



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio *in vitro* del efecto de las células madre mesenquimales de líquido amniótico sobre la función plaquetaria

D^a Marina Fernández-Arrausi García-Estañ

2018

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- ✓ CM: células madre
- ✓ CMA: células madre embrionarias
- ✓ SSEA-3, SSEA-4: antígenos embrionarios específicos de estadio, del inglés: *Stage Specific Embryonic antigens 3 and 4*
- ✓ TRA 1-60: antígeno de rechazo de tumor 1-60, del inglés: *Tumor Reject Antigen 1-60*
- ✓ TRA 1-81: antígeno de rechazo de tumor 1-81, del inglés: *Tumor Reject Antigen 1-81*
- ✓ Oct-4: factor de transcripción de unión a octámero, del inglés: *Octamer-binding transcription factor 4*
- ✓ LIF: factor inhibidor de la leucemia
- ✓ FCF: factor de crecimiento de fibroblastos
- ✓ CMA: células madre adultas
- ✓ CMN: células madre neurales
- ✓ CMI: células madre intestinales
- ✓ CMH: células madre hematopoyéticas
- ✓ G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos humanos, del inglés: *Granulocyte Colony Stimulating Factor*
- ✓ CMM: células madre mesenquimales
- ✓ ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular, del inglés: *The International Society for Cellular Therapy*
- ✓ MAPC: células progenitoras multipotenciales adultas, del inglés: *Multipotent Adult Progenitor Cells*
- ✓ iPSC: células pluripotentes inducidas, del inglés: *Induced Pluripotent Stem Cells*
- ✓ LA: líquido amniótico
- ✓ h-EGF: factor humano de crecimiento epidérmico, del inglés: *Epidermal growth factor*
- ✓ IL: interleucinas, del inglés: *interleukin*
- ✓ TNF: factor de necrosis tumoral, del inglés: *tumor necrosis factor*
- ✓ HPN 1: defensina 1, del inglés: *Human Neutrophil Peptide-1*
- ✓ anti-BPI: proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad

- ✓ CMM-LA: células madre mesenquimales de líquido amniótico
- ✓ CMP: células madre pluripotentes
- ✓ GPs: glicoproteínas de membrana
- ✓ MU: membrana unitaria
- ✓ vWF: factor de von Willebrand
- ✓ CD62P: P-selectina: proteína de membrana granular (GMP-140) ó proteína de activación plaquetaria dependiente de la membrana externa granular (PADGEM)
- ✓ PSGL-1: glicoproteína ligando-1 de la P-selectina
- ✓ 5-HT: 5-hidroxitriptamina: serotonina
- ✓ ADP: adenosín difosfato
- ✓ ATP: adenosín trifosfato
- ✓ PF4: factor plaquetario 4
- ✓ SCA: sistema canicular abierto
- ✓ GPs: receptores glicoproteicos
- ✓ PLC: fosfolipasa C
- ✓ IP3: 1,4,5 inositol trifosfato
- ✓ DAG: 1,2 diacilglicerol
- ✓ PLA2: fosfolipasa A2
- ✓ AA: ácido araquidónico
- ✓ TXA2: tromboxano A2
- ✓ PKC: proteína kinasa C
- ✓ TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activada
- ✓ TP: tiempo de protrombina
- ✓ TT: tiempo de trombina
- ✓ PF3: factor plaquetario 3
- ✓ PK: pre-caliceína: factor de Fletcher
- ✓ FT: factor tisular
- ✓ t-PA: activador del plasminógeno tisular
- ✓ AT: antitrombina
- ✓ TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular, del inglés: *tissue factor pathway inhibitor*.
- ✓ TM: trombomodulina
- ✓ AINES: anti-inflamatorios no esteroideos
- ✓ EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

- ✓ EGTA: etilenglicol-bis (β -aminoetiléter) -N, N, N', ácido N'-tetraacético
- ✓ EICH: enfermedad de injerto contra huésped
- ✓ PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés: *platelet derived growth factor*
- ✓ HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- ✓ IMIB: Instituto Murciano de Investigación Biomédica Virgen de la Arrixaca
- ✓ PBS: tampón fosfato salino, del inglés: *phosphate buffered saline*
- ✓ DMEM, del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- ✓ SBF: suero bovino fetal
- ✓ BCIP/NBT: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroazul de tetrazolio, del inglés: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium chloride
- ✓ PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- ✓ ADN: ácido desoxirribonucleico
- ✓ RNA: ácido ribonucleico
- ✓ dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato
- ✓ UV: ultravioleta
- ✓ PFA: paraformaldehído
- ✓ ISTH: Sociedad internacional de Trombosis y Hemostasia, del inglés: *International Society on Thrombosis and Haemostasis*
- ✓ PFA: analizador de la función plaquetaria
- ✓ COL/EPI: colágeno/epinefrina
- ✓ COL/ADP: colágeno/adenosín difosfato
- ✓ AUC: área bajo la curva, del inglés: *area under the curve*
- ✓ UA: unidades arbitrarias
- ✓ IF: intensidad de fluorescencia
- ✓ TO: tiempo de obturación
- ✓ TRAP: péptido activador del receptor de trombina
- ✓ FSC: del inglés: *Forward Scatter Channel*
- ✓ SSC: del inglés: *Side Scatter Channel*
- ✓ Multi Sample Agitator: MSA

ÍNDICE

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Células madre	1
I.1.1. Origen del término “stem cell”	1
I.1.2. Definición y características	2
I.1.3. Clasificación	3
I.1.3.1. Clasificación en base a su origen.....	4
I.1.3.1.1. Células madre embrionarias (CME)	4
I.1.3.1.2. Células madre adultas (CMA)	5
I.1.3.1.2.1. CMA linfohematopoyéticas.....	7
I.1.3.1.2.2. CMA no linfohematopoyéticas.....	8
I.1.3.1.3. Células madre pluripotentes (iPSC).....	11
I.1.3.1.4. Células madre fetales.....	12
I.1.3.2. Clasificación en base a su potencialidad.....	12
I.1.3.2.1. CM totipotentes	12
I.1.3.2.2. CM pluripotentes	12
I.1.3.2.3. CM multipotentes	12
I.1.3.2.4. CM oligopotentes	13
I.1.3.2.5. CM unipotentes.....	13
I.2. Líquido amniótico	13
I.2.1 Origen del líquido amniótico	13
I.2.2 Composición del líquido amniótico	14
I.2.3 Producción del líquido amniótico	15
I.2.4 Funciones del líquido amniótico	16
I.2.5 Aplicaciones del líquido amniótico	16
I.2.6 Células madre mesenquimales de líquido amniótico	17
I.3. Plaquetas	19
I.3.1. Origen, definición y características de las plaquetas	19
I.3.2. Estructura de la plaqueta.....	20
I.3.2.1. Membrana plaquetar	20
I.3.2.2. Gránulos y organelas citoplasmáticas.....	23
I.3.2.2.1. Gránulos alfa.....	23
I.3.2.2.2. Gránulos densos.....	23
I.3.2.2.3. Lisosomas	23
I.3.2.2. Citoesqueleto	24
I.3.3. Fisiología de la hemostasia	25
I.3.3.1. Hemostasia primaria	26

I.3.3.2. Hemostasia secundaria.....	27
I.3.3.3. Fibrinolisis	30
I.3.3.1. Mecanismos reguladores	31
I.4. Células madre mesenquimales (CMM) y su efecto sobre la coagulación.....	33
II. JUSTIFICACIÓN.....	39
III. OBJETIVOS.....	41
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
IV.1. Cultivos celulares.....	43
IV.1.1. Obtención de la muestra de líquido amniótico.....	43
IV.1.2. Aislamiento y cultivo de CM derivadas de LA	43
IV.1.3. Mantenimiento de cultivo, pase y tripsinización.....	45
IV.1.4. Recuento y viabilidad celular	45
IV.1.5. Capacidad multipotencial de las CM derivadas de LA:	
estudios de diferenciación <i>in vitro</i>	46
IV.1.5.1. Diferenciación adipogénica.....	47
IV.1.5.2. Diferenciación osteogénica	47
IV.1.5.3. Diferenciación condrogénica.....	48
IV.1.6. Caracterización fenotípica de las CM derivadas del LA	48
IV.1.7. Análisis de la expresión de RNAm mediante PCR cualitativa.....	50
IV.1.8. Inmunofluorescencia: detección del FVIII y vWF	53
IV.2. Ensayos experimentales para el estudio de la función plaquetaria	54
IV.2.1. Muestra de sangre.....	54
IV.2.2. Parámetros analizados	56
IV.2.3. Adhesión y agregación plaquetaria por PFA-100.....	57
IV.2.4. Multiplate: agregación plaquetaria en sangre entera por impedancia	58
IV.2.5. Citometría de flujo: agregación y activación.....	62
IV.2.5.1. Principio del ensayo	62
IV.2.5.2. Aplicaciones de la citometría de flujo.....	64
IV.2.5.3. Protocolo de agregación plaquetaria en presencia de CMM-LA	66
IV.2.5.4. Protocolo de activación plaquetaria en presencia de CMM-LA	68
IV.2.6. Citometría de flujo: análisis del calcio citosólico en sangre completa	
y a tiempo real	70
IV.3. Análisis estadístico.....	71
V. RESULTADOS	73
V.1. Caracterización de las CMM-LA	73
V.1.1. Cultivo de CM derivadas de LA	73
V.1.2. Capacidad multipotencial de las CM derivadas de LA:	
estudios de diferenciación <i>in vitro</i>	74

V.1.3. Caracterización fenotípica de las CM derivadas de LA	76
V.1.4. Expresión de RNAm en las CMM-LA mediante PCR cualitativa	78
V.1.5. Inmunofluorescencia: detección del FVIII y vWF en CMM-LA.....	79
V.2. Efecto de las CMM-LA sobre la coagulación.....	81
V.3. Efecto de las CMM-LA sobre la hemostasia primaria: PFA-100	81
V.4. Efecto de las CMM-LA sobre la agregación plaquetaria en sangre entera medida por el método de impedancia (Multiplate).....	82
V.4.1. Efecto de las CMM-LA sobre la función plaquetaria en condiciones basales (ausencia agonista)	82
V.4.2. Efecto de las CMM-LA sobre la agregación plaquetaria en respuesta a agonistas: ADP/TRAP	85
V.5. Estudio de la función plaquetaria por citometría de flujo	89
V.5.1. Agregación en sangre entera por el método de citometría de flujo: Efecto de la presencia de CMM-LA	89
V.5.2. Activación: Efecto de las CMM-LA sobre la expresión del marcador de activación plaquetaria P-selectina en respuesta a los agonistas ADP y TRAP	90
V.5.3. Medición del calcio plaquetario por citometría de flujo en presencia de CMM-LA	91
VI. DISCUSIÓN	95
VII. CONCLUSIONES	105
VIII. RESUMEN.....	107
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	111
X. ANEXOS	121
X.1. Anexo 1: Índice de figuras y tablas	121
X.2. Anexo 2: Material fungible e inventariable.....	125
X.2.1. Cultivos celulares	125
X.2.2. Reactivos	126
X.2.3. Anticuerpos	127
X.2.4. Primers	128
X.2.5. Equipos.....	128
X.3. Anexo 3: Consentimientos informados	131
X.3.1. Hoja Informativa y Consentimiento Informado	131
X.3.2. Hoja de Información y autorización del Biobanco.....	135
X.4. Anexo 4: Comité bioética	143
X.5. Anexo 5: Aportaciones a jornadas y congresos.....	145

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. CÉLULAS MADRE

I.1.1. Origen del término “stem cell”

Fue en 1868, cuando el biólogo alemán, Ernst Haeckel, empleó por primera vez el término “*stem cell*”. Derivada del alemán “*Stammzelle*”, E. Haeckel, utilizó este término para describir por un lado al organismo unicelular a partir del cual se originan todos los organismos multicelulares y por otro, al óvulo fertilizado del cual derivan todas las células del organismo. Posteriormente, en 1892, Boveri tras un estudio realizado sobre los linajes celulares de los *Ascaris*, género de nematodos, consideró que las células madre (CM), eran aquellas situadas en la línea germinal entre el óvulo fertilizado y las células germinales comprometidas. Diez años más tarde, Hacker observó en un estudio realizado en el crustáceo *Cyclops*, una célula que se internalizaba por gastrulación y se dividía de forma asimétrica dando lugar a células mesodérmicas y germinales. Pero no fue hasta 1896, casi 30 años más tarde, que el término “stem cell” cobró popularidad de la mano del genetista estadounidense Edmund Beecher Wilson (Ramalho-Santos et Willenbring, 2007).

De forma paralela, cuando se empezó a estudiar el sistema sanguíneo surgieron las mismas preguntas: ¿existía una célula madre común? Había división de opiniones, aquellos que no creían que hubiese una célula precursora común debido a la diferencia entre los componentes sanguíneos (eritrocitos, granulocitos, linfocitos y plaquetas) y otros que por el contrario sí creían en un precursor común a todos. Tuvieron que pasar varias décadas, hasta que James Till, Ernest McCulloch y colaboradores en 1960, evidenciasen la existencia de una célula madre hematopoyética común. A partir de ahí, se identificaron células madre en diferentes tejidos: intestino, piel... (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007)

I.1.2. Definición y características

Las células madre (CM), también conocidas como células troncales ó *stem cells*, son células indiferenciadas que se definen en base a tres premisas: (Verfaillie, 2002; Weissman, 2000).

