



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:

**RENDIMIENTO CELULAR EN EL PROCEDIMIENTO DE
AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
PROCEDENTES DE TEJIDO DE CORDÓN UMBILICAL DONADOS
AL INSTITUTO DE HEMAFÉRESIS Y TERAPIA CELULAR
(IHEMATEC)**

AUTORA:

ROSA AMELIA CORILLOCLA FLORES

LIMA – PERU

2020

Asesor(es) de trabajo académico

Mg. Marco Antonio Álvarez Ángeles

Mg. Jorge Luis Fernández Baldeón

Dedicatoria y agradecimiento

El presente trabajo lo dedico a mi familia. Del mismo modo, se agradece a todos los docentes

Financiamiento

El financiamiento se obtendrá a través de un fondo concursable del CONCYTEC.

Declaración del autor

El presente proyecto de investigación a presentar es original. Se han seguido los lineamientos respectivos para respetar la ética en investigación, y el mismo será utilizado para obtener un Título de Segunda Especialidad.

Tabla de contenidos

1. RESUMEN	
2. INTRODUCCIÓN	1
3. OBJETIVOS	6
3.1. Objetivo general	6
3.2. Objetivos específicos	6
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
4.1. Diseño del estudio	7
4.2. Población.....	7
4.2.1. Criterios de inclusión:	7
4.2.1. Criterios de exclusión.....	8
4.3. Muestra.....	8
4.4. Operacionalización de variables.....	9
4.5. Procedimientos y técnicas	11
4.6. Plan de análisis	17
4.7. Aspectos éticos.....	18
5. Cronograma	19
6. Presupuesto	20
7. Referencias bibliográficas.....	23
8. Anexos	27

8.1. Consentimiento informado.....	27
8.2. Flujograma del método de aislamiento	33
8.3. Flujograma del método de digestión celular	34
8.4. Flujograma del cultivo en α EMEN	35
8.5. Flujograma del inmunofenotipo	36
8.6. Flujograma de la diferenciación del linaje celular	37

1. RESUMEN

Antecedentes: Los últimos avances con respecto a la biología celular han permitido el desarrollo de un nuevo campo en la medicina regenerativa, dando lugar a la terapia usando células madre mesenquimales en pacientes con deficiencias de regeneración de cartílago, tejido óseo, entre otros. La falta de viabilidad y rendimiento de estas células al querer aislarlas del tejido de cordón umbilical es un problema frecuente. **Objetivo:** Evaluar el rendimiento celular en el procedimiento de aislamiento de células madre mesenquimales procedentes de tejido de cordón umbilical donado. **Material y métodos:** Estudio descriptivo de cohorte longitudinal que será desarrollado en el Instituto de Hemaféresis y Terapia Celular en Lima, Perú. Este estudio propone una serie de evaluaciones del procedimiento mediante una optimización en la digestión de tejido, el recuento y viabilidad celular, inmunotipificación por citometría de flujo, diferenciación y cultivo celular. **Plan de Análisis:** Los datos serán registrados en Excel y posteriormente analizados utilizando Stata v.15.

Palabras clave: células madre mesenquimales, tejido de cordón umbilical, rendimiento celular, aislamiento de cultivo celular

2. INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales muestran gran potencial en el campo de terapia regenerativa por su alta plasticidad y su capacidad de modular la respuesta inmune, es por ello que su uso es muy amplio y beneficioso para las terapias en pacientes con deficiencias de regeneración de tejido cartilaginoso, así como en el tratamiento de heridas, enfermedades cardiovasculares, entre muchas otras terapias, que se siguen investigando en la actualidad (1-3).

En el 2006 se publicaron criterios mínimos que deben presentar las células madre mesenquimales para poder definir las como tales (2). Las células madre mesenquimales (CMM) son células multipotentes, quiere decir que pueden dar lugar a más de un tipo de célula especializada del cuerpo, pero no a todos los tipos, es así que las CMM dan lugar a las distintas células especializadas, pudiendo diferenciarse en células cartilagosas (condrocitos), células óseas (osteoblastos) y células grasas (adipocitos) (1,2). Estas células son frecuentemente obtenidas del tejido de cordón umbilical humano (TCUH) procedente de un recién nacido (4).

El aislamiento de células es un conjunto de técnicas que permite el mantenimiento de las células 'in vitro', preservando sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas al máximo. Es posible distinguir cuatro tipos de cultivo celular; cultivo de órganos, explantes primarios, cultivo celular primario y cultivos histotípicos (5,6).

En el 2012 un grupo de investigadores de la Universidad de Mallorca de España realizaron estudio de obtención de estas CMM a partir de donaciones de TCUH, donde utilizaron un análisis comparativo de enzimas: con colagenasa al 0.075% (3horas) y la tripsina al 0.125% (3 horas) pero agregando a la tripsina en los últimos30 minutos colagenasa al 0.075%. Los investigadores reportaron alcanzar mejores parámetros utilizando la conjugación de dos enzimas; hialuronidasa 0.05% y colagenasa I 0.075% (7).

En el 2013, investigadores de Beijing China compararon tres métodos de aislamiento, encontrando que los métodos y modificaciones basadas en el uso de digestión enzimática permite mejorar el rendimiento de las CMM (8). En Tianjin China, en el 2016un grupo de investigadores indicaron que los procesos que mejoran la recuperación y rendimiento de las CMM tienen un impacto positivo en el tratamiento de enfermedades inmunes, por lo cual la estandarización de los procedimientos de extracción y expansión de las CMM es prioridad en los laboratorios de biología celular (9).

En el año 2016 en USA estudiaron el aislamiento de células en 50 muestras de tejido seccionadas; gelatina de wharton, unión del cordón cercana a la placenta y la capa externa del tejido del cordón umbilical. Los resultados obtenidos sugieren que existe un mejor rendimiento celular en la zona más cercana a la placenta humana. (10) Posteriormente, el mismo grupo evaluó el uso proceso de obtención de CMM del estroma mesenquimatoso del tejido de cordón umbilical que incluye: la zona de conexión del cordón cercana a la placenta CPJ, revestimiento externo del cordón (CL), el material gelatinoso que rodea los vasos del cordón (WJ)y a la

placenta fetal (FP). Los investigadores sugieren que la calidad y cantidad de CMM definen la tasa de proliferación, duplicación y expansión (11).

En Porto Alegre Brasil el 2018 se realizó un estudio comparativo de seis muestras con cuatro diferentes protocolos de enzimas para el aislamiento de CMM a partir de amnios, corion, placenta decidua y cordón umbilical (12). Los resultados sugieren que, el protocolo que uso únicamente colagenasa tipo I de 1mg/mL fue mejor para membrana coriónica (C-MS) y decidua placentaria (DMS); la combinación de tripsina al 0.25% (por una hora) y colagenasa II de 2mg/mL (luego de 3 horas) protocolo 2 fue mejor para cordón umbilical (UCMS); con el protocolo 3 de solo tripsina al 0.25% (20 minutos) fue menos eficiente para todas las muestras; para el protocolo 4 colagenasa II de 2mg/mL (16h) mg/ml y tripsina EDTA 0.25% (30 min) se pudo aislar UC-MS con menor tiempo de pasaje (16 días).

