70% y povidona yodada. Luego, se colocará una cánula a la vena umbilical para hacer el depósito de la sangre en un tubo con EDTA de acuerdo a procedimientos previamente descritos. (16-20)

C. Recolección de cordón umbilical

De la placenta, se seccionará el cordón tratando de coleccionar la mayor parte de muestra en recipientes estériles con solución salina tamponada con 1% de penicilina, estreptomina, anfotericina B a la concentración de 250 mg/mL. El cordón será transportado al laboratorio en un tiempo máximo de 4 horas y manteniendo condiciones de esterilidad.

D. Técnica de Aislamiento mediante digestión enzimática

Se cortará el cordón aproximadamente en trozos de 2 cm y se hará lavados con PBS y antibióticos y antimicóticos. Luego, se cortará aún más éstas piezas y se agregará la enzima colagenasa tipo II en una concentración del 0.2% para digerir enzimáticamente durante 30 minutos en placas Petri a 37°C. El tejido sobrante se eliminará mediante filtración. (1, 20, 21)

E. Técnica para recuento de células antes y luego de la criopreservación

Posteriormente se realizará el recuento celular en cámara de Neubauer previa dilución 1/20 con solución de Turck. Se informará el número de células totales /mm³. La recuperación celular se calculará dividiendo la cantidad de células totales luego de la criopreservación entre el número de células totales antes de la criopreservación. (1, 20, 21)

F. Técnica para medir viabilidad celular antes y luego de la criopreservación

Después de la digestión enzimática, se mezclará la suspensión celular en partes iguales con el azul de Tripán al 0.4%. La lectura se llevará a cabo antes de los 5 minutos en cámara Neubauer y se contará el número de células vivas y muertas observándolas al microscopio óptico. (1, 20, 21)

G. Técnicas para evaluar proliferación celular antes y luego de la criopreservación

Se agrega la suspensión celular en medio α -MEM (GIBCO), enriquecido con lisado plaquetario al 10%, en flask de 25 mm² y se cultivaran a 37°C en ambiente humificado al 90% con concentración de 5% CO₂. Se realizará el conteo dos veces por semana, evaluando la mayor confluencia y se cultivarán a una concentración máxima de 10⁶ células/cm². (1,15) Una vez analizada la viabilidad celular se separarán dos fracciones de suspensiones celulares pertenecientes a un cordón, una parte será criopreservado siguiendo el protocolo convencional con DMSO al 10% con SBF y el otro grupo se criopreservará con el crioprotector modificado; cóctel y lisado plaquetario.

H. Criopreservación

El procedimiento será desarrollado de acuerdo a los procedimientos previamente descritas en las publicaciones. (15-21) La preparación de las soluciones ser dará bajo el siguiente esquema:

Crioprotector A: DMSO al 10% diluido en α MEN que contendrá SBF al 10% V/V

Crioprotector B: Solución cóctel (glucosa 0.05M, 0.05M sacarosa y etilenglicol 1,5 M en PBS), disuelto en α MEN que contendrá lisado plaquetario al 10% en V/V.

I. Obtención de lisado plaquetario

Según los métodos establecidos internacionalmente, se obtendrá plasma rico en plaquetas, realizando una centrifugación a 1500 rpm por 5 min de la sangre total obtenida, la que se dividirá luego en alícuotas de las que se hará un conteo de plaquetas. Posteriormente se someterán las alícuotas a un shock térmico, congelando a -30°C y descongelando, el proceso se repetirá por tres veces para obtención del lisado plaquetario. (17) Previo enfriamiento de las soluciones, se añadirá el crioprotector sobre la suspensión celular, obteniendo la mezcla en crioviales, en proporción de 1,8 ml (muestra) con 1 ml (crioprotector). Se colocarán los crioviales en un Mr. Frosty para su congelamiento, siguiendo el siguiente proceso; con una velocidad de 1°C/min se llevarán las muestras hasta -40°C y de -40°C a -90 °C a una velocidad de 10°C/min. Posteriormente, los crioviales serán colocados en nitrógeno líquido para alcanzar una temperatura de -196°C, donde permanecerán por tres meses.