- Capacidad de auto-renovación temporalmente ilimitada o capacidad de formar durante su división al menos una copia idéntica de la célula primitiva, que presente sus mismas características y propiedades biológicas. Esta propiedad de auto-renovación también se conoce como auto-mantenimiento o *self-renewal* y la diferencia del resto de células somáticas, las cuales presentaran un número limitado de divisiones.
- Capacidad de diferenciación hacia células hijas comprometidas en determinadas rutas de desarrollo, las cuales se especializarán en un tejido celular, donde ejercerán una función específica. Su capacidad de diferenciación abarca las células presentes en los tres linajes existentes: ectodermo, mesodermo y endodermo (Figura 1).
- Capacidad de proliferación a largo plazo.

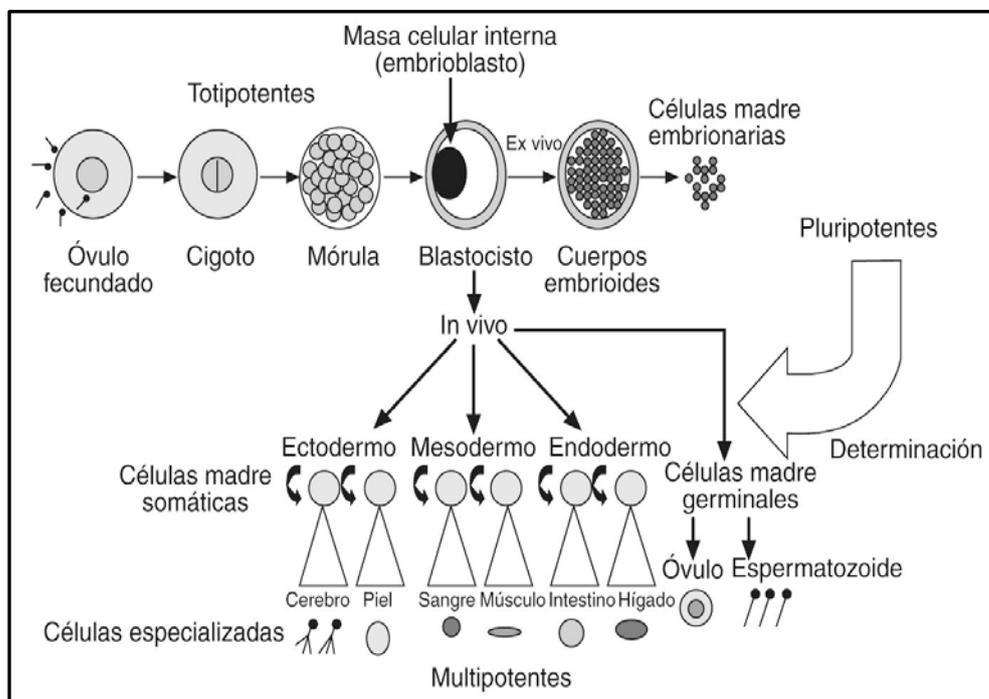


Figura 1. Capacidad de diferenciación en los tres linajes: ectodermo, mesodermo y endodermo (Bonora-Centelles, 2008).

Actualmente se han descrito dos mecanismos de división celular, el simétrico y el asimétrico (Bernard, 2010). En el primero de ellos, modelo clásico o simétrico, las dos células hijas generadas son idénticas entre sí y equivalentes a la célula progenitora de la cual derivan. Las células descendientes o progenie pueden tener diferentes destinos, en función del programa de diferenciación asignado.

El mecanismo de división celular asimétrico, genera una célula hija, idéntica a la célula progenitora que se mantiene como célula madre de forma indefinida y otra célula hija que se diferenciará. Este mecanismo fue descrito en células madre, tras estudios realizados en la especie *Drosophila* y durante muchos años ha sido considerado como el sello distintivo de las CM. Actualmente se aceptan otras formas de división para las CM, incluyendo la posibilidad de división celular simétrica.

Algunos estudios revelaron el desarrollo de procesos cancerosos cuando se veía alterado el mecanismo de división asimétrica. (Causones & González, 2005), lo cual hacía necesaria la existencia de un sistema regulador genético que permitiese mantener un equilibrio entre la tasa de proliferación-diferenciación y de destrucción-muerte celular, para evitar un crecimiento descontrolado de las células en los tejidos, que se asocia entre otros, con procesos potencialmente tumorales. Entre los mecanismos propuestos para controlar la división asimétrica, destaca la importancia de establecer la polaridad celular, la señalización de la proteína G, la asimetría del nucléolo, los ejes de orientación mitótica y la segregación de factores determinantes de la diferenciación (Wu et al, 2008).

I.1.3. Clasificación

Las células madre se pueden clasificar en base a su potencial de diferenciación y en base a su origen.

I.1.3.1. Clasificación en base a su origen:

I.1.3.1.1. Células madre embrionarias (CME)

Las Células madre embrionarias (CME), son células que aparecen en las primeras etapas de formación del embrión (Verfaillie, 2002). Tienen capacidad de proliferar de forma indefinida in vitro, pluri-potencialidad y amplia capacidad de diferenciación en los diferentes tipos celulares, pertenecientes a los tres linajes existentes: ectodermo, mesodermo y endodermo. Las primeras células madre embrionarias aisladas fueron a partir de embriones de ratón, posteriormente, en 1998, se aislaron CME derivadas de blastocitos humanos (Thomson et al,1998). Las CME derivadas de blastocitos humanos, se obtienen a partir de embriones humanos frescos ó congelados, que han sido donados por pacientes que se someten a tratamientos de fertilidad ó diagnóstico pre-implantacional y que, tras la firma de un consentimiento informado, deciden derivar parte de sus embriones, los cuales serán cultivados hasta alcanzar el estado de blastocito (Trounson, 2006). Existen diferencias entre ambos tipos de CME, mientras que las CME obtenidas de ratones doblan su población en 12 horas, las CME humanas, requieren al menos 36 horas para ello. Morfológicamente también presentan diferencias, las CME humanas, expresan: antígenos embrionarios 3 y 4 específicos de estadio SSEA (del inglés: *Stage Specific Embryonic antigens 3 and 4*), antígenos de rechazo a tumor TRA1-60 (del inglés: *Tumor Reject Antigen 1-60*) y TRA1-81 (del inglés: *Tumor Reject Antigen 1-81*), fosfatasa alcalina, factor de transcripción de unión a octámero Oct-4 (del inglés: *Octamer-binding transcription factor 4*) y Nanog (Odorico et al, 2001). Las CME de ratón por su parte no presentan ni SSEA3, ni SSEA-4. Las condiciones de cultivo son también diferentes, las CME de ratón requieren factor inhibidor de la leucemia (LIF) y las células madre embrionarias humanas requieren capas de alimentación con suero y en caso de que el medio no contenga suero, factor de crecimiento de fibroblastos (FCF).

Las células madre embrionarias humanas, han demostrado tener cariotipos normales (46XX, 46XY) y una actividad de la enzima telomerasa elevada (Chung et al, 2008).

Una de las ventajas del uso de CME en investigación es su capacidad de proliferar indefinidamente, y con ello la obtención relativamente fácil de una fuente enorme de células, que pueden contribuir a la regeneración de tejidos en diferentes enfermedades.

Además, las células madre embrionarias humanas, han sido utilizadas para testar fármacos y evaluar sus efectos tóxicos y son consideradas como una buena opción para trasplantes de tejido.

1.1.3.1.2. Células madre adultas (CMA)

También conocidas como células somáticas, son un grupo de células que encontramos en la mayoría de los tejidos de un individuo totalmente desarrollado, entendiéndose como individuo totalmente desarrollado, un adulto, un niño, la placenta, un feto ó un recién nacido.

Las células madre adultas se encuentran en unas regiones específicas de cada tejido u órgano, conocidas como nichos (Zhang et Li, 2008). El concepto de “nicho”, hace referencia al microambiente tisular especializado donde las CM son capaces de establecer relaciones complejas célula-célula, interacciones con la matriz extracelular a través de moléculas de adhesión, auto-renovarse o permanecer en estado de reposo hasta ser activadas para generar nuevas células, proceso conocido como “*sucesión clonal*”. Han sido estudiados los nichos de ciertas CMA como por ejemplo la región subventricular y el giro dentado en células madre neurales (CMN), el fondo de las criptas para las células madre intestinales (CMI) o la capa basal de la epidermis para las CME. El concepto de nicho está íntimamente relacionado con el concepto de autorrenovación, de forma que un nicho adecuado, es fundamental para aportar un ambiente idóneo, mantener la homeostasis tisular y un correcto equilibrio entre proliferación/quienescencia/diferenciación. La señal de proliferación es aquella que induce la división celular, por su parte, la señal de quienescencia, va a inducir la ralentización del ciclo celular en fase G0 y la señal de diferenciación es aquella que contribuye a mantener la expresión de genes que van a inhibir los procesos de diferenciación celular. Cabe destacar, que el estado de quienescencia, aquel que las protege de agresiones externas, es el adoptado por la mayoría de las células en un momento dado, ya que solo unas cuantas participan activamente en el proceso de regeneración celular. Si bien es cierto que hay cuatro órganos que se encuentran en una situación de alta actividad fisiológica: la médula ósea, que presenta un alto nivel de exigencia debido a la alta demanda de células sanguíneas y mediadoras de la respuesta inmune. Las gónadas, que generan constantemente células germinales, el hígado que

tiene una gran capacidad de regeneración y los epitelios, destacando en intestinal y el epidérmico, que están en constante renovación (Bernard, 2010).

En un principio se postuló que las CMA estaban predeterminadas a diferenciarse en un tipo celular procedente de su mismo tejido de origen o al menos de su misma capa embrionaria definiéndose, así como multi-potenciales. Sin embargo, estudios realizados posteriormente han demostrado que las CMA son capaces de diferenciarse a células de tejidos diferentes del cual provienen, incluso, algunos investigadores como Jiang et al definen las CMA como pluri-potenciales, al observar esta propiedad en CMA de la médula ósea (Jiang et al, 2002). Esta propiedad característica de las CMA, se conoce como fenómeno de plasticidad (Zipori, 2005), se basa en la capacidad que tienen de modificar su fenotipo en respuesta a los cambios que reciben durante su estancia en el nicho, para dar lugar a linajes celulares diferentes del cual provienen, ser capaces de ser incorporados en otro microambiente diferente al suyo original y poder crecer. Esta característica fue reconocida por primera vez en estudios realizados en progenitores derivados de la médula ósea, donde se observaron cambios en el fenotipo en células inmaduras bajo condiciones controladas que simulaban microambientes diferentes al medular (Robey, 2000).

El estudio realizado por Lagasse y colaboradores en el 2000, muestra la generación de nuevas células hepáticas a partir de CM hematopoyéticas en un ratón diagnosticado de tirosinemia tipo 1 (Lagasse et al, 2000).

La isquemia cardiaca es otra patología que está siendo estudiada, podemos encontrar algunos trabajos como el de Orlic y col, quienes demuestran la plasticidad de las células madre hematopoyéticas (CMH) al trasplantar células de médula ósea en ratones infartados y observar una regeneración del miocardio, así como una mejoría de la enfermedad arterial coronaria. (Orlic et al, 2001).

Hasta hace relativamente poco, diez años atrás, las únicas CMA conocidas eran las Células Madre Hematopoyéticas (CMH), encargadas de formar los componentes celulares de las tres series sanguíneas: glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. Se intuía la existencia de CMA en otros tejidos, pero el descubrimiento de CMA en cada

uno de los tejidos del organismo humano adulto, es algo relativamente reciente, incluso la variedad de CMA es aún mayor, ya que se sabe que, en algunos tejidos, como la médula ósea, existe más de un tipo de CMA (Bernard, 2010).

En base a esto podemos clasificar las células madre adultas en linfohematopoyéticas y no-linfohematopoyéticas.

1.1.3.1.3. Células madre linfohematopoyéticas

Las CMH, son las células encargadas de realizar la hematopoyesis, proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos formes de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) que ocurre en diferentes órganos a lo largo de la vida. Durante las primeras semanas de gestación, este proceso ocurre en el saco vitelino, posteriormente las CMH migran principalmente al hígado, aunque también a órganos como el bazo y ganglios linfáticos. Finalmente, es en la médula ósea de todos los huesos donde hasta los 20 años se realiza la hematopoyesis. A partir de los 20 años, sólo la médula ósea de los huesos planos (esqueleto axial: vértebras, esternón, costillas y pelvis) conservan actividad hematopoyética.

Existen tres fuentes principales de obtención de CMH. La médula ósea, lugar donde de forma prácticamente exclusiva ocurre la hematopoyesis durante la edad adulta, a partir de sangre de cordón umbilical junto con la placenta y a partir de sangre periférica. Para ello, las CMH abandonan la médula ósea y pasan a la circulación sanguínea, en un proceso conocido como “movilización”. Se estima que hay una CMH por cada 10.000 células en la médula ósea y una CMH por cada 100.000 células sanguíneas en sangre periférica (Pérez et al 2007).

Para conseguir progenitores hematopoyéticos de la sangre periférica, se procede a realizar una leucoforesis previa estimulación del donante con factor estimulante de colonias de granulocitos humanos G-CSF (del inglés: *Granulocyte Colony Stimulating Factor*), conocido comercialmente bajo el nombre de Filgrastim. Esta glicoproteína, obtenida mediante tecnología de recombinación genética, moviliza las CMH gracias a la regulación de moléculas de adhesión intracelulares endoteliales y vasculares (Hill et al, 2006).