En Colombia, un grupo de investigadores evaluó mediante un diseño cuasi experimental las temperaturas y tiempos del procesamiento para el rendimiento celular de CMM provenientes de la gelatina de wharton del TCUH. Un total de nueve muestras fueron evaluadas a temperaturas de almacenamiento de 10°C, 22°C y 32°C, las cuales fueron evaluadas a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas. El porcentaje de pérdida aumentó conforme la temperatura aumentó. En tal sentido, la mejor preservación fue a 10°C con un tiempo máximo de 24 horas de conservación para su procesamiento (13).

El 2019, investigadores norteamericanos evaluaron un método no enzimático seguido de un proceso de congelamiento con el propósito de ahorrar

recursos (14). No obstante, este tipo de procedimientos no podrían ser ejecutados de forma local debido a que aún no tenemos implementados los bancos para este tipo de tejidos, pero si podemos iniciar con este estudio, el aislamiento y observación del crecimiento de estas CMM en laboratorio, como precedente en futuros estudios.

El aislamiento de las células madre de las fuentes perinatales como es el tejido de cordón umbilical, es una fuente importante pues no implica un procedimiento invasivo ni hay dolor ni posible morbilidad al donante. Además, la edad del donante y el estrés ambiental de las células madre adultas hace que este tipo de tejido perinatal sea el ideal para el aislamiento de CMM. Así también por el hecho que es considerado un residuo biológico, como describen muchos investigadores, es factible su obtención. La importancia de las CMM por su alto grado de diferenciación celular, plasticidad, en diferentes tejidos la regeneración tisular, regeneración en fase aguda de lesiones de tejidos, capacidad del inmunomoduladora del sistema inmune son valiosas para futuras terapias regenerativas (2).

La justificación de este estudio se fundamenta en lo expresado por múltiples investigadores; que, a pesar de los avances en la terapia regenerativa, no existe a la fecha una clara estandarización de los protocolos para un aislamiento de CMM (8, 9, 12,13). Usar en un tiempo adecuado y en cantidad adecuada la enzima en un proceso de digestión es clave para no dañar células. Por tal motivo, en este proyecto se propone evaluar distintos tiempos de uso de la enzima colagenasa tipo II al 0.2% para observar el tiempo que de un mejor rendimiento y no tener al tejido completo

de cordón umbilical mucho tiempo con la enzima evitando el daño al tejido en estudio.

Los resultados derivados del estudio propuesto podrían favorecer la mejora del rendimiento, así como el uso de una adecuada técnica basada en las normas de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). En tal sentido, el protocolo de aislamiento de CMM provenientes de tejido de cordón umbilical que proponemos para poder aislar estas células, permitirá generar evidencia local que a futuro podría ser utilizada en terapia regenerativa local de forma oportuna en pacientes que lo requieran. En nuestro país aún no se ha desarrollado en su totalidad el aislamiento de células CMM provenientes de TCUH es por ello que consideramos un aporte importante para el desarrollo de la terapia celular en nuestro país.

Razón por la que se plantea la siguiente pregunta de investigación: **¿Cuál es el rendimiento celular en el procedimiento de aislamiento de células madre mesenquimales provenientes de tejido de cordón umbilical?**

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Evaluar el rendimiento celular en aislamiento de células madre mesenquimales procedentes de tejido de cordón umbilical donados al Instituto de Hemaféresis y Terapia Celular (IHEMATEC)

3.2. Objetivos específicos

- Describir el número de células nucleadas totales obtenidas post digestión enzimática y post cultivo celular con el protocolo a desarrollar
- Evaluar los tiempos de digestión por la enzima en el tejido de cordón umbilical
- Estimar el porcentaje de viabilidad de las células madre mesenquimales obtenidas post digestión enzimática y post cultivo celular
- Describir el tiempo de crecimiento y confluencia en cultivo α -MEM con el protocolo a desarrollar
- Determinar la capacidad de diferenciación celular en las células madre aisladas de acuerdo al linaje condrogénico, adipogénico u osteogénico

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

Observacional, descriptivo de cohorte longitudinal.

4.2. Población

Muestras de cordón umbilical que ingresan como donación al Instituto Hemoterapia y Terapia Celular (IHEMATEC) durante el 2021. La unidad de análisis es un cordón umbilical donado a IHEMATEC. El marco muestral está definido por un libro de donaciones voluntarias de tejido de cordón umbilical a partir del desarrollo del proyecto de investigación.

4.2.1. Criterios de inclusión:

- Muestra de cordón umbilical acompañada de un consentimiento informado firmado por una madre entre 20 a 35 años
- Muestra de cordón umbilical proveniente de una madre con controles gestacionales completos dentro de los parámetros aceptables; hemoglobina no menor de 12.0gr/dl, hematocrito no menor de 36%, no enfermedades hemotransmisibles y ecografías normales
- Muestras sanguíneas de cordón umbilical con tamizaje (realizar exámenes de marcadores: HIV/HVC/HTLV/Chagas/Sifilis/HBcore/HBsAg).
- Muestra de cordón umbilical de recién nacido vivo, con peso mayor o igual a 3kg, conservadas a 4°C con PBS al momento de su transporte

4.2.1. Criterios de exclusión

- Muestra de cordón umbilical de embarazo a término de producto con patología congénita
- Muestra de cordón umbilical con resultados reactivos a uno o más de los siguientes marcadores; HIV, HVC, HTLV, Chagas, Sífilis o HBcore/HBsAg

4.3. Muestra

Al ser este estudio una primera iniciativa y existir limitada evidencia científica en referencia al protocolo que se propone utilizar, este proyecto propone trabajar con 20 muestras de cordón umbilical. Este hecho permitirá generar evidencia preliminar a través de un estudio piloto el cual posteriormente podrá ser mejorado en base a la información que se generará. El muestreo a utilizar estará fundamentado en un no probabilístico por conveniencia.