J. Descongelación de células criopreservadas

La descongelación será rápida y será ejecutada en un baño maría a 37°C, a una velocidad >100°C / min, lavando dos veces con albúmina dextrano suplementado con lisado plaquetario al 10% y 1% de una mezcla de antibióticos. Luego, el preparado será centrifugado por 5 minutos para eliminar los crioprotectores por decantado, seguido por una resuspensión. (20)

4.6. Aspectos éticos

Este proyecto se rige por los principios y lineamientos de la Declaración de Helsinki, por tanto, se incluye en el estudio el consentimiento informado de la donación voluntaria de cordón y la obtención de tamizaje de sangre de cordón (Anexo 1). El consentimiento deberá ser firmado por uno de los padres antes del parto. Este proyecto asegura guardar la confidencialidad de los datos, así como anonimizar todo tipo de información que permita la identificación futura de los donantes. El consentimiento informado está basado en las Directrices establecidas por la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología de la UPCH.

4.7. Análisis de datos

Las variables de viabilidad, recuento de células totales nucleadas, proliferación celular y recuperación celular serán evaluadas antes y después del proceso de criopreservación. Los cambios observados serán atribuidos al afecto del crioprotector. Luego, los datos serán exportados a una base de datos para su posterior análisis estadístico. Las variables numéricas serán descritas utilizando una medida de tendencia central y de dispersión, las cuales serán reportadas de acuerdo a la naturaleza de la distribución de los datos. Los promedios pareados serán comparados utilizando una prueba de T de Student pareada con un nivel de significancia de $p < 0.05$. La información del Excel será exportada al software Stata versión 15.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	Meses							
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16
Recopilar información, redacción del proyecto	X							
Aprobación del proyecto por UPCH		X						
Desarrollo de la etapa experimental y almacenamiento en criopreservación			X	X	X			
Descongelamiento y medición de eficacia celular				X	X	X		
Análisis de datos						X		
Elaboración del informe final							X	
Publicación del artículo científico								X

6. PRESUPUESTO

TIPO	DESCRIPCIÓN	COSTO	CANTIDAD	TOTAL
RECURSO HUMANO	ASESOR PRINCIPAL	AD HONOREN	1	
	CO-ASESOR	AD HONOREN	1	
	INVESTIGADORA	AD HONOREN	1	
MATERIALES DE ESCRITORIO	*COMPUTADORA	PROPIO	1	2
	*IMPRESIONES	0.2	100	20
	*FORMATOS DE CONSENTIMIENTO DE DONACION DE TEJIDO	0.2	20	4
	*FORMATO DE CONSENTIMIENTO TAMIZAJE	0.2	20	4
	*FORMATO DE REGISTROS	0.2	80	16
MATERIAL DE TOMA DE MUESTRA	TUBOS EDTA	0.5	20	10
	**BOLSA ESTERILES RECOLECCION ACD	60	20	1800
	MANDIL ESTERIL	1	20	20
	GUANTES	1	20	20
	BISTURI, PINZAS			
	PLACAS PETRI	1	20	20
	ALGODON	3	1	3
	ALCOHOL YODOPOVIDONA	4	1	4
TRANSPORTE	*COOLER		1	
	**FRASCOS ESTERILES		20	
	**PBS (GIBCO)		500 ml	
REACTIVOS	COLAGENASA 0.2% (GIBCO)	2000		2000
	α MEN MEDIO (GIBCO)	4000		4000
	MARCADORES MEMBRANA(BD Biosciences)	1500	7	10,500
	AZUL DE TRIPTAN	20	1	20
	SUERO BOVINO FETAL 10%	2500	1	2500
	DMSO (Sigma)	3400	1	3400

	PENICILINA, ESTREPTOMICINA, FUNGIZONE (GIBCO)	60	3	180
EQUIPAMIENTO	**VORTEX			
	**BALANZA ANALITICA			
	**CENTRIFUGA			
	**MICROSCOPIO			
	**INCUBADOR(Thermo)			
	**CAMARA DE FLUJO LAMINAR			
	**CITOMETRO DE FLUJO (Life Technologies)			
	**EQUIPO DE CONGELAMIENTO PROGRAMADO (Criomed)			
	**TANQUE DE NITROGENO LIQUIDO			
MATERIALES PARA EL PROCESAMIENTO	TUBOS VIDRIO 12 x 75mm			
	FILTRO 100 µm			
	LAMINA PORTAOBJETO			
	CAMARA DE NEUWAER			
	BOLSA DE CONGELAMIENTO			
	FLASK T 25mm			
SOFTWARES	SOFTWARE STATA 1.0	acceso libre online	1	
	ZOTERO	acceso libre online	1	
TRANSPORTE		10	30	300
PRESUPUESTO TOTAL			S/	24823