La obtención de CMH a partir de cordón umbilical y placenta, es cada vez una opción más reconocida para trasplantes. Se trata de una sangre más segura, más fácil de obtener y presenta menos incompatibilidades, ya que para hablar de un trasplante exitoso con médula ósea se necesita la compatibilidad de 6 antígenos frente a 4 requeridos en el caso de sangre de cordón umbilical. La única desventaja es el escaso volumen que se puede obtener a partir de esta fuente, aunque se está investigando como optimizar su obtención (Pérez et al, 2007).

En cuanto a las principales características de las CMH, cabe destacar:

- tamaño pequeño
- gran relación núcleo-citoplasma
- ausencia de marcadores de linaje (Lin-)
- marcaje débil con tintes vitales como el de Hoechst 33342
- presencia de diferentes marcadores de superficie: CD34, CD90, CD117 y CD133.

I.1.3.1.4. Células madre no-linfohematopoyéticas

En 1970, Friedenstein et al, aislaron en médula ósea otro tipo de CMA, diferentes a las CMH, a las cuales denominaron CM no hematopoyéticas. Este grupo las describió como células multipotentes, similares a los fibroblastos, adherentes al plástico y con capacidad de diferenciación hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos, así como a linajes no mesodérmicos (Batsali et al, 2013).

Hoy en día estas células son conocidas como células madre mesenquimales (CMM) y se definen en base a tres criterios que en 2006 propuso la Sociedad Internacional de Terapia Celular ISCT (del inglés: *The International Society for Cellular Therapy*) (Dominici et al, 2006):

- ✓ Capacidad de adherencia al plástico cuando se cultivan en condiciones estándar.
- ✓ Capacidad de diferenciarse *in vitro* en condrocitos, adipocitos y osteoblastos bajo condiciones estándar de cultivo (Figura 2).
- ✓ Expresar los antígenos específicos de superficie: CD73, CD90 y CD105, en ausencia de:

- antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45,
- marcadores de linfocitos B (CD79 α y CD19),
- marcadores de monocitos y macrófagos (CD14 y CD11b) y
- moléculas de superficie HLA-DR (antígeno leucocitario humano)

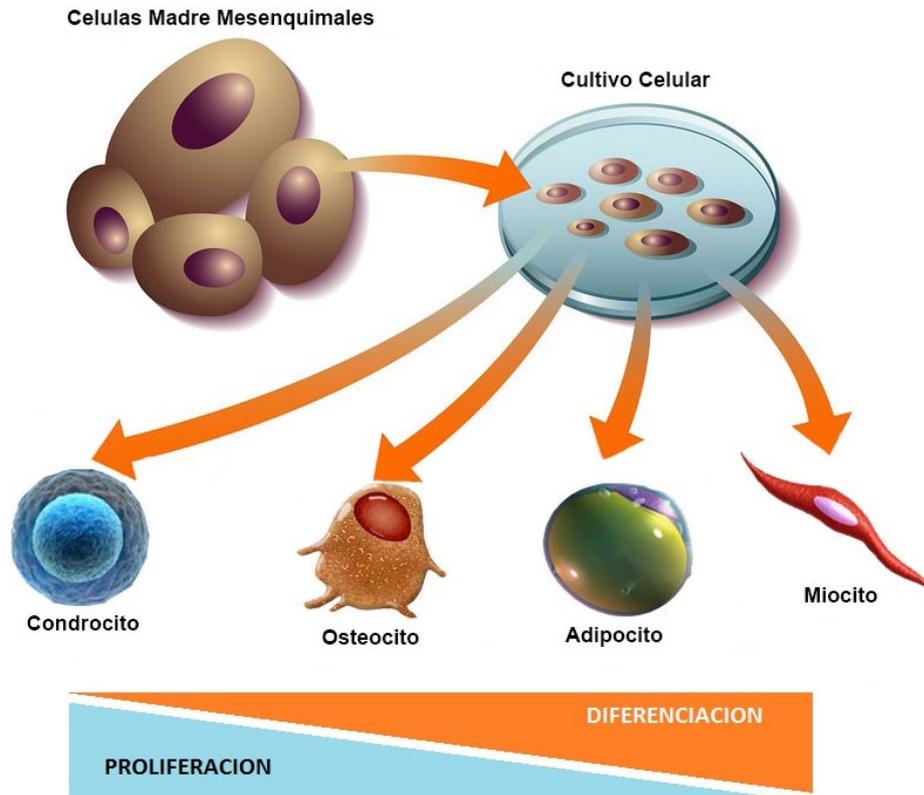


Figura 2. Esquema de diferenciación de CMM a condrocitos, adipocitos, osteoblastos y miocitos.

La médula ósea es sin duda el tejido ideal para aislar estas células, pero su limitada tasa de crecimiento y el riesgo que supone la toma de la muestra, han hecho que otras fuentes como el cordón umbilical y el tejido adiposo, se presenten como nuevos candidatos para la obtención de CMM (Wagner et al, 2005).

Debido a su fácil obtención, elevada capacidad de proliferación *ex vivo* y potencial de diferenciación, las CMM presentan múltiples aplicaciones clínicas.

Estudios realizados en ratones, demuestran la capacidad potencial que presentan estas células en la reparación ósea (Tsuchida et al, 2003).

El éxito de las CMM en la regeneración cardíaca ha sido demostrado en animales porcinos, donde se observó una reducción del tejido cardíaco dañado, mediante la diferenciación de las CMM administradas en cardiomiocitos y la liberación de factores que por señalización paracrina consiguen la fusión de las CMM con las células cardíacas (Mazhari & Hare, 2007).

Estudios demuestran la capacidad de las CMM para inhibir tanto *in vivo* como *in vitro* la activación de linfocitos T, B y NK, así como la inhibición de la expresión de moléculas relacionadas con la presentación de antígenos necesarios para la maduración de las células dendríticas (Rasmusson, 2006).

Otro tipo de CM no hematopoyéticas son las células madre epidérmicas. Estas células se encuentran principalmente en la membrana basal interfolicular, donde darán lugar a queratinocitos con fenotipo P63+ (Pellegrini et al, 2009) o en la región del *bulge*, localizada en el interior de los folículos pilosos, presentando los siguientes marcadores: CD34-, CD24-, CD71-, CD146- y CD200+ (Ohyama et al, 2006).

A nivel del sistema nervioso central, también se aislaron, las células madre neurales (CMN), caracterizadas por un marcador neuronal conocido como nestina, tienen su origen en las células de la cresta neural y se localizan principalmente en la región subventricular y subgranular del giro dentado del hipocampo. Son células multipotentes, con capacidad de auto-renovarse y diferenciarse a fenotipos celulares maduros, neuronas y células de la glía, astrocitos y oligodendrocitos (Bernard, 2010).

También se ha descrito en algunos órganos, como el cerebro, músculo y médula ósea, la existencia de células progenitoras multipotenciales adultas con capacidad de diferenciarse tanto *in vivo* como *in vitro* en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias. A estas células, se las conoce bajo las siglas MAPC (del inglés: *Multipotent Adult Progenitor Cells*), presentan un gran parecido con las CMM, pero son negativas para los marcadores CD44, CD45, HLA I y II (Jiang et al, 2002).

I.1.3.1.5. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

En 2006, el equipo de Takahashi y Yamanaka, definió mediante experimentos realizados inicialmente en ratones y posteriormente en células humanas, una tercera vía para obtener células pluripotentes. Tras varios experimentos, encontraron los genes necesarios para transformar una célula somática en una célula troncal. Partieron de un conjunto de 24 genes, expresados específicamente en células troncales embrionarias y mediante experimentos de transfección génica en fibroblastos embrionarios de ratón, consiguieron reducir el número de genes primero a 10 y finalmente a 4: Oct 3/4, Sox2, KFL4 y c-MYC, conocidos como OSKM, cuya expresión fue suficiente para generar células pluripotentes a partir de células somáticas, a las que denominaron células pluripotentes inducidas iPSC (del inglés: *Induced Pluripotent Stem Cells*). La transformación celular se realizó a través de vectores virales, que llevaban incorporados las secuencias de los cuatro genes. (Takahashi & Yamanaka, 2006).

A finales del año 2007, dos equipos de forma independiente, por un lado, el de Takahaki y Yamanaka y por otro el de Thomson consiguieron obtener las primeras células troncales pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos humanos. Thomson por su parte transformó los fibroblastos humanos con cuatro genes, dos de ellos idénticos a los usados por Takahaki y Yamanaka: Oct 3/4, Sox2 y dos genes diferentes: NANOG y LIN28. Las células IPs obtenidas fueron inyectadas en ratones inmunodeficientes por vía intramuscular, en los que se desarrollaron diferentes tipos celulares, pertenecientes a las tres hojas embrionarias, confirmando la pluripotencia de estas células (Yu J, 2007). De forma simultánea, el equipo liderado por Takahaki y Yamanaka reproducían los resultados obtenidos en células de ratón esta vez en células humanas, utilizando los cuatro mismos genes OSKM (Takahashi, 2007).

Numerosos trabajos demuestran el amplio abanico de células somáticas disponibles para obtener sus correspondientes células iPSC, destaca el trabajo de Loh YH y colaboradores, donde se describe la producción de iPSC a partir de progenitores hematopoyéticos movilizados en sangre periférica humana a través de la transducción retroviral de OCT4/SOX2/KLF4/MYC (Loh, 2009).

El enorme potencial terapéutico de las células iPSC y su gran parecido con las células embrionarias, convierten a estas células en una fuente celular inagotable para obtener células pluripotentes sin necesidad de usar tejidos embrionarios.

Sin embargo, uno de los problemas que estas células presentan es el relacionado con su posible potencial oncogénico, ya que, durante el proceso de reprogramación, las mutaciones somáticas que se hayan acumulado a lo largo la vida de las células de la cual provienen pasarían a las iPSc.

I.1.3.1.6. Células Madre Fetales

Definidas por algunos como células madre adultas obtenidas de tejidos fetales antes del nacimiento (Gucciardo et al, 2009). Otros, sin embargo, prefieren clasificarlas como células madre adultas, con un potencial de diferenciación mayor. Si las comparamos con las células madre embrionarias, presentan un potencial de diferenciación menor pero la ventaja de no producir teratomas.

I.1.3.2. Clasificación en base a su potencialidad:

I.1.3.2.1. Células Madre Totipotentes

El término “totipotencial” (del latín *totus*, que significa completo) hace referencia al potencial genético que presentan estas células para generar un ser completo (tejido embrionario y extraembrionario).

I.1.3.2.2. Células Madre Pluripotentes

Del latín *plures*, que significa muchos ó varios, este término describe la capacidad que presentan las células pluripotenciales para diferenciarse a cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo, incluyendo la línea germinal (óvulos y espermatozoides).

I.1.3.2.3. Células Madre Multipotentes

Son aquellas que pueden dar origen a precursores relacionados únicamente con una de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo ó mesodermo. Se definen como células específicas de línea y reciben el nombre del tejido u órgano al que pertenecen. Como ejemplo, podemos nombrar las células hematopoyéticas, hepáticas entre otras.

I.1.3.2.4. Células Madre Oligopotentes

Son células capaces de generar dos o más líneas dentro de un tejido. Por ejemplo, las células madre neurales son capaces de generar diferentes grupos de neuronas en el cerebro.

I.1.3.2.5. Células Madre Unipotentes

Son células que solo pueden generar células hijas que se diferencian a lo largo de una sola línea celular (Rodríguez-Pardo, 2005).

I.2. LÍQUIDO AMNIÓTICO

I.2.1 Origen del líquido amniótico:

El saco amniótico, está formado por dos membranas ovulares, la primera, más externa y vascularizada, llamada corion, resultante de la unión del trofoblasto con el mesodermo extraembrionario y la más interna y avascular, procedente del ectodermo embrionario, conocida como amnios, que contiene en su interior el líquido amniótico (LA) (Figura 3) (González-Merlo et al, 2014).

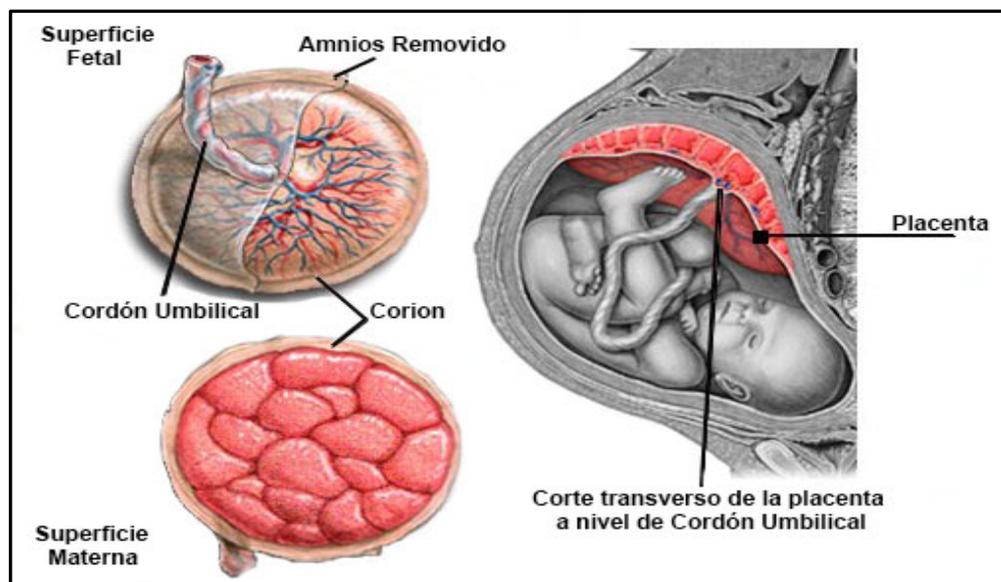


Figura 3. Ilustración del amnios y corion, en un corte transverso de la placenta.