4.4. Operacionalización de variables

VARIABLES	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo de variable y escala de medición
Viabilidad celular post digestión	Porcentaje de células vivas (viables) después del procedimiento de digestión enzimática	Viables con la tinción 4, 8, 12 y 20 Horas n° células vivas/ total de células contadas) x 100	Porcentaje	Numérica, continua de razón
Viabilidad celular post cultivo celular	Porcentaje de Células vivas (viables) después de procedimiento cultivo	Viables con la tinción 5, 8, 10, 15 y 20 días n° células vivas/ total de células contadas) x 100	Porcentaje	Numérica, continua de razón
Recuento de células nucleadas post digestión enzimática	Número de células pos disgregación del tejido	Recuento celular observadas por microscopia a las 4, 8, 12 y 20 horas. Formula: N° células cuadrantes de esquinas x 10 ⁴	cel/mm ³	Numérica, continua de razón
Recuento de células nucleadas post cultivo celular	Número de células pos cultivo en medio enriquecido	Recuento celular observadas por microscopia invertida 5, 8, 10, 15 y 20 días. Formula: N° células cuadrantes de esquinas x 10 ⁴	cel/mm ³	Numérica, continua de razón
Adherencia celular al plástico	Capacidad celular de adherirse a un medio externo(plástico)	Células de morfología fibroblastoide adheridas al flask que no estén suspendidas	Sí / No	Catagórica, dicotómica nominal
Confluencia celular	Células ocupan todo el medio de cultivo	Observación por microscopia invertida de células que ocupan toda la superficie disponible del medio que han sido cultivadas	Porcentaje	Numérica, continua de razón

Proliferación celular	Aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular	Duplicación celular evaluadas en un tiempo determinado; registro en fichas de trabajo Medida se obtiene por fórmula: $ND = \text{Log}_{10} (N/N_0) \cdot 3.33$ $N_0 = NF / 2^{ND}$ Dónde: ND: número de duplicaciones	Número	Numérica, continua de razón
		N: número de células en el recipiente de cultivo al final del período de crecimiento. No: número de células iniciales en el recipiente de cultivo		
Inmunofenotipo	Proteínas propias de las células que se encuentran en su superficie	Determinado por citometría de flujo para diversos marcadores	CD73 CD90, CD105, CD45, CD34, oHLADR II	Categórica, politómica nominal
Diferenciación de línea celular	Las células cambian su característica aun tipo celular especializado	Determinada por coloración y observación al microscopio. Se utilizarán diversas coloraciones; Coloración Oil red O, Coloración Azul de toluidin, y Coloración Rojo de alizarina	Adipogénesis, condrogénesis o osteogénesis	Categórica, politómica nominal

4.5. Procedimientos y técnicas

El aislamiento de células madre mesenquimales (CMM) será desarrollado a partir del tejido de cordón umbilical humano (TCUH) donado a IHEMATEC. Previo al proceso de aislamiento, se realizará una serie de procedimientos, los cuales incluyen; obtención de un

consentimiento informado (Anexo N°01), obtención de muestra de TCUH,

inmunoquimioluminiscencia para marcadores serológicos, técnica de digestión enzimática, técnica para recuento de células, técnica para medir viabilidad celular, técnicas para el inmunofenotipo y técnicas para cultivo celular que incluyen diferenciación en linaje celular.

En los anexos del 2 al 6 se describen los procesos del laboratorio de forma detallada.

Selección de las donantes

Este paso será coordinado con el Departamento de gineco-obstetricia del Hospital Carlos Lanfranco la Hoz. De forma articulada, la institución permitirá la aplicación del consentimiento informado y el espacio y tiempo para explicar a los padres los procesos relacionados a este estudio. La conformidad será dada por escrito (Anexo N°01).

Recolección de sangre cordón umbilical

Se realizará inmediatamente después de la expulsión del neonato, cuando la placenta este dentro del útero. Este proceso será realizado por profesionales capacitados en el proceso de acuerdo a pasos previamente descritos y estandarizados. (14) La muestra será transportada a una temperatura constante de

4°C +/-0.5 en un conservador marca Thermo al laboratorio, no superando un tiempo máximo de 4 horas de transporte.

Recolección de cordón umbilical

Ya recolectada la sangre, se recolectará la placenta para recolectar la mayor parte del tejido cordón umbilical humano (TCUH). El material será separado de la placenta en un frasco estéril con PBS marca GIBCO® PBS, luego, será trasladado a 4°C +/-0.5 en un lapso no mayor a 4 horas al laboratorio.

Tamizaje de marcadores serológicos

La muestra de sangre de cordón umbilical será procesada para obtener plasma, el cual posteriormente será tamizado por inmunoquimioluminiscencia en un equipo cobas E 411–Rack para los siguientes marcadores; HIV, HVC, HTLV, Chagas, Sífilis, HBcore y HBsAg. Los resultados serán recolectados y usados de acuerdo a los criterios de selección propuestos en este estudio.

Técnica de digestión enzimática

Para este proceso se usará el tejido completo. Se eliminarán los restos de sangre del cordón lavándolos con buffer fosfato salino estéril (PBS). Mediante el agregado de enzima colagenasa tipo II en una concentración del 0.2% marca GIBCO® al TCUH el cual se cortará en secciones de 2 cm, las dejaremos digerir durante 20 horas en placas petri a 37°C con una leve agitación, las cuales se irán observando en diferentes horas (h): cuatro, ocho, doce y veinte h. El tejido sobrante se eliminará mediante filtración con un filtro de poro de 100 µm. Centrifugamos a

1500 rpm durante 15 minutos, obtenemos el pellet y lo llevamos a la siguiente técnica (7, 13).

Técnica para recuento de células

Después de la digestión con la enzima durante tiempos distintos, se procederá al recuento celular, la suspensión celular se llevará a una dilución 1/20 con reactivo de Turk, la lectura se realizará en los cuadrantes respectivos para lectura de leucocitos (cuatro cuadrantes externos) en cámara hemocitométrica Neubauer marca Brand llevando a microscopio marca Olympus. Fórmula: $R_{cto.cel} \text{ ml} = \text{promedio del número de células en área de blancos} \times 10^4$. Primero se realizará el recuento en 4 horas de digerida con la enzima, luego a las 8, 12, y 20 h. Se registrarán los resultados donde se evaluará en que tiempo a ocurrido mejor la digestión con la enzima colagenasa tipo II al 0.2% (13).

Técnica para medir viabilidad celular

Para observar la viabilidad de las CMM se teñirán con un colorante vital Azul de Tripán al 0.4% marca GIBCO®, tripsinizar el frasco que contienen las células, obtener la suspensión celular, mezclar esa suspensión en partes iguales con el colorante Azul de Tripán, se mezclará la muestra por inversión y se espera a temperatura ambiente por 1 minuto (máximo 5 minutos). Llevarlas a una cámara Neubauer y contar el número de células vivas y muertas observándolas al microscopio marca Olympus. Las células muertas se teñirán de un color celeste y

se ven deformes, mientras que las vivas mantienen su estructura. Este proceso se ejecutará a las 4, 8, 12, y 20 h. Se evaluará el porcentaje de viabilidad en las diferentes horas. Se procederá con la siguiente fórmula: %viabilidad: n° células vivas/ total de células contadas) x 100 (13).