*Cubierto por el Investigador principal ** Gastos cubiertos por el Instituto de Hemoterapia y Aféresis Terapéutica

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arbós A et al. Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Rev. INMUNOLOGÍA S.L.* 2013;32(1):P.3–11.
2. Weiss M, Medicetty S, Bledsoe A, Rachakatla R, Choi M, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: Preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of parkinson's disease. *Stem cell res ther.* 2006;24:P.781–92.
3. Park B, et al. Cryopreservation of human dental follicle tissue for use as a resource of autologous mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* Disponible en: : <http://dx.doi.10.1002/term.1945>
4. Saleh R, Reza H. Short review on human umbilical cord lining epithelial cells and their potential clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):P.222. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0679-y>.
5. Doan C et al. Isolation, culture and cryopreservation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *IJPAES.* 2012;2 (2),P.83-90.
6. Romanov Y, Balashova E, Volgina N, Kabaeva N, Dugina T, Sukhikh G. Isolation of multipotent mesenchymal stromal cells from cryopreserved human umbilical cord tissue. *Bull Exp Biol Med.* 2016;160(4):530–4. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3213-9>.
7. Dulugiac M, Moldovan L, Zarnescu O. Comparative studies of mesenchymal stem cells derived from different cord tissue compartments the influence of cryopreservation and growth media. *Placenta.* 2015;36(10):p.1192–203. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.08.011>.
8. E.Yu.Rogulska, Yu.A.Petrenko. Platelet lysate enhances efficiency of cryopreservation of mesenchymal stromal cells. *Problems of cryobiology and cryomedicine. Vol 24, № 2, 2014.* Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.
9. Portillo L et al. Fundamentos de criopreservación-basic points in cryopreservation. *RCOG.* 2006;57(4). Disponible en: <http://www.scielo.org.co /pdf/rcog/v57n4/v57n4a08.pdf>.
10. Torradadella M. Criopreservación celular. *Gac Méd Méx.* 2002;138(1):1-12.
11. Shivakumar S, et al. Cryopreservation of human wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells following controlled rate freezing protocol using different cryoprotectants: A comparative study. *Int J Stem Cells.* 2015.
12. Wang C, Xiao R, Cao Y, YuYin R. Evaluation of Human Platelet Lysate and Dimethyl Sulfoxide as Cryoprotectants for the Cryopreservation of human Adipose-derived stem cells. *BBRC.* 2017. Disponible en: <http://dx.doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.076>
13. E.Yu.Rogulska, Yu.A.Petrenko. Platelet lysate enhances efficiency of cryopreservation of mesenchymal stromal cells. *Problems of cryobiology and cryomedicine. Vol 24, № 2, 2014.* Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

14. Pérez B, Hernández A, Fernández D, Gonzáles I. Autologous platelet lysate and mononuclear stem cell of chronic periodontitis. Case presentation. Rev haban cienc méd. vol 16, nº 2, 2017.
15. Sánchez S. Estudio de la eficacia y seguridad de lavado de progenitores de sangre periférica criopreservados mediante un Sistema automatizado en trasplantes autólogos. Universidad de Murcia. 2013.p.74-80.
16. Iwatani M et al. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. Stem cells. 2006.24(11)pp.2549-56.
17. Windrum P, Morris T. Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation. bone marrow transplant. 2003. 31(4):p.315.
18. Chen G,et al. Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood. stem cells internat.2016;p.1-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1396783>.
19. Shivakumar S,et al. DMSO and serum-free cryopreservation of Wharton's jelly tissue isolated from human umbilical cord. J cell Biochem. 2016;117(10):2397–412. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jcb.25563>.
20. Sánchez R. Desarrollo y estandarización de un banco de sangre de cordón umbilical. Universidad Complutense de Madrid facultad de Medicina Departamento de Medicina. España.1999. P.20-111
21. Chatzistamatiou T,et al. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve wharton's jelly's mesenchymal stem cell properties: an msc banking protocol validation for the hellenic cord blood bank. Transfusion. 2014;54(12):3108–20. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/trf.12743>.

Anexo 2: Esquema de Procedimientos y Técnicas empleadas