I.2.2. Composición del líquido amniótico:

El líquido amniótico (LA) es un medio heterogéneo, compuesto por gran cantidad de sustancias orgánicas e inorgánicas, producidas por la madre y el feto. El agua representa el 99 % del total del líquido amniótico, el 1 % restante lo completan:

- Elementos inorgánicos: potasio, sodio, cloro, calcio, magnesio, fósforo, zinc y hierro.
- Elementos orgánicos: las proteínas suponen la mitad de los elementos orgánicos, entre ellas destacan, el factor humano de crecimiento epidérmico, h-EGF (del inglés: *Epidermal growth factor*) con papel fundamental en el crecimiento epidérmico, las citocinas (interleucinas: IL, IL-1, IL-6, IL-8) y el factor de necrosis tumoral TNF (del inglés: *tumor necrosis factor*), importantes para combatir las infecciones y con un papel fundamental a la hora de desencadenar el parto.

La otra mitad la completan: los hidratos de carbono: principalmente, glucosa, cuya concentración supone la mitad de la glucemia en sangre materna, sacarosa, arabinosa, fructosa y lactosa. Enzimas como la fosfatasa alcalina, y la amilasa, cuya concentración se incrementa en las últimas semanas de la gestación en respuesta a una correcta madurez fetal. Hormonas, como la tiroxina, insulina, renina, oxitocina, prolactina, lactógeno placentario, estrógenos, progesterona, alfa-fetoproteína y gonadotropina coriónica humana. Como componente celular, destacan, las células descamadas de las mucosas, piel, intestino, vías urinarias y respiratorias del feto y las células amnióticas y trofoblásticas que aparecen tras la descamación de las membranas del saco amniótico. El surfactante pulmonar, sustancia fosfolipídica y proteica producida por los neumocitos tipo II del epitelio alveolar a partir de la semana 23 de gestación, cuya función principal es evitar el colapso alveolar, al disminuir la tensión superficial y ofrecer una barrera inmunológica frente a bacterias y virus. Sustancias de desecho, como el meconio, productos finales de metabolismo como la urea, creatinina, ácido úrico, bilirrubina y elementos como las vitaminas y prostaglandinas, completan la enorme variedad de sustancias que componen este medio (González-Merlo et al, 2014).

El LA, es un líquido claro, transparente, que termina adquiriendo un tono blanquecino, presenta un pH constante de 7,4 y un volumen cambiante que va aumentando conforme avanza el embarazo, pasando de 30 mL en las primeras semanas hasta alcanzar volúmenes cercanos a 1000 mL en la semana 38. Es fundamental mantener los niveles adecuados de líquido amniótico, ya que tanto el defecto del mismo, conocido como oligohidramnios como el exceso, polihidramnios, conllevan a patologías graves tanto en el feto como en la madre. Las causas principales que conducen a la situación de oligohidramnios son la rotura prematura de la membrana amniocoriónica y los problemas renales, que impiden formar la cantidad de orina necesaria para constituir el líquido amniótico. Por su parte, la causa que produce polihidramnios es aún desconocida, pero si las consecuencias, que incluyen, defectos en el sistema nervioso central, complicaciones obstétricas como hipertensión arterial y diabetes entre otras (Morgan-Ortiz, 2015).

I.2.3. Producción del líquido amniótico:

Son varias las fuentes que producen este fluido; en las primeras semanas del embarazo, la mayor parte de su producción procede del líquido intersticial materno que accede al saco amniótico por difusión a través de la membrana amniocoriónica de la decidua parietal. El cordón umbilical también participa de manera activa en su producción. El feto tiene un papel minoritario en la formación de líquido en las primeras semanas de gestación, pero su contribución aumenta, de manera que en la semana 11, el feto comienza a expulsar cantidades importantes de orina al líquido amniótico, que llegan a alcanzar niveles de hasta 500 mL de orina diarios. Su composición va variando de forma que disminuye la osmolaridad y los electrolitos a la vez que aumentan los niveles de urea y creatinina. El contenido lipídico del líquido tiene su origen en las secreciones del aparato respiratorio fetal (170 mL/día). La deglución fetal (500 mL/día), el flujo transmembrana (300 mL/día) y las secreciones orales-nasales (25 mL/día), participan también activamente en la formación del líquido amniótico. Como se ha comentado anteriormente, se mantiene un equilibrio entre formación y eliminación de líquido amniótico, teniendo las membranas ovulares (corión y amnios) y el cordón umbilical un papel fundamental en la renovación de este medio (Figura 3). El feto, al igual que en la producción va participando más activamente en la eliminación, conforme avanzan las semanas, por medio del aparato respiratorio y digestivo (González-Merlo, 2013).

Es importante que el líquido amniótico se renueve de manera constante cada 2-3 horas, mediante un proceso dinámico de intercambio entre la circulación materna y fetal.

I.2.4. Funciones del líquido amniótico:

Hasta hace unos años se pensaba que el líquido amniótico era únicamente una barrera mecánica, con función protectora frente a traumatismos externos, actualmente se le atribuyen múltiples funciones:

- Acción protectora materna, amortiguando los movimientos del feto.
- Acción bactericida y bacteriostática frente a las infecciones. Destacan la defensina HPN 1 (del inglés: *Human Neutrophil Peptide 1*), la anti-BPI (Proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad) y la calprotectina.
- Actuar como medio para el crecimiento adecuado del embrión y posteriormente del feto, con un papel fundamental en el desarrollo del pulmón, como se comentó anteriormente.
- Aportar una temperatura adecuada para el correcto desarrollo fetal.
- Permitir el correcto y libre movimiento del feto, evitando que el cuerpo se adhiera a las membranas del saco amniótico, contribuyendo así a un adecuado crecimiento óseo.
- Ayudar a la acomodación del feto en el canal del parto y posteriormente lubricar el mismo (Gude et al, 2004; González-Merlo, 2013).

I.2.5. Aplicaciones del líquido amniótico:

Las aplicaciones diagnósticas del líquido amniótico son también importantes y el estudio del mismo mediante la realización de la amniocentesis, resulta de gran utilidad para:

- Estudio prenatal de malformaciones congénitas, mediante la realización de cariotipo, técnicas citogenéticas como FISH (hibridación fluorescente *in situ*) o microarrays.
- Estudio de la enfermedad hemolítica perinatal.
- Estudio de la madurez pulmonar fetal.
- Medida de la función placentaria.
- Valoración de infecciones intrauterinas y fetales (González-Merlo, 2013).

I.2.6. Células madre mesenquimales de líquido amniótico:

La capacidad de auto-renovación temporalmente ilimitada, proliferación y diferenciación hacia los distintos tipos celulares, convierte a las células madre en una excelente fuente para la inmunoterapia, terapia génica y medicina regenerativa, reemplazando y regenerando tejidos, órganos y células. Sin embargo, las CME están sujetas a problemas éticos, posibilidad de rechazo inmune y formación de teratomas y terato-carcinomas *in vivo*. Las células madre adultas (CMA), también presentan dificultades en cuanto a su aislamiento, potencial de diferenciación limitado, especificidad organizada y una vida útil acortada relacionada con el crecimiento y daño del DNA (Fei et al, 2013) .

Estos inconvenientes hicieron necesaria la búsqueda de nuevas fuentes, de manera que, en 2003 se aislaron por primera vez, células madre mesenquimales de líquido amniótico (CMM-LA). Los primeros en artículos publicados a cerca de las CMM-LA, fueron los del equipo de Prusa e In't Anker. Prusa y colaboradores describieron una población de células en líquido amniótico, Oct-4 positiva, marcador característico de células madre pluripotentes (CMP), hasta ahora sólo observado en CME, que aporta la ventaja frente a estas células, de no presentar problemas éticos (Prusa et al, 2003).

Por su parte In't Anker et al aíslan una nueva fuente de células madre en líquido amniótico, postulándola como candidata para realizar trasplantes terapéuticos (In't Anker et al, 2003).

Posteriormente, De Coppi y colaboradores, en 2007 aislaron mediante inmunoselección con microesferas magnéticas, células en cultivo de líquido amniótico, c-kit positivas (CD117), marcador de células madre, procedentes de ratones y humanos. Describieron, el gran parecido entre el fenotipo de las CMM-LA y el de las CMA y CME. Por un lado, se observaron marcadores clásicos de pluripotencia como el SSEA, pero también se ha visto como estas células madre son CD 90, CD105, CD73 y CD166 positivas, así como, positivas para el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (HLA-ABC) y negativas para CD45, CD34 y CD133 (marcadores hematopoyéticos). Se adhieren fácilmente al plástico y presentan capacidad de diferenciación osteogénica, lo cual las acerca a las CMM. Además, se ha observado que estas células, a diferencia de las CME,

no producen tumores y no presentan inconvenientes a nivel ético (Holden, 2006); postulándose como una nueva fuente de células madre relativamente segura y fácil de obtener por procedimientos habituales de amniocentesis (Antonucci, 2011) o de cesáreas de partos programados a término (Hamid et al, 2017). En cuanto a su cultivo, poca cantidad de líquido amniótico es necesaria para hacer crecer las CMM-LA, las cuales se aíslan de manera sencilla y proliferan rápidamente bajo condiciones de cultivo estándar, manteniendo largos telómeros y cariotipo normal hasta 250 pases, sin observar pérdidas cromosómicas (De Coppi, 2006).

Por citometría de flujo se ha visto la expresión de colágeno tipo I, II, III, IV Y XII, glicoproteínas CD 44 (molécula de adhesión que participa en la interacción entre células y célula-matriz extracelular), CD 54 (molécula de adhesión que participa en la interacción leucocito-endotelio, linfocito T-célula presentadora de antígeno y linfocito T-linfocito B), CD 31(molécula de citoadhesión endotelial plaquetaria, PECAM-1, implicada en la eliminación de neutrófilos) y CD 106 (molécula de adhesión implicada en la migración y reclutamiento de linfocitos al lugar de la inflamación) , SMA (actina del músculo liso), CK 18 (citoqueratina 18), fibronectina, desmina, vimentina y factor de Von Willebrand (Kim et al, 2006) .

Las CMM-LA, pueden ser clasificadas en base a su morfología y crecimiento en:

- ✓ células epitelioides (E-type)
- ✓ células específicas de líquido amniótico (AF-type)
- ✓ células tipo fibroblasto (F-type)

Las células epitelioides, aparecen desde los primeros cultivos y van disminuyendo conforme se realizan los pases. Este subtipo de células, cuyo origen es fetal (piel y orina), presentan formas cuboidales y columnares. Las células específicas de líquido amniótico, son las células mayoritarias, aparecen también desde el inicio del cultivo, pero a diferencia de las anteriores, si se mantienen en el tiempo. Derivan de las membranas fetales y del trofoblasto, presentan forma redondeada, expresan vimentina y queratina y son productoras de estrógenos, progesterona y gonadotropina coriónica humana.

Las células tipo fibroblasto, aparecen de manera tardía en los cultivos, presentan forma de huso y proceden del tejido conectivo fibroso y fibroblastos dérmicos (Antonucci et al, 2011; Prusa & Hengstschläger, 2002).

En cuanto a sus aplicaciones, son numerosas las publicaciones que describen estas células como una fuente nueva para la medicina regenerativa ó terapia celular. Uno de los primeros artículos, fue el de Fauza y col, donde se postula las CMM-LA cómo células con efectos terapéuticos, útiles en terapia celular, trasplantes y terapia génica (Fauza et al, 2004). Tsai y colaboradores, proponen su uso en enfermedades neurodegenerativas y lesiones del sistema nervioso (Tsai et al, 2006). Destaca el trabajo de Klemmt y colaboradores, donde las CMM-LA, fueron utilizadas para regenerar la glándula mamaria (Klemmt et al, 2010).

Mala Srivastava y colaboradores, recientemente publicaron las diferentes aplicaciones de estas células en la regeneración del sistema cardiovascular, gastrointestinal, músculo esquelético, sistema respiratorio, nervioso, urinario y en la piel (Srivastava et al, 2018).

I.3. PLAQUETAS

I.3.1. Origen, definición y características de las plaquetas

La plaqueta fue el último elemento forme de la sangre en ser descubierto, pasaron cien años desde la primera vez que fueron observadas por William Hewson (1739-1774) hasta que Alfred Donne (1801-1878) y George Gulliver (1804-1882) las describieron. Su pequeño tamaño (1-2 μm), las limitaciones ópticas de los microscopios iniciales y su facilidad para agregarse, fueron varios de los factores que retrasaron el descubrimiento de este elemento clave para el normal desarrollo de la hemostasia y cuyo papel en desórdenes trombóticos y hemorrágicos, es hoy en día indiscutible (Izaguirre-Avila, 1997). Se trata de células anucleadas, que tienen su origen en la fragmentación citoplasmática del megacariocito, proceso que tiene lugar en la médula ósea, conocido como trombopoyesis. En sangre presentan una concentración que oscila entre 150-400.000 células $\times 10^9$ /L y un volumen de 7-9 L. El 70 % están circulando, mientras que el 30 % están en el bazo. Presentan una vida media entre 7-10 días, posteriormente,

tanto los macrófagos en el bazo como las células de Kuffer en el hígado, se encargarán de fagocitarlas (George, 2000).