Técnicas para cultivo

Una vez que se procede a observar la viabilidad de las células, se procederá al cultivo en medio α -MEM marca GIBCO® que es un medio que contiene antibiótico-antimicótico, en flask (frascos) de 25mm² se agrega el cultivo fresco y se cultivarán a una temperatura de 37°C ambiente humedad de 90% con concentración de CO₂ al 5% también el medio se enriquecerá con SBF al 10% y AA al 1%. (7).El cultivo se observará a los 5, 8, 10 y 15 y 20 días (d), donde se determinará la mayor confluencia celular, la confluencia será observada en microscopio invertido de contraste de fase marca Olympus I X50, observando la morfología celular (células fibroblastoides) y la adherencia al plástico (células adheridas al fondo del flask), cultivándose a una concentración máxima de 10⁶ células /cm² en los flask. Se realizarán pasajes cada dos veces por semana hasta alcanzar la mayor confluencia, se considerará más del 80%. Para evaluar la proliferación celular de CMM en cultivo se procederá con la siguiente fórmula: $ND = \text{Log}_{10} (N/N_0)$. $3.33 N_0 = NF / 2 ND$ Dónde: ND: número de duplicaciones en lapso de tiempo considerado. N: número de células en el recipiente de cultivo al final del período de crecimiento. N₀: número de células iniciales en el recipiente de cultivo. Se realizarán las técnicas de recuento celular y viabilidad celular post

cultivo explicadas anteriormente, y los cultivos con mayor rendimiento serán llevados para su inmunotipificación y a diferenciación de linaje celular (7).

Técnicas para el inmunofenotipo

Con anticuerpos (Ac) adecuados para la diferenciación de las CMM en Citómetro de Flujo marca LabTecnologics. Después del aislamiento de células, debemos identificarlas si son propiamente CMM, deberán identificarse a través de marcadores de membrana usando citometría de flujo donde: Positivo igual o más al 98% para CD73, CD90, CD105; Negativos en igual o menos al 2% CD45, CD34, HLA-DR II, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 con FITC y láser azul. Se dispensarán 50ul de muestra de células re-suspendidas más 10 ul de Ac del pool positivo y en otra muestra con el pool negativo a oscuridad en temperatura ambiente por un periodo de 20 minutos, se lavarán con PBS a 2500rpm por 7 minutos y se procederá a la lectura en citómetro de flujo LabTecnologics. Los resultados de citometría de flujo tendrán un archivo de resultados en programa de software con un tipo de formato de archivo fics, propio del citómetro LabTecnologics (13).

Técnicas para la diferenciación de línea celular

Se tendrá como control negativo los cultivos en medio α -MEM. Las células aisladas con un 80% de confluencia serán cultivadas, se tripsiniza y se lava con

PBS; pero para diferenciación condrogénica se obtendrá un paso más que es por centrifugación 2.5×10^5 células a 3000 rpm durante 10 minutos una monocapa para llevarla al medio diferencial condrogénico (20 ng de TGF β 1, más 10 ng de insulina, 100 nm dexametasona y 100 μ M) se dejará durante tres semanas realizando pases (subcultivos) cada tres días, se fijarán las células en paraformaldehído al 4% por 30 minutos en cada pocillo y se realizará la coloración con Azul de Toluidona al 1% y ácido reactivo de Schiff (Thermo Scientific). La diferenciación osteogénica se realizará con medio osteogénico de contenido 0.1M dexametasona con 10 mM β -glicerfosfato y 50nM de ascorbato-fosfato se esperará tres semanas en cultivo realizando los respectivos pases, se fijarán y se teñirán con rojo de alizarina (Sigma) y tinción de von Kossa (Thermo Scientific) donde se visualizarán deposiciones de calcio. En caso de la diferenciación adipogénica el medio adipogénico que se utilizará contiene isobutil-metilxantina 0.5 μ M con dexametasona 1 μ M, insulina 10 μ M e indometacina 200 μ M , se realizarán los pases cada tres días durante las tres semanas de cultivo luego se fijarán y se teñirán con Oil red O (Sigma) para detectar gotas de lípidos (10, 11).

4.6. Plan de análisis

Todas las técnicas descritas permitirán evaluar el protocolo de aislamiento de CMM teniendo en cuenta las tres características mínimas que tiene que cumplir según lo establecido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT); adherencia celular al plástico, la inmunotipificación propia mediante citometría de flujo CD73, CD90 y CD105, y que se dividan en tres linajes células condrocitos, adipocitos y osteoblastos (2, 13-26).

Los datos de las fichas de recolección de resultados de rendimiento celular por digestión, cultivo e inmunofenotipo post cultivo será ingresados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel v. 2016, para el análisis de datos se empleará el programa estadístico Stata v.15. Las variables categóricas como adherencia al plástico, inmunofenotipo, diferenciación celular y cultivos se expresarán a través de la frecuencia absoluta y porcentaje, además se realizarán gráficos de torta y en barra. Las variables numéricas como viabilidad celular post digestión, viabilidad celular post cultivo, número de células nucleadas post digestión, número de células nucleadas post cultivo, confluencia celular y proliferación celular serán descritas usando una medida de tendencia central y de dispersión según la distribución de sus datos.

4.7. Aspectos éticos

El presente protocolo será presentado a la Facultad de Medicina y a la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), y al Comité de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para su evaluación y aprobación. Este proyecto propone recolectar consentimientos informados de los padres que donarán los cordones umbilicales al momento del parto. Este proyecto se rige a los principios y lineamientos de la Declaración de Helsinki y a cualquier otro principio ético para investigación médica en seres humanos. El consentimiento informado está basado en las directrices establecidas por la DUICT de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

5. Cronograma

ACTIVIDAD	Meses									
	1 - 2	3 - 4	5 - 6	7 - 8	9 - 10	11 - 12	13 - 14	15 - 16	17 - 18	19 - 20
Búsqueda bibliográfica.										
Elaboración de proyecto.										
Presentación y aprobación del proyecto a la Universidad Peruana Cayetano Heredia										
Recolección de muestras y procesamiento en el laboratorio										
Análisis de datos										
Elaboración del informe										
Elaboración y publicación del artículo científico de la tesis.										

6. Presupuesto

	<u>COSTO POR UNIDAD</u>	<u>CANTIDAD</u>	<u>COSTO GLOBAL</u>	<u>OBSERVACIONES</u>
RECURSOS HUMANOS:				
ASESOR PRINCIPAL	AD HONOREN	1	---	
CO-ASESOR	AD HONOREN	1	---	
INVESTIGADORA	AD HONOREN	1	---	
TOTAL	---	3	---	
MATERIALES:				
DE ESCRITORIO				
COMPUTADORA	DEL INSTITUTO	1	---	
FORMATOS DE CONSENTIMINETO DE DONACION DE TEJIDO/ FORMATO DE CONSENTIMIENTO TAMIZAJE	0.30	25	7.50	
FORMATO DE FICHAS DE REGISTROS DATOS	0.10	25	2.50	
LAPICEROS/LÁPICES/ PLUMONES/ MARCADORES INDELEBLES	DEL INSTITUTO	1	---	
TOTAL	0.40		10.00	
DE TOMA DE MUESTRA				
TUBOS EDTA	2.00	25	50.00	
BOLSA ESTERILES RECOLECCION ACD	35.00	25	875.00	
FRASCOS ESTERILES	20.00	25	500.00	
ALCOHOL YODOPOVIDONA	5.00	1	5.00	
ALGODON	0.50	1	0.50	
MANDIL ESTERIL	2.00	10	20.00	
GUANTES	0.50	100	50.00	
BISTURI	1.00	50	50.00	
JERINGAS 20 ml	0.20	30	6.00	
TRANSPORTADOR 4°C	50.00	1	50.00	
TOTAL	116.20		1.606.50	
INSUMOS/ MATERIALES DE LABORATORIO				
TUBOS VIDRIO 12 x 75mm	0.50	100	50.00	
PINZA	1.00	2	2.00	
TIJERAS QUIRURGICAS	10.00	2	20.00	

FLASK T 25mm	10.00	25	250.00	
LAMINA PORTAOBJETO	0.20	100	20.00	
FILTRO 100 µm	20.0	30	60.00	
PLACAS PETRI	1.00	30	30.00	
PISCETAS	2.00	3	6.00	
PARAFLIM	40.00	1	40.00	
PUNTERAS 0.1-100uL	30.00	1	30.00	
CRIOVIALES	80.00	1	80.00	

TOTAL	194.70		588.00	
REACTIVOS/ SOLUCIONES/ MARCADORES				
TAMIZAJE 07 MARCADORES	500.00	25	12.500.00	CONVENIO CON INSTITUTO
ENZIMA COLAGENASA 0.2%	2.000.00	1	2.000.00	
ENZIMA TRIPSINA	2.000.00	1	2.000.00	
PBS + Atb	200.00	1	200.00	
TURK	25.00	1	25.00	
AZUL DE TRIPTAN	25.00	1	25.00	
MEDIO DE CULTIVO α-MEM (SUERO BOVINO FETAL10% AA 1%)	500.00	1	500.00	
POOL DE AC: CD73, CD90, CD105(para50 tets)	4.000.00	1	4.000.00	
POOL DE AC: CD45, CD34, HLA- DR, CD14 o CD11b, CD79a o CD19(para50 tets)	4.000.00	1	4.000.00	
KIT DIFERENCIACION CELULAR TRES LINAJES	10.000.00	1	10.000.00	
DILUYENTE DE MUESTRA PARA CMM	100.00	1	100.00	
TOTAL	23.350.00		35.350.00	
INSTRUMENTOS/EQUIP OS DE LABORATORIO				
CRONOMETRO	2.00	1	2.00	
CONTOMETRO	7.00	1	7.00	
MATRAZ ERLLENMEYER	10.00	5	50.00	
MATRAZ KITASATO	10.00	5	50.00	
BALANZA ANALITICA	DEL INSTITUTO	1	---	
VORTEX	DEL INSTITUTO	1	320.00	
CAMARA DE NEUWAER	10.00	1	10.00	

MICROPIPETAS	80.00	3	240	
CENTRIFUGA	DEL INSTITUTO		---	
MICROSCOPIO BINOCULAR	DEL INSTITUTO	1	---	
CAMARA DE FLUJO LAMINAR	DEL INSTITUTO	1	---	
MICROSCOPIO INVERTIDO	DEL INSTITUTO	1	---	
CITOMETRO DE FLUJO / SOFTWARE	DEL INSTITUTO	1	---	
CONSERVADOR 4 – 10°C	DEL INSTITUTO	1	---	
INCUBADOR	DEL INSTITUTO	1	---	
EQUIPO INMUNOQUIMIOLUMINISCEN CIACOBAS E 411-RACK	DEL INSTITUTO	1	---	CONVENIO CON INSTITUTO
TOTAL	119.00		679.00	
PROGRAMA ESTADISTICO				
PROGRAMA Stata/ Epidat	ACCESO LIBRE	1	---	
TOTAL	----		---	
MOVILIDAD				
TRANSPORTE DE MUESTRAS	100.00	1	100.00	
MOVILIDAD DE PERSONAL	50.00	1	50.00	
TOTAL	150.00		150.00	
OTROS GASTOS	100.00		100.00	
TOTAL INVERSIÓN	S/.24.030.30		S/.37.895.60	

7. Referencias bibliográficas

1. Shugar R, Chirieleison S, Wescoe K, Schmidt BT, Askew Y, Nance J, et al. Alta Cosecha de rendimiento, alta expansión y fenotipos. Estabilidad de las células estromalesmesenquimales CD146 de tejido de cordón umbilical humano primitivo completo. Journal medica Biotechnology [Internet] 2009 [citado el 20 junio 2019] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2796378/>
2. Dominici M, Le Blanc K, Muller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause DS, et al. Criterios mínimos para definir células estromalesmesenquimalesmultipotentes. Declaración de posición de la Sociedadinternacional para la Terapia Celular.Cytherapy [Internet] 2006[citado el 10 abril 2019] 8(4): 315-317. Disponible en: https://cdn.ymaws.com/isctglobal.org/resource/resmgr/CommunityResources/I_SCT_MS_CpositionPaper.pdf
3. Ceron W, Lozada-Equena I, Ventocilla K, Jara S, Pinto M, Cabello M, et al. Células tronco mesenquimales: definiciones, cultivo y aplicaciones potenciales. Revista Peruana de Medicina Experimental [Internet]. 2016 [citado el 03 abril 2019]; 33 (4): 1726-4639. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S17264634201600400022
4. Ihematec.com [Internet]. Perú: Copyright; 2000 [fecha de última actualización mayo2019; citado el 01 junio 2019]. Disponible en: <https://ihematec.com/sangre-y-otejido-del-cordon-umbilical/>
5. Beltrán N, González CH. Técnicas de cultivos celulares [Internet] México D.F: ISBN; 2016 [fecha de última actualización abril 2019; citado el 03 junio 2019]; Disponible en: http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/15Tecnicas_de_Cultivos_Celulares_e_In_genieria_de_Tejidos.pdf
6. Bioquímica diagnóstica BQD Blog [Internet] 2018junio[citado el 05 julio 2019]Disponible en: http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf
7. Arbós A, Nicolau F, Quetglas M, Ramis J, Monjo M, Muncunill J, et al, Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. [Internet] Mallorca España 2013[citado el 05 abril 2019] Disponible en:

http://www.fbstib.org/media/upload/pdf/obtencion-de-celulas-madre-mesenquimales-apartir-de-cordones-umbilicales-procedentes-de-un-programa-altruista-de-donacion-desangre-de_editora_9_30_1.pdf