I.3.2. Estructura de la plaqueta

La plaqueta, en condiciones fisiológicas presenta forma de lente biconvexa y una estructura dividida en tres capas, íntimamente relacionadas con su función (Figura 4):

- Membrana plaquetaria
- Gránulos y organelas intracitoplasmáticas
- Citoesqueleto

I.3.2.1. Membrana plaquetaria:

La principal función de los trombocitos es impedir la pérdida de sangre en caso de lesión vascular. Para ello la *superficie plaquetar* es fundamental, ya que por un lado se adhiere a los componentes del subendotelio dañado y por otro, favorece la agregación y formación del tapón plaquetario (Bermejo, 2017).

La membrana plaquetar, presenta tres láminas: el glucocálix, la membrana unitaria y el área submembranosa:

- **Glicocálix ó cubierta plaquetaria externa**, es la línea que separa la plaqueta del medio exterior. Presenta una composición variable: cadenas de oligosacáridos, polisacáridos y glicoproteínas de membrana (GPs), las cuales son receptores claves en el papel que desarrollan las plaquetas. Por adsorción se incorporan a la membrana: proteoglicanos plasmáticos, albúmina y fibrinógeno.
- **Membrana unitaria (MU)**, es una bicapa asimétrica, rica en fosfolípidos, los cuales van a aportar la carga negativa a la membrana, para que esta sirva de soporte a los factores de coagulación (actividad procoagulante). El ácido araquidónico, componente fundamental de la MU, se encarga de transmitir las señales recibidas en el exterior de la membrana plaquetar hacia las regiones celulares internas.
- **Área submembranosa**, es donde se produce la transducción de las señales para activar la plaqueta.

Parte importante de la membrana plaquetar son, las **moléculas de adhesión**. Se trata de unas proteínas transmembrana, que actúan como receptores celulares funcionales, cuyo papel principal es el de transducir señales al interior de la célula. Se pueden clasificar en función de su composición glicoproteica y no glicoproteica.

a) **Los receptores glicoproteicos (GPs)**, son proteínas unidas covalentemente a carbohidratos, que van a facilitar la adhesión de la plaqueta al endotelio dañado, las interacciones entre diferentes plaquetas y la agregación entre sí. Se clasifican en: integrinas, GPs ricas en leucina y selectinas:

- **Integrinas:** son GPs de membrana con dos subunidades principales designadas α/β que participan en la adhesión celular. Cabe destacar:

- GP Ia/IIa (VLA-2, $\alpha 2/\beta 1$): complejo encargado de unir las plaquetas al colágeno (tipo I/IV) y al factor von Willebrand (vWF).
- GP IIb/IIIa (α IIb/ β 3): receptor más abundante de la membrana plaquetaria y principal promotor de la agregación plaquetaria, al unir fibrinógeno, el cual actúa de puente entre las diferentes plaquetas.
- GP VI: receptor más importante en la adhesión de las plaquetas al colágeno.
- GP IV (CD36): funciona como receptor de colágeno tipo II y de trombospondina. Participa en la transducción de señales.
- GP Ic/IIa: (VLA-5, $\alpha 5/\beta 1$): reconoce de manera específica a la fibronectina y permite la unión de la plaqueta al sustrato.

- **GPs ricas en leucina:** en la membrana plaquetaria destaca el complejo formado por tres glicoproteínas, GP Ib-IX-V, segundo receptor más abundante. Destaca su papel clave en la adhesión plaquetar al permitir la unión de los trombocitos al endotelio mediante el vWF y la trombina.

- **Selectinas:** familia compuesta por 3 moléculas: L-selectina (CD62L), P-selectina (CD62P) y E-selectina (CD62E). La letra inicial corresponde al tipo de célula donde se expresan: L: leucocito, P: plaqueta y E: endotelio.

En nuestro caso, nos centraremos en la P-selectina (CD62P), expresada en plaquetas y células endoteliales. También conocida bajo el nombre de proteína de membrana granular (GMP-140) o proteína de activación plaquetaria dependiente de la membrana externa granular (PADGEM), la P-selectina, se sintetiza en células endoteliales y plaquetas permitiendo la unión de leucocitos, principalmente, neutrófilos y monocitos a estas células. Posteriormente se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en la cubierta de los gránulos alfa y gránulos densos de las plaquetas inactivadas y desde estos lugares es trasladada a la superficie celular por estímulo de mediadores inflamatorios como la trombina, histamina y leucotrieno C4.

Su ligando de unión es una mucina denominada PSGL-1 (glicoproteína ligando-1 de la P-selectina). Actualmente, en la práctica clínica se utiliza también como marcador de activación plaquetaria, al haberse observado que se expresa un elevado número de moléculas P-selectina en la superficie plaquetar durante este proceso (McEver, 2001).

- **Superfamilia de Inmunoglobulinas (IgSF)**: formada por un extenso grupo de proteínas solubles y de superficie celular, participan en procesos de reconocimiento, unión y adhesión celular. Todas ellas poseen un dominio estructural conocido como plegamiento de inmunoglobulina, formado por dos láminas peptídicas antiparalelas, en estructura β -plegada, estabilizadas por enlaces disulfuro. Cabe destacar ICAM (1,2,3,4,5) como moléculas de adhesión intracelular, C-CAM, como molécula de adhesión célula-célula, VCAM-1, como molécula de adhesión vascular, PECAM-2, como molécula de adhesión plaqueta-endotelio, JAMs, como moléculas de adhesión juncional ó de unión adherente entre endotelio-leucocito ó leucocito-plaqueta y NCAMs como molécula de adhesión neuronal (Ross & Pawlina, 2007).

b) Los receptores no glicoproteicos, son moléculas de adhesión que regulan la activación y agregación plaquetaria. Podemos clasificarlos en receptores para el ADP: P2Y1, PDY12 y P2X1, para la trombina (PAR-1, PAR-3, PAR-4), para la serotonina ó 5-hidroxitriptamina (5-HT₂), para la adrenalina (receptor α_2 , receptor β_1) y para prostanoïdes (prostaglandina, prostaciclina y tromboxano A2) (Kahn et al, 1998).

I.3.2.2. Gránulos y organelas intracitoplasmáticos

En el interior de las plaquetas encontramos tres tipos de gránulos citoplasmáticos clasificados en función de su estructura, densidad y contenido: gránulos alfa, gránulos densos y lisosomas, con una función principalmente secretora.

I.3.2.2.1. Gránulos alfa

Son los mayoritarios, aproximadamente 50-80 por plaqueta, adquieren forma redonda y un diámetro entre 200-500 nm. Presentan una estructura muy característica dividida en tres zonas: la zona más oscura, nuclear, donde co-existen proteoglicanos con proteínas plaquetarias específicas como la β -trombomodulina y el factor plaquetario 4 (PF4) (Figura 4). La zona más externa, donde se encuentra el vWF y la tercera y última zona, intermedia a las dos anteriores, asociada a fibrinógeno, trombospondina, albúmina y factor de crecimiento (Bermejo, 2017).

I.3.2.2.2. Gránulos densos

Se denominan densos por carecer de claridad ó transparencia en las tinciones con tetróxido de osmio y por ser visibles al microscopio electrónico en preparaciones no teñidas. Se observan entre 2-7 gránulos densos por plaqueta, con un diámetro aproximado entre 200-300 nm y una morfología característica: zona central densa rodeado por un halo claro. Son sitios de almacenaje y posterior liberación por exocitosis de serotonina (5-HT), potente vasoconstrictor que en un 90 % se encuentra unido a plaquetas, calcio, magnesio, adenosín difosfato (ADP), adenosín trifosfato (ATP), fosfato inorgánico y polifosfatos entre otros (Figura 4).

I.3.2.2.3. Lisosomas

Son los gránulos más pequeños presentes en las plaquetas, con un diámetro inferior a 300 nm. La función de las enzimas lisosomales es meramente proteolítica focalizada en destruir el trombo formado. A nivel interno de la plaqueta cumplen una función de autofagia, eliminando fragmentos citoplasmáticos (Figura 4) (Bermejo, 2017).

Cierta actividad peroxidasa y catalasa han sido observadas en las plaquetas, lo cual podría indicar la existencia de más organelos.

I.3.2.3. Citoesqueleto

El citoplasma de las plaquetas está organizado por una malla de proteínas estructurales conocido como citoesqueleto, compuesto principalmente por un conjunto de microtúbulos de tubulina y una malla densa de polímeros de actina, que permiten una función tanto estática como dinámica de la plaqueta, la cual presenta una forma discoidea en condiciones normales y cambia a esférica cuando son activadas, lo cual permite una correcta función hemostática.

Los microtúbulos son heteropolímeros de α y β tubulina, dispuestos en dímeros (unidad estructural), los cuales polimerizarán en protofilamentos que se agregarán lateralmente para formar estructuras cilíndricas huecas. Cuando la plaqueta se activa, los microtúbulos se contraen y acercan sus organelos secretores al sistema canicular abierto (SCA), que son unos canales por donde entran sustancias del exterior y salen productos de la plaqueta (Figura 4). Al mismo tiempo, fragmentos de microtúbulos salen a la periferia para formar pseudópodos.

Rodeando los microtúbulos se encuentra la actina, componente mayoritario del citoesqueleto, cuya función principal es reordenar complejos de GPs y participar en los cambios estructurales de los trombocitos. Puede estar en forma libre (monómero), denominada actina G, o formar parte de polímeros lineales denominados microfilamentos ó actina F.

Proteínas como la filamina A (ABP-280), talina, K-actina, miosina I y II, se encuentran unidas a la malla citoplasmática de actina y tienen como función principal fijar el esqueleto plaquetar cuando los trombocitos están en reposo (Bermejo, 2017).

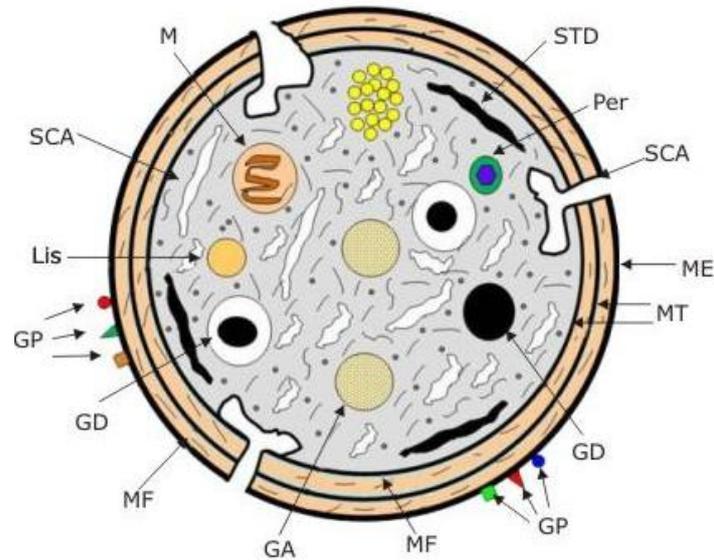


Figura 4. Esquema estructura plaquetaria. (GA: gránulo alfa; GD: gránulo denso; GP: glicoproteínas; Lis: lisosoma; M: mitocondria; MF: microfilamento; MT: microtúbulos; ME: membrana externa; Per: peroxisoma; SCA: sistema canalicular abierto; STD: sistema tubular denso) (Fernández-Delgado, 2012).

I.3.3. Fisiología de la hemostasia

El sistema de la hemostasia se encarga de mantener la integridad del árbol vascular, impedir la pérdida de sangre y aparición de obstrucciones. Este proceso consta de cuatro pasos; en un primer momento se produce un fenómeno de vasoconstricción vascular, seguido de la formación del tapón plaquetario (hemostasia primaria), sustrato transitorio capaz de frenar la hemorragia. A continuación, se formará el coágulo sanguíneo ó trombo rojo (hemostasia secundaria, comúnmente llamada coagulación) y un último paso donde se produce la desintegración del coágulo, conocido como fibrinólisis. En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre los sistemas de hemostasia, coagulación y fibrinólisis.

Para este proceso son claves tres componentes: las plaquetas, el endotelio vascular y la correcta interacción de las células sanguíneas con la pared vascular.

El endotelio es una extensa superficie celular, compuesta aproximadamente de 1 a 6×10^{13} células. Su papel no es meramente estructural al actuar como barrera entre la circulación y el tejido a irrigar, sino que desempeña un papel fundamental dentro de la coagulación y el proceso de fibrinólisis. Presenta propiedades tanto pro como anti-coagulantes, actuando de una forma u otra en función de la situación.

Las plaquetas cuya producción es estimulada por la trombopoyetina, actúan como parche al producirse el daño vascular, momento previo a la activación de la coagulación y fibrinólisis. (Mateo et al, 2001).