8. Yan-Fu Han, RanTo, Tian-JuSunJia-KeChai, Guang-Chu, JianLu. Optimización del aislamiento de células madre mesenquimales del cordón umbilical y métodos de cultivo. Revista Citoterapia. [Internet]. 2013[citado el mayo 2019]; 65 (5): 819-827. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967601/#CR17>
9. Zaho Q, Ren H, Han Z. Células madre mesenquimales: capacidad inmunomoduladora y potencial clínico en enfermedades inmunes. Rev. InmunoTerapCel [Internet]. 2016 [citado el 29 junio 2019]; 2(1): 3-20 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352177515000047>
10. Beeravolu N, Khan I, McKee C, Dinda S, Thibodeou B, Wilson G, et al. Aislamiento y análisis comparativo de células madre / progenitoras potenciales de diferentes regiones del cordón umbilical humano. JournalElSevier[Internet]. 2016[citado el 27 mayo 2019]; 16(3):696-711.Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506116300216>
11. Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikael S, Brown C, Perez-Cruet M, et al. Aislamiento y caracterización de células estromalesmesenquimales de cordón umbilical humano y placenta fetal. Journal Vis Exp[Internet]. 2017[citado el 15 junio 2019]; (122): 55224. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5564456/>
12. Araujo A, Furlan J, Salton G, Schmalfudd t, RohsigL,Silla L, et al. Aislamiento de células madre mesenquimales humanas a partir de amnios, corion, placenta decidua y cordón umbilical: comparación de cuatro protocolos enzimáticos.. PubMed[Internet]. 2018[citado el 15 junio 2019]; 40 (6): 989-998. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29619744>
13. Duarte J, Muñoz N, Alva J, Riveros A, Franco D, Ávila L. Temperatura y tiempo preprocesamiento: factores esenciales para el rendimiento celular proveniente de la gelatina de wharton. Revista Médica Universidad de Veracruz. [Internet]. 2018[citado el 20 junio 2019]; 18 (2): 7-24. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2018/muv182b.pd>
14. Raileanu V, Whiteley J, Chow T, Kollara A, Mohamed A, Keating A, et al. Banca células estromalesmesenquimales del tejido del cordón umbilical: El

- Análisis De Gran Tamaño De Muestra Revela Consistencia Entre Los Donantes [Internet]. 2019 [citado el 30 junio 2019]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31219684>
15. Jin-Yang Cheng, Xiao-Zhou Mou, Xiao-Chun Du, Charlie Chiang. Análisis comparativo de las características biológicas de células madre mesenquimales adultas con diferentes orígenes tisulares. Revista Asiática Medicina Tropical [Internet]: 2015[citado el 10 junio 2019]. 8 (9):739-746. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764515000991>
16. Flores–Figuroa E, Montesinos J, Mayani H. Células madre mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. [Internet] México 2006 [citado el 05 junio 2019] 58(5) Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003483762006000500011
17. Gimovsky M, Tejero ER, Sepúlveda W. Arteria Umbilical [Internet]. 2019 [citado el 30 junio 2019] Disponible en: https://www.uptodate.com/contents/single-umbilicalartery?search=meseenchymal%20stem%20cells%20woven%20umbilical%20cord&source=search_result&selectedTitle=11~150&usage_type=default&display_rank=11#H8000234
18. Arevalo J, Paéz D, Rodríguez V, Células madre mesenquimales. Características biológicas y aplicaciones clínicas. Rev. Nova[Internet].2007 [citado el 15 abril 2019]; 5(8) 101-212. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/259673876_Celulas_madre_mesenquimales_caracteristicas_biologicas_y_aplicaciones_clinicas
19. Pimentel G, Murcia B. Células madre una nueva alternativa médica Rev. Perinatología [Internet].2017 [citado el 11 abril 2019]; 31(1): 128-33. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187533717300560>
20. Dabrowski F, Burdzinska A, Kulesza A, Chlebus M, Kaleta B, Borysoswky J, et al. Las células madre mesenquimales de la membrana amniótica humana y el cordón umbilical pueden disminuir la respuesta inmunológica en un modelo de aloinjerto in vitro PMed [Internet].2017 [citado el 22 abril 2019]; 82(3): 267-275. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27627653>

21. Goyal A, Sen A, Ta M. Aislamiento y caracterización molecular de células progenitoras del cordón umbilical humano. [Internet]. 2029 Nueva York. Joglekar M., Hardikar A. editores. Células progenitoras: métodos y protocolos, métodos en biología molecular 2019 [fecha de última actualización 15 julio 2019; citado el 30 julio 2019]. Disponible en:
https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-9631-5_1

22. Hidalgo JR, Hernández A, Chachques J, Paredes A. Células madre mesenquimales de médula ósea y cordón umbilical en el tratamiento de Enfermedades Cardiovasculares RevSciELO [Internet]. 2018 [citado el 18 abril 2019]; 10(1): [aprox 5p]. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2078-71702018000100007

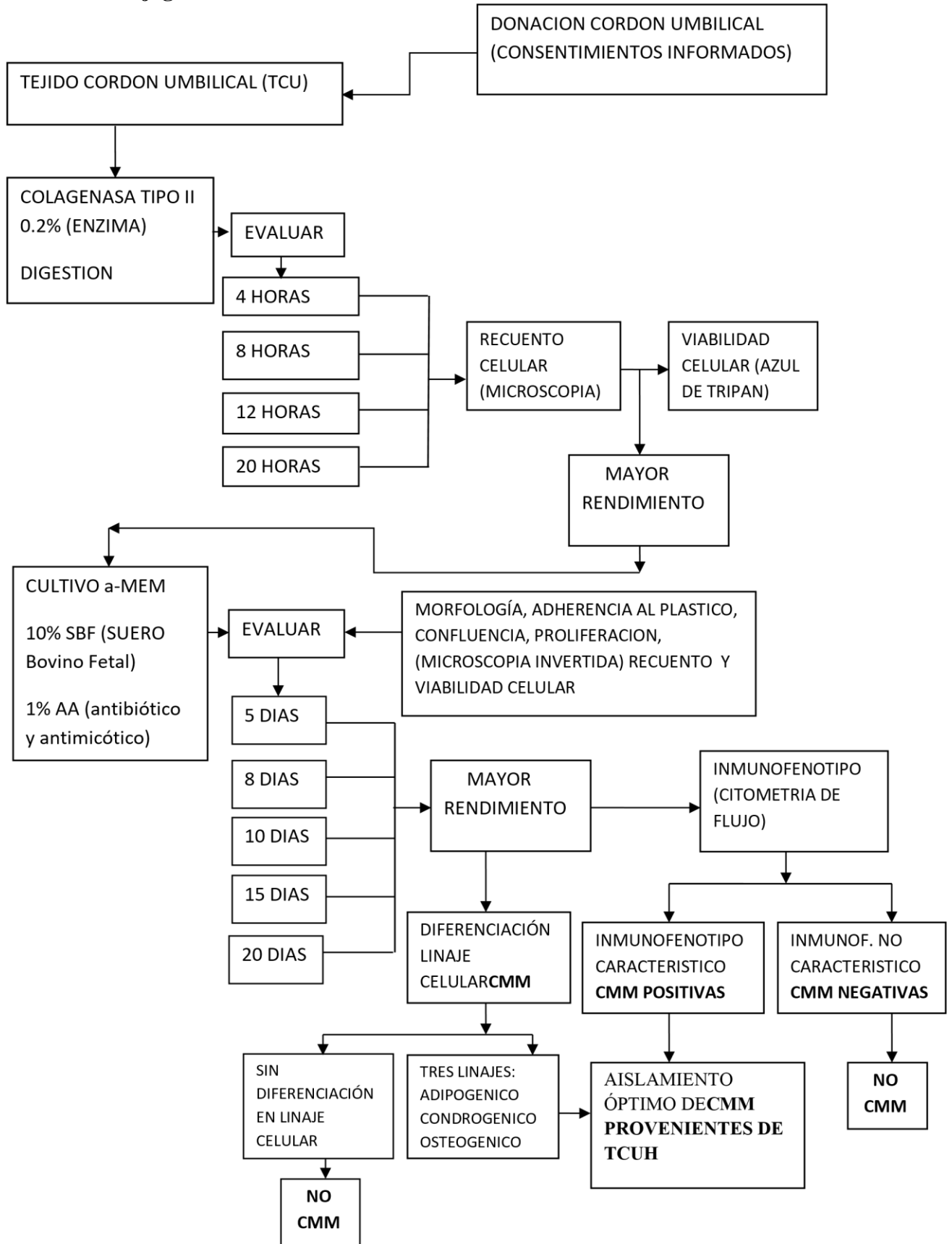
23. Munevar J. Obtención in vitro de células StemCell del cordón umbilical humano como alternativa de las células StemCell de origen embrionario para la Medicina Regenerativa. Rev. Lat. Bioética [Internet]. 2005 [citado el 17 junio 2019]; (9): 1-26 Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/1270/127020924003.pdf>

24. Comité de bioética de España, Consenso Nacional de Ética para Ciencias de la Vida Portugal [Internet]. 2012 [citado el 05 abril 2019]; Disponible en:
<http://assets.comitedebioetica.es/files/documentacion/bancos-de-sangre-tejido-cordonumbilical-cbe-cnecv.pdf>

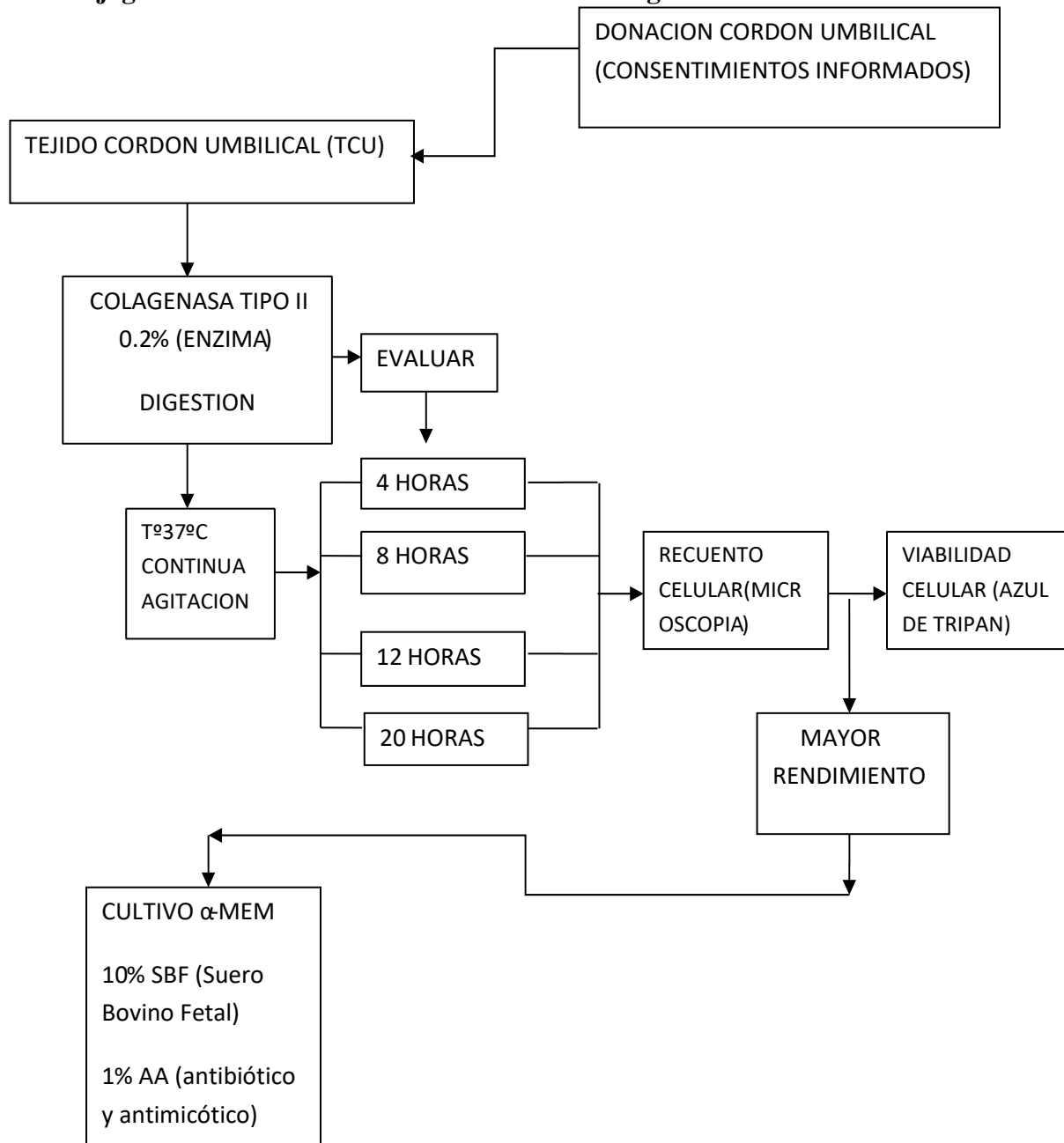
25. Manca M, Zwart I, Beo J, Palashingham R, Jen LS, Navarrete R, et al. Caracterización de las células del estroma mesenquimatoso derivadas de la sangre del cordón umbilical a término Rev. Citoterapia [Internet]. 2008 [citado el 23 junio 2019]; 10(1): 54-68 Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202975>

26. Lim J, Mohamad Z, Xian J, Mohammed A, Haji RB, Geok T, et al. Las células estromales mesenquimales del segmento materno del cordón umbilical humano son ideales para la regeneración ósea en un entorno alogénico Rev. Springer [Internet]. 2018 [citado el 23 junio 2019]; 15(1): 75-87. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6171637/>