I.3.3.1. Hemostasia primaria

Dentro de la hemostasia primaria podemos diferenciar cuatro fases: vasoconstricción, adhesión, activación, secreción y agregación. Nada más producirse el daño vascular, por reflejo nervioso, se produce una **contracción inicial** que será posteriormente mantenida por sustancias vasoconstrictoras liberadas por las plaquetas. A continuación, se produce la **adhesión** plaquetaria, proceso en el que podemos distinguir una primera fase de contacto o reconocimiento plaquetar y una segunda fase en la cual los trombocitos se extienden sobre el lecho vascular. Durante esta fase, el complejo Gp Ib-IX-V desempeña un papel fundamental al unirse al endotelio por medio del vWF. El proceso de **activación** plaquetaria conlleva un cambio morfológico de la plaqueta, la cual adquiere una forma esférica y pseudópodos en su superficie. La cascada mediante la cual se activan las plaquetas ha sido estudiada y se sabe que la unión de ligando y receptor produce un aumento de fosfolipasa C (PLC), que conlleva una producción de 1,4,5 inositol trifosfato (IP3) y 1,2 diacilglicerol (DAG). El IP3, aumenta el calcio, lo que a su vez produce la activación de fosfolipasa A2 (PLA2) quien, por medio de la ciclooxigenasa, sintetiza ácido araquidónico (AA), el cual da lugar a tromboxano A2 (TXA2), potente agregante plaquetario que además produce vasoconstricción. El DAG por su parte activa la proteína kinasa C (PKC), que libera el contenido de los gránulos α , densos y lisosomales, (proceso de secreción), lo cual hace que acudan más plaquetas al lecho vascular (agregación plaquetar). La PKC, además expresa el receptor GP IIb/IIIa que se une al fibrinógeno, paso clave en la **agregación** plaquetaria (Flores-Rivera et al, 2014). La hemostasia primaria termina con la formación del tapón plaquetar (coágulo blanco) (Figura 5).

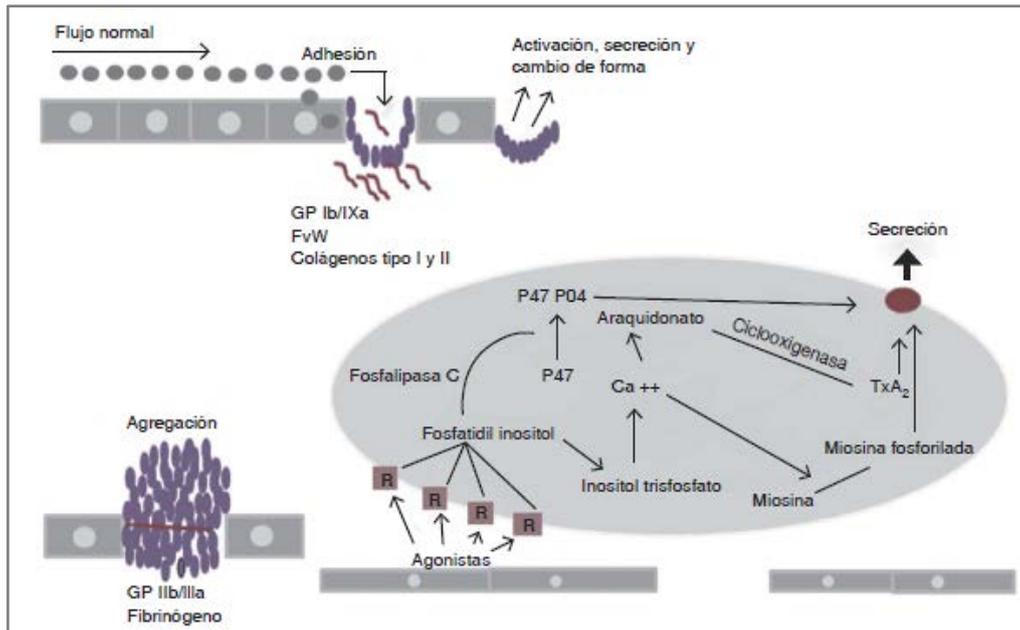


Figura 5. Esquema de la cascada de activación plaquetaria. Fases de la respuesta plaquetaria (vasoconstricción, adhesión, activación, secreción y I. agregación). Fisiología de la coagulación (Oscar Iván Flores-Rivera, 2014).

I.3.3.2. Hemostasia secundaria

El proceso de hemostasia secundaria se pone en marcha para reforzar el tapón plaquetario formado en la etapa previa y consiste en la activación de la cascada de coagulación, que dará lugar a la formación del coágulo sanguíneo o trombo rojo. Las proteínas que intervienen en la hemostasia secundaria se conocen como factores de la coagulación y se encuentran como zimógenos inactivos (pro-enzimas) en plasma que se irán activando unos a otros en cascada secuencial.

Existen dos modelos de coagulación: el **modelo clásico**, compuesto por vía intrínseca, extrínseca y fibrinólisis que explica la coagulación *in vitro*, con el estudio de los tiempos de coagulación usados para cuantificar la integridad de las vías (Tiempo de tromboplastina parcial activada: TTPA para la vía intrínseca, tiempo de protrombina: TP para la vía extrínseca y el tiempo de trombina (TT), que explica el paso de fibrinógeno a fibrina). El segundo modelo, más actual, conocido como **modelo celular**, explica la coagulación *in vivo*.

- **Modelo clásico de la coagulación:** comúnmente conocido como “*cascada de la coagulación*”, compuesto por una serie de etapas en las que la activación de un factor de coagulación, activa al siguiente. Este modelo considera dos vías que terminan activando al factor X ó de Stuart-Prower, que junto al factor plaquetario 3 (FP3), el calcio y el factor V forman el denominado complejo protrombinasa, que convertirá protrombina (factor II) en trombina, para finalmente convertir el fibrinógeno (factor I) en monómeros de fibrina, que en presencia de calcio y factor XIIIa polimerizan, dando lugar a una malla que cierra espacios entre plaquetas y sella de forma definitiva el tapón plaquetario, dando lugar al coágulo.

La **vía intrínseca** tiene vital importancia en el crecimiento y mantenimiento del coágulo. La activación de esta vía se inicia bien por la existencia de trombina o por factores de contacto. La precalicreína (PK) o factor de Fletcher, se convierte en calicreína para activar al factor XII ó factor de Hageman el cual a su vez activará al factor XI (factor antihemofílico C), que terminará por activar al factor X, con ayuda del calcio y del factor VIII (factor antihemofílico A) (Figura 6).

La **vía extrínseca** requiere un factor externo a la sangre, el factor tisular (FT), conocido también como tromboplastina tisular o factor III. Este factor, familia de receptores de citocinas, no se encuentra en condiciones fisiológicas en contacto con la sangre, pero cuando se lesiona el vaso, acude rápidamente, para unirse al factor VII, el cual se activará para confluir en la vía común activando al factor X (Figura 6) (Mateo et al, 2001).

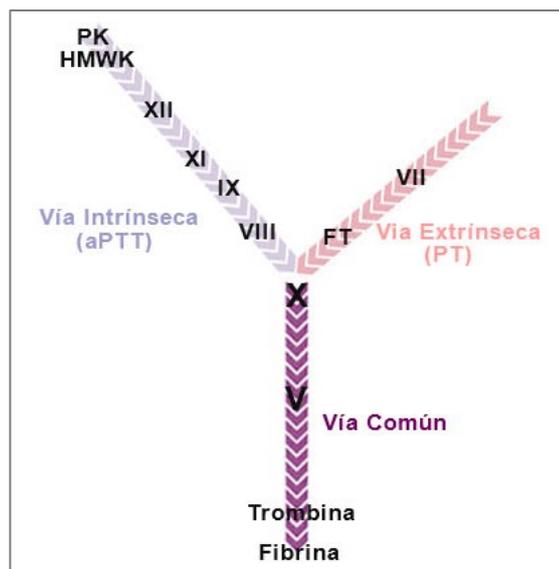


Figura 6. Modelo clásico de la coagulación: vía extrínseca, intrínseca y común (Alvarado Arteaga, 2013).

- **Modelo molecular y celular de la coagulación:** el modelo clásico de la coagulación anteriormente expuesto presenta ciertas carencias ya que representa lo que ocurre *in vitro*, pero no el verdadero fenómeno *in vivo*. Además, se observó que alteraciones que en principio afectaban a una sola vía tenían profundas implicaciones clínicas en la coagulación global. Estudios posteriores demostraron que las vías no operaban de manera independiente y en 2007, Hoffman y colaboradores propusieron el *modelo celular de la coagulación*, que contempla un único proceso que se desarrolla en 3 fases: la fase de iniciación, fase de amplificación y fase de propagación (Alvarado Arteaga, 2013).

En la ***fase de iniciación***, el factor tisular, presente en numerosos tipos de células queda expuesto tras la lesión vascular, lo cual favorece la unión del factor VII. El binomio (FT-VIIa) activa los factores IX y X. A su vez el factor Xa activa al factor V, con quien además se combina para producir trombina, la cual convertirá el fibrinógeno en fibrina.

Durante la siguiente ***fase de amplificación***, las plaquetas son activadas por la trombina generada durante la fase de iniciación. Los trombocitos liberan el contenido de sus gránulos alfa, principalmente factor V, el cual se activará gracias a la trombina y al factor Xa, exponiendo sus fosfolípidos de membrana,

necesarios para el proceso de coagulación. Durante esta fase también se activará el factor XI y el factor VIII, el cual será separado del factor de von Willebrand, por actividad de la trombina.

Por último, en la *fase de propagación*, el complejo “protrombinasa” (Xa, Va, calcio y fosfolípidos) produce grandes concentraciones de trombina, necesarias para transformar el fibrinógeno en fibrina. Por su parte, el complejo “tenasa” (VIIIa, IXa, calcio y fosfolípidos), se encarga de activar al factor Xa (Figura 7) (Páramo, 2009).

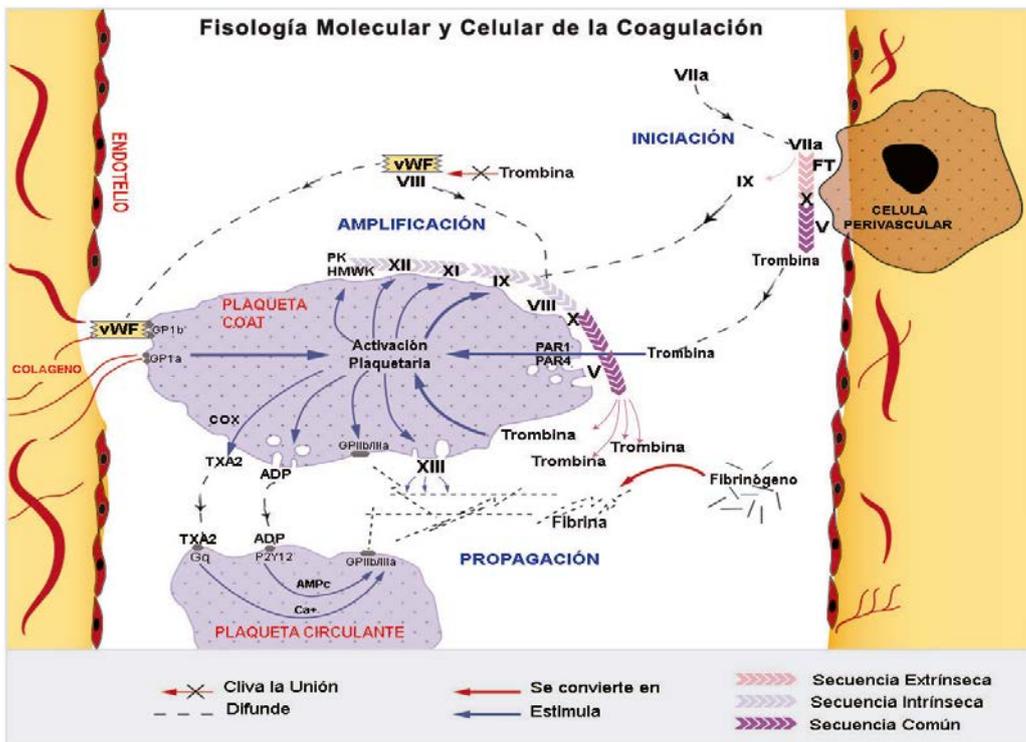


Figura 7. Modelo molecular y celular de la coagulación (Alvarado Arteaga, 2013).

I.3.3.3. Fibrinólisis

Cuando el daño se ha reparado, y el vaso sanguíneo ha sido reconstituido, el coágulo se disolverá total o parcialmente para conseguir repermeabilizar el vaso. Los tejidos lesionados y el endotelio vascular, liberan t-PA (activador del plasminógeno tisular), encargado de transformar el plasminógeno en plasmina (fibrinolisina), encargada de digerir el coágulo, proceso conocido como *fibrinólisis*. La plasmina será rápidamente

inhibida por la α -2-antiplasmina y de forma más lenta por la α -2-macroglobulina (Mateo et al, 2001).

El nuevo modelo molecular de la coagulación, pretende integrar las vías intrínseca, extrínseca, común y el proceso de fibrinólisis, en un solo proceso que ocurre de manera lineal y escalonada. Así, la vía extrínseca, iniciada por el factor VII y el factor tisular, correspondería a la actual *fase de iniciación*, en la cual se producen pequeñas cantidades de trombina y una activación plaquetaria que, a través de múltiples ciclos repetitivos de retroalimentación positiva sobre la vía intrínseca y común culmina en la generación de grandes cantidades de trombina, fase a la que se ha llamado *amplificación*. Luego vendría la fase de fibrinogénesis y agregación plaquetaria, llamada *propagación* (Figura 8) (Alvarado Arteaga, 2013).

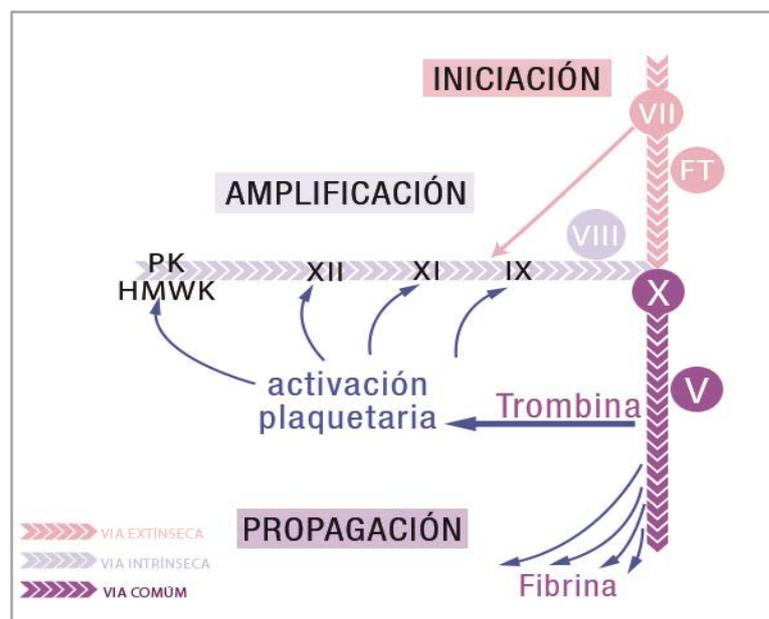


Figura 8. Modelo molecular actual de la coagulación. Entendido como fases consecutivas de un mismo mecanismo lineal escalonado (Alvarado Arteaga, 2013).

I.3.3.4. Mecanismos reguladores

La hemostasia está regulada fundamentalmente por dos mecanismos:

- Los inhibidores de serín-proteasas: que inhiben los factores activados: anti-trombina, cofactor II de la heparina, inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI),

α 2-macroglobulina, inhibidor de la proteína C activada, inhibidor del C1-esterasa, α 2-antiplasmina y α 1-antitripsina.

- Los reguladores de los cofactores activados: vía de la proteína C (proteína C, proteína S y trombomodulina).

A continuación, haremos una breve descripción de cada uno de los mecanismos reguladores de la hemostasia (Mateo et al, 2001):

- a. La *antitrombina (AT)*, es un inhibidor de serín-proteasas sintetizado en el hígado. Su función principal es inhibir la trombina y el factor Xa, pero también inactiva los factores IXa, XIa, XIIa, VIIa unido al factor tisular, calicreína y plasmina. El efecto inhibitorio puede verse incrementado hasta 1000 veces en presencia de heparina.
- b. El *cofactor II de la heparina*, también es un inhibidor de serín-proteasas. Presenta homología con la AT, pero a diferencia de esta, solo es capaz de inhibir a la trombina.
- c. La actividad anti-coagulante del *inhibidor de la vía del factor tisular* radica en la formación inicial de un complejo binario: Xa-TFPI, que se unirá a los factores VIIa-FT, anulando la actividad catalítica de los tres factores.
- d. La *trombomodulina (TM)*: es una proteína integral de membrana, se encuentra en diferentes tejidos como placenta, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células musculares, capilares, venas y arterias. Su actividad consiste en neutralizar la actividad de la trombina, impidiendo que esta transforme el fibrinógeno en fibrina.
- e. La *proteína C*, es una glucoproteína vitamina-K dependiente de síntesis exclusivamente hepática. Necesita ser activada por la trombina, actuando la trombomodulina como cofactor. Actúa inactivando los factores Va y VIIIa, utilizando para ello, la proteína S y el propio factor V como cofactores.
- f. La *proteína S*, también es una glucoproteína vitamina K dependiente, de síntesis principalmente hepática, pero también hay cierta producción en megacariocitos y células endoteliales. El calcio es fundamental para esta proteína ya que por un lado evita ser degradada por la trombina y por

otro este ión induce un cambio conformacional necesario para que esta proteína pueda actuar como cofactor de la proteína C.

- g. La $\alpha 1$ -antitripsina inhibe el factor XIa.
- h. El *inhibidor del C1-esterasa* neutraliza los factores de contacto.
- i. La $\alpha 2$ -antiplasmina inhibe la calicreína, los factores XIIa, XIa y la trombina.

Todos los anti-coagulantes anteriormente descritos son fisiológicos. Encontramos otros no fisiológicos como el citrato, oxalato, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), fluoruros y mezcla de Wintrobe que actúan principalmente quelando el calcio y fármacos como la heparina, anticoagulantes orales y los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES).

Existen los denominados anticoagulantes intravasculares patológicos como son el anticoagulante lúpico, anticuerpo antifosfolípido dirigido contra los factores de la coagulación, que reacciona *in vitro* con epítomos de fosfolípidos, alterando los tiempos de la coagulación (TTPA, IQ...) y los anticuerpos anticardiopina, que se unen gracias a los fosfolípidos, a diferentes proteínas (B2 glicoproteína, protrombina, anexina V y cadiolipina). Se ha observado que *in vivo* incrementan el riesgo de desarrollar trombosis y su elevada concentración en sangre se ha relacionado con abortos de repetición (Mateo et al, 2001).

I.4. CMM Y SU EFECTO SOBRE LA COAGULACIÓN

Su capacidad de auto-renovación temporalmente ilimitada y el potencial de diferenciación en otros tipos celulares, así como sus excelentes propiedades inmunomoduladoras, han hecho que, en los últimos años, las células madre se postulen como una excelente opción terapéutica para la cura de numerosas patologías. Así, son numerosas las publicaciones sobre las aplicaciones de las células madre en el campo de la medicina regenerativa, y su uso para la restauración de tejidos y órganos en pacientes con enfermedades graves (Mahla, 2016; Srivastava et al, 2017).

La mayoría de los estudios clínicos y pre-clínicos en terapia celular, utilizan la vía de infusión intravenosa, debido a su fácil acceso, amplio volumen y distribución celular (Harting et al, 2009). Sin embargo, poco se conoce a cerca de la seguridad tras la infusión de estas células. Aunque hasta la fecha, han sido pocos los eventos adversos descritos por tratamiento con CMM de médula ósea, parece que tras la administración intravenosa tienden a acumularse en los capilares pulmonares, pudiendo potencialmente producir trombosis, sobre todo a dosis altas (Schrepfer et al, 2007).

En 2003, dos autores de manera independiente: Vulliet y Barbash, describieron episodios de infarto de miocardio tras administración intravenosa de CMM, el primer autor en perros y el segundo en ratas (Vulliet et al 2003 y Barbasch et al, 2003). Posteriormente en 2006, Freyman y colaboradores, observaron una disminución del flujo sanguíneo distal en el sitio de infusión tras administración intracoronaria de CMM para la reparación de un miocardio infartado (Freyman et al, 2006). Un estudio parecido fue llevado a cabo dos años más tarde, donde altas tasas de injerto cerebral se asociaron a un bloqueo del flujo sanguíneo (Walczak, 2008).

Actualmente, en todo el mundo se están realizando cientos de ensayos clínicos de terapia celular con CMM humanas autólogas y alogénicas (de médula ósea principalmente). En la mayoría de los casos, a los pacientes receptores se les administra 1×10^6 CMM/Kg, aunque las cantidades varían de $1-15 \times 10^6$ CMM/kg. La gran cantidad de CMM necesarias para los trasplantes, hace necesaria la expansión *in vitro* mediante cultivos y además controlar la seguridad de su administración intravenosa, ya que puede producir efectos adversos.

Por otro lado, algunos ensayos clínicos en fase III han fallado por la baja eficacia de las CMM (Ankrum et Karp, 2010), probablemente por la baja supervivencia asociada a las células madre. Todo ello, hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias que mejoren el efecto terapéutico en terapia celular con CMM.

Clásicamente, se ha descrito que las CMM pueden, al menos temporalmente, evadir el rechazo inmune cuando se trasplantan alogénicamente. Pero, cada vez más estudios describen reacciones incompatibles entre las CMM administradas sistémicamente y la

sangre de los receptores (Moll et al, 2012). Estos estudios sugieren que las reacciones por incompatibilidad iniciadas por las CMM después de la infusión intravenosa tienen un efecto negativo en la eficacia de la terapia celular. Por lo tanto, el estudio y modificación de los factores que afectan a la terapia celular con CMM podría ser un enfoque alternativo para mejorar la eficacia.

En cuanto a la causa que hace que las CMM produzcan eventos trombóticos, existen varias hipótesis. Por un lado, se ha descrito que el tamaño, relativamente grande de estas células, puede contribuir a la oclusión de los vasos, que en general presentan un calibre estrecho, lo cual produce un atrapamiento de las CMM, que disminuye el flujo sanguíneo, favoreciendo episodios de trombosis (Furlani et al, 2009). Otros autores, señalan como responsable de la actividad procoagulante de las CMM, al factor tisular (FT), altamente expresado a nivel del RNA mensajero y situado en la superficie de estas células (Tatsumi, 2013). Así, las CMM cultivadas *in vitro* expresan factores procoagulantes como el FT, colágeno1A y fibronectina1, que podrían iniciar la cascada de la coagulación cuando se infunden por vía intravenosa (Moll et al, 2012; Tatsumi et al, 2013). Muchos estudios, han demostrado como la administración concomitante de un activador de anti-trombina (como la heparina) o un inhibidor directo del factor Xa ó de la trombina es efectivo para contrarrestar el efecto procoagulante de las CMM (Stephene, 2012; Gleeson, 2015; Moll, 2015; Liao et al, 2017) e incluso han descrito que puede estar relacionado con una mayor eficacia (Liao et al, 2017).

El FT, también conocido como factor III de la coagulación, es un receptor transmembrana (CD142) del factor circulante VII/VIIa que normalmente solo se expresa en tejidos extravasculares. Ligando y receptor están separados en vasos intactos, pero si por una injuria vascular queda expuesto el espacio subendotelial, el FT, entra en contacto con la sangre y forma el complejo FT/VIIa, iniciando la vía extrínseca de la coagulación (Mackman, 2009). El FT también se expresa en células endoteliales y leucocitos activados. Además, el FT puede ser transferido a plaquetas a través de las micropartículas, produciendo su activación.

Como se ha comentado previamente, las CMM en cultivo, expresan FT, por lo que pueden alterar la hemostasia a las dosis usadas en clínica (Ra et al, 2011; Furlani et al,

2009). La expresión de FT es diferente según las condiciones de cultivo y el origen celular. Moll et al (2012) publicaron el principal trabajo en este ámbito realizado con CMM de médula ósea en 44 pacientes que recibieron esta terapia como tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Las conclusiones más importantes de este estudio fueron que, si bien *in vitro* se observaba una actividad procoagulante en este tipo de células, sobre todo derivada de la expresión del FT, *in vivo* ninguno de los pacientes padeció ningún efecto adverso durante la infusión ni posteriormente. Fue interesante que en las pruebas de sangre posteriores a la infusión se observara un aumento de los complejos trombina-antitrombina mediante ELISA, un descenso de plaquetas y un aumento de la fracción del complemento C3, de manera significativa, lo que estaría en relación con la actividad procoagulante observada *in vitro*. Recientemente, se ha observado cómo no todas las CMM son equivalentes, así lo demuestra el estudio realizado por Christy y colaboradores, donde células madre de tejido adiposo demostraron tener mayor expresión de factor tisular y con ello una actividad procoagulante mayor en comparación con otras células madre como las de médula ósea (Christy et al, 2017). También se ha descrito que las CMM de médula ósea expresan menos FT que las células deciduales estromales derivadas de placenta (Moll et al, 2015). Probablemente, el uso en los primeros estudios de terapia celular de CMM de médula ósea principalmente, junto con dosis menores a las actuales, evitó estos eventos trombóticos. Actualmente el uso de otras fuentes como la grasa y de mayores dosis (buscando más eficacia), han hecho aumentar los efectos adversos de estos ensayos. La regulación de la expresión del FT es compleja, habiéndose descrito numerosas sustancias o circunstancias que aumentan o disminuyen su expresión (Ruf & Riewald, 2000-2013). Por otro lado, se ha observado que los medios de cultivo contienen factores que alteran la expresión del FT, sobre todo en el suero o lisado plaquetario como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF (del inglés: *platelet derived growth factor*) (Gebhard et al, 2010).

Actualmente, se conoce muy poco de la interacción plaqueta-CMM y del papel de las plaquetas en la adherencia e injerto de las CMM. Aunque no está demostrado, es posible que la trombina generada por la estimulación de la coagulación a través del FT de las CMM, se una al receptor PAR-1 presente en las plaquetas, las active y estimule su agregación y secreción (Kahn, 1998; Leger, 2006). Del mismo modo, las plaquetas

una vez activadas, permiten en su superficie el desarrollo de la cascada de la coagulación. Así, Liao y col en el 2008, publica que tras infusión de CMM derivadas de médula ósea, se produce una disminución de los factores de la coagulación y además también observa una disminución del número de plaquetas.

Por otro lado, Agis y colaboradores, describen en 2008 como las plaquetas activadas aumentan la actividad fibrinolítica de las CMM, mediante la estimulación del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (Agis, 2008).

Algunos estudios sugieren que, tras la infusión intravenosa de las CMM, las plaquetas pueden tener un papel en el reclutamiento e injerto de las CMM en el sitio de la lesión (Teo et al, 2015). En un modelo de hipertensión arterial pulmonar en ratas, se vio que el depósito de CMM en los pulmones dependía de la activación plaquetaria y era mediado por P-selectina y la glicoproteína GPIIb-IIIa (integrina α I**IIb** β 3) (Jiang et al, 2012).