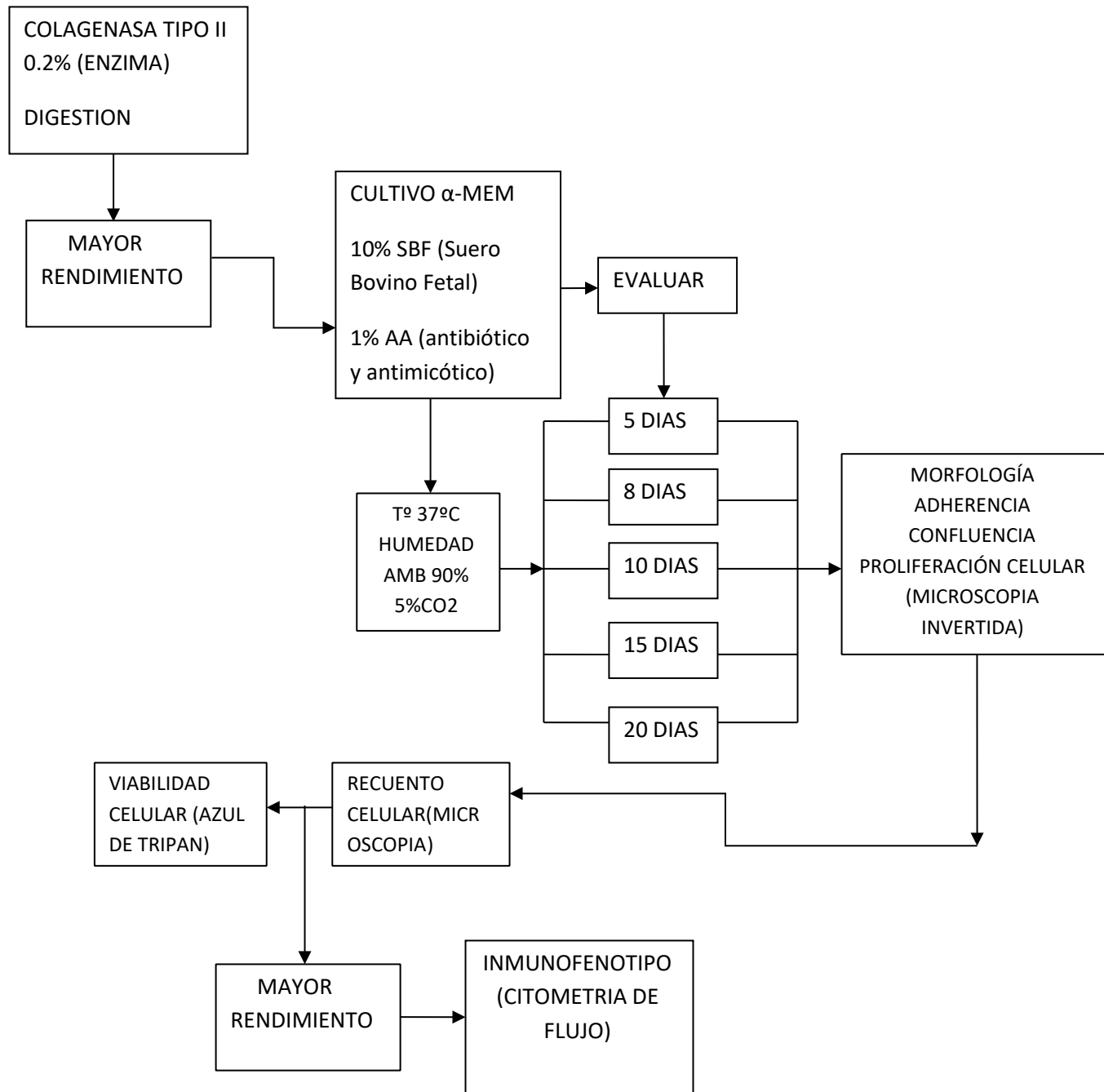
8.2. Flujoograma del método de aislamiento



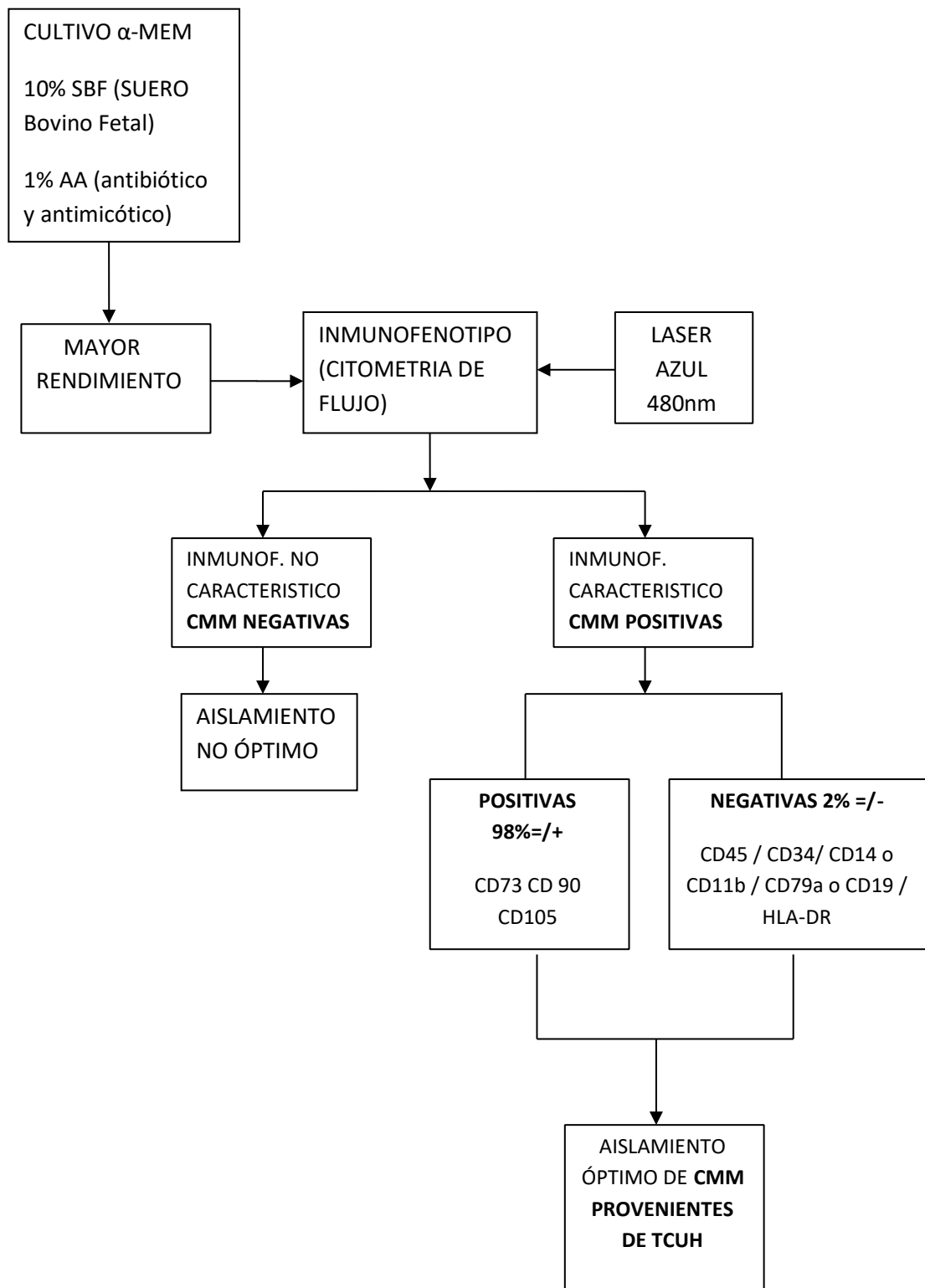
8.3. Flujograma del método de digestión celular



8.4. Flujograma del cultivo en aEMEN



8.5. Flujograma del inmunofenotipo



8.6. Flujograma de la diferenciación del linaje celular