II. JUSTIFICACIÓN

II. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, la medicina regenerativa, representa una nueva promesa en el campo de la ciencia encargada de restaurar órganos y/o tejidos lesionados. Las células madre mesenquimales (CMM), son excelentes candidatas para su uso en terapia celular, por su gran potencial inmunomodulador y regenerativo, demostrado en estudios *in vitro* y preclínicos. En cuanto a la fuente de obtención, las CMM de tejidos extra-embrionarios, como las CMM de líquido amniótico (CMM-LA), han demostrado presentar excelentes ventajas frente a las células madre embrionarias (CME) y células madre adultas (CMA), eliminando los problemas éticos de las CME al obtenerse de los tejidos desechados en el parto y al presentar un potencial de proliferación y diferenciación aparentemente mayor que las CMA. Además, las CMM-LA, han demostrado tener características inmunomoduladoras, antiinflamatorias, así como baja inmunogenicidad y teratogenicidad en trasplantes *in vivo* (Rennie et al, 2012).

La mayoría de los estudios clínicos y pre-clínicos en terapia celular, utilizan la vía de infusión intravenosa, debido a su fácil acceso, amplio volumen y distribución celular (Harting et al, 2009). Sin embargo, poco se conoce a cerca de la seguridad tras la infusión de estas células. Estudios recientes han demostrado que las CMM pueden interferir en el proceso hemostático tras ser administradas por vía intravenosa, produciendo reacciones adversas trombóticas (Furlani, 2009; Moll et al, 2012; Tatsumi et al, 2013). Esta acción se atribuye a la expresión del factor tisular (FT) en la superficie de las CMM, el cual desencadena la activación de la vía extrínseca de la coagulación, produciendo finalmente trombina (Gleeson, 2015). Recientemente, Christy y colaboradores han observado que las células madre de tejido adiposo tienen mayor expresión de FT y con ello una actividad procoagulante mayor en comparación con otras células madre como las de médula ósea (Christy et al, 2017). Probablemente, el uso en los primeros estudios de terapia celular de CMM de médula ósea principalmente, junto con dosis menores a las actuales, evitó estos eventos trombóticos. Actualmente el uso de otras fuentes como la grasa y de mayores dosis (buscando más eficacia), han hecho aumentar los efectos adversos de estos ensayos.

Aunque no está demostrado, es posible que la trombina generada por la estimulación de la coagulación a través del FT de las CMM, produzca a su vez activación y agregación plaquetaria. A su vez, las plaquetas una vez activadas, permiten en su superficie el desarrollo de la cascada de la coagulación. Así, Liao y col en el 2008, publica que tras infusión de CMM derivadas de médula ósea, se produce una disminución de los factores de la coagulación y además también observa una disminución del número de plaquetas. Pero no se ha estudiado previamente, si independientemente de la estimulación de la hemostasia secundaria, existe un efecto directo de las CMM sobre la función plaquetaria.

Por otro lado, algunos ensayos clínicos en fase III han fallado por la baja eficacia de las CMM (Ankrum et Karp, 2010), probablemente por la baja supervivencia asociada a las células madre. Clásicamente, se ha descrito que las CMM pueden, al menos temporalmente, evadir el rechazo inmune cuando se trasplantan alogénicamente. Pero, cada vez más estudios describen reacciones incompatibles entre las CMM administradas sistémicamente y la sangre de los receptores (Moll et al, 2012). Estos estudios sugieren que las reacciones por incompatibilidad iniciadas por las CMM después de la infusión intravenosa tienen un efecto negativo en la eficacia de la terapia celular. Actualmente, se conoce muy poco de la interacción plaqueta-CMM y del papel de las plaquetas en el papel inmunomodulador, la adherencia e el injerto de las CMM. Algunos estudios sugieren que, tras la infusión intravenosa de las CMM, las plaquetas pueden adherirse a las CMM y tener un papel en su reclutamiento e injerto en el sitio de la lesión (Teo et al, 2015). Por lo tanto, el estudio de la interacción plaqueta-CMM podría ser un enfoque alternativo para mejorar la eficacia de la terapia celular.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

Las células madre derivadas mesenquimales de líquido amniótico (CMM-LA) modifican la función plaquetaria, independientemente de su efecto sobre la hemostasia secundaria.

OBJETIVO PRINCIPAL:

Evaluar *in vitro*, el efecto directo de las CMM-LA sobre la función plaquetaria.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Aislar, cultivar y caracterizar CMM-LA obtenidas de partos a término.
2. Analizar el efecto de las CMM-LA sobre la agregación, adhesión y activación plaquetaria.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. CULTIVOS CELULARES

En **Anexo 2** se describen de forma detallada los medios de cultivo, reactivos y equipos utilizados.

IV.1.1. Obtención de la muestra de líquido amniótico

Las muestras de líquido amniótico (LA) se obtuvieron a partir de 10 cesáreas programadas de embarazos a término (semana 37-40) de madres sanas, con edades comprendidas entre 20 y 40 años. Las cesáreas fueron realizadas por el Servicio de Ginecología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) de Murcia. Siguiendo la legislación vigente, Título II de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, el LA fue obtenido tras la firma del Consentimiento Informado por parte de las donantes (**Anexo 3**) y previa autorización del estudio por el Comité de Bioética del HCUVA (CEIC, **Anexo 4**), cumpliendo con el título V de la Ley anteriormente citada.

La extracción del LA, se realizó mediante punción tras el corte de la pared uterina, justo antes de la ruptura del saco gestacional. Bajo condiciones de asepsia, el ginecólogo extrajo el LA en una jeringa de 20 mL y la depositó en un tubo Falcon de 50 mL para su posterior procesamiento. Las muestras de LA se transportaron al Instituto Murciano de Investigación Biomédica Virgen de la Arrixaca (IMIB-Arrixaca), donde fueron procesadas (30-60 minutos tras la extracción) en el laboratorio de cultivos celulares.

IV.1.2. Aislamiento y cultivo de CM derivadas de LA

Las células madre mesenquimales de líquido amniótico (CMM-LA), se aislaron y cultivaron a partir de las muestras de LA. En primer lugar, se valoró la calidad y el aspecto de la muestra obtenida de LA, comprobando su color y transparencia. Aquellas muestras rojizas o con coágulos fueron desechadas. Para eliminar los restos de hematíes, se realizó previamente al aislamiento de CMM, una lisis celular mediante un

fenómeno de ósmosis (plasmólisis) que permite la ruptura de las paredes de los hematíes por diferencia de concentraciones. Posteriormente se sembraron las células en frascos de cultivo y tras 3-4 pases se obtuvo una población homogénea de células madre mesenquimales (CMM). Todo el procedimiento se realizó en una Cabina de Flujo Laminar tipo II, en el laboratorio de cultivos celulares del Instituto de Investigación Biomédica.

Procedimiento:

1. Se mezclan 5 mL de la muestra de LA con 25 mL de agua bidestilada estéril y se centrifugan 10 minutos a 500 g a temperatura ambiente (25 °C).
2. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular (*pellet*) en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) suplementado con 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL/Estreptomicina. Se centrifuga a 500g durante 10 minutos, obteniendo finalmente el *pellet* celular, que se resuspende con un medio de cultivo específico para cultivo primario de células de LA (*Amniomed Plus*), sembrándolo en un frasco de 25 cm². Los cultivos se mantienen a 37 °C, 5 % CO₂ y humedad relativa del 95 %.
3. El seguimiento del cultivo se realiza mediante un microscopio óptico equipado con contraste de fases y una cámara digital. Cada 48-72 horas se realiza un cambio de medio con resiembra del sobrenadante centrifugado. Consideramos a este cultivo como pase 0.
4. Entorno al día 15 comienzan a aparecer las primeras colonias, momento en el cual se realiza un pase. Tras lavar con PBS, se despegan las células con una solución enzimática de tripsina-EDTA (ampliado en apartado 1.3 de material y métodos) y se siembran en un frasco de cultivo de 25 cm² en medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) bajo en glucosa suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de glutamina y 15 % de suero bovino fetal (SBF). Llamamos a este medio, “*medio DMEM completo*”. Consideramos a este cultivo como pase 1. Aproximadamente, se obtienen 1x10⁶ de células/frasco de 25 cm² en pase 1.
5. Cuando el cultivo alcanza la confluencia del 80-90% se realiza un nuevo pase (pase 2) y así sucesivamente hasta alcanzar el número de células adecuado para los experimentos. En general se utilizarán las CMM-LA en pase 4-6.

IV.1.3. Mantenimiento de cultivo, pase y tripsinización

Cuando las células han alcanzado alrededor del 80-90 % de confluencia, es necesario realizar un pase. Es decir, pasar las células a un nuevo frasco reduciendo la densidad celular para que puedan continuar replicándose.

Procedimiento:

1. Descartamos el sobrenadante del frasco de cultivo, lavamos 3 veces con 5 mL PBS, y añadimos 2 mL de tripsina-EDTA (0,25 %), dejando incubar durante 3 minutos a 37 °C, para facilitar el desprendimiento de las células del frasco de cultivo. Este proceso se conoce como “tripsinización”. Una vez transcurridos los 3 minutos, observamos al microscopio que las células se han despegado, por lo que se procede a inactivar la tripsina con 6 mL de medio de cultivo suplementado con SBF al 10 %.
2. La mezcla es transferida a tubos Falcon de 50 mL y centrifugada a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de DMEN bajo en glucosa para poder realizar el conteo celular en cámara de Neubauer con el colorante vital azul tripán.
3. Finalmente se siembra en nuevos frascos de cultivo (dilución 1:2) y se incuba a 37 °C, 5 % de CO₂ y una humedad relativa del 95 %.

IV.1.4. Recuento y viabilidad celular

El recuento celular se realiza en cámara de Neubauer, también conocida como hemocitómetro. El modo de recuento, consiste en mezclar una proporción 1:1 de suspensión celular con azul de tripán. El azul de tripán es un colorante azoico que no atraviesa la membrana de las células vivas, observándose éstas como células transparentes y birrefringentes, pero si atraviesa la membrana de las células muertas, tiñéndolas de color azul.

El hemocitómetro tiene dos cámaras de recuento. La muestra (suspensión de células) se aplica en el borde del cubre y entra por capilaridad al espacio entre porta y cubre, llenando una de las cámaras. La altura de dicho espacio en una cámara de Neubauer es

de 0,1 mm. Hay retículas trazadas en cada cámara de recuento que la dividen en 9 zonas cuadradas, de 1 mm de lado cada una. Si se cuentan las células en los 4 cuadros de las esquinas, el volumen correspondiente es de $4 \times (1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}) = 4 \times 0,1 \text{ mm}^3 = 4 \times 10^{-4} \text{ mL}$.

Entonces se puede calcular la concentración de células como:

$$\text{N}^\circ \text{ células} / (4 \times 10^{-4} \text{ mL}) = \text{N}/4 \times 10^4 \text{ células/mL};$$

Siendo N = n° total de células contadas en las 4 zonas

Calculamos el número de células vivas de la muestra, contando el número de células no azules y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = \text{N}/4 \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

Siendo el factor de dilución = 2, en el caso del azul tripán.

IV.1.5. Capacidad multipotencial de las CM derivadas de LA: estudios de diferenciación *in vitro*

Como se explicó en el apartado de la introducción, las CMM se definen en base a los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, del inglés *International Society on Thrombosis and Haemostasis*). Uno de ellos es la capacidad de diferenciarse *in vitro* a diferentes líneas celulares de la capa germinal cuando se encuentran en las condiciones de cultivo adecuadas. En el caso de las CMM, se estudia la diferenciación a tres tipos celulares de la capa mesodérmica (osteoblastos, adipocitos y condrocitos).

Para ello, las CMM-LA fueron sembradas en pase 3, a una densidad de 10.000 células/cm² en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Posteriormente se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad del 95 %. En los tres procedimientos de diferenciación, se realizó el experimento por duplicado y utilizando los medios específicos requeridos para cada una de ellas, de la casa comercial PromoCell. Como control negativo se utilizaron células cultivadas en medio DMEM “completo” (DMEM bajo en glucosa con antibiótico y SBF).

IV.1.5.1. Diferenciación Adipogénica:

Para probar su capacidad de diferenciación en adipocitos, cuando las CMM-LA alcanzaron el 100 % de confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por un medio específico de diferenciación adipogénica. El control negativo se mantuvo en medio DMEM “completo”. El medio de cultivo fue reemplazado cada 2-3 días por medio nuevo, hasta el séptimo día, momento en que se empezaron a observar pequeñas vacuolas citoplasmáticas cargadas de lípidos. Para probar la diferenciación adipogénica, las células se tiñeron con Oil Red O.

Tinción con el colorante Oil Red O: Partiendo de una solución stock de Oil Red O en isopropanol al 0,5 %, se preparó una solución a una concentración del 0,3 % en agua destilada. Se retiró el medio de cultivo en todos los pocillos y se lavaron con PBS para posteriormente fijar las células con formaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Tras la fijación, las células se lavaron durante 5 minutos, 3 veces con agua destilada para eliminar el exceso de fijador y posteriormente se añadieron 2 mL de solución Oil Red O, para teñir las vacuolas de los lípidos de color rojo. Tras 20 minutos a temperatura ambiente y manteniendo una agitación débil, las células se lavaron con agua destilada y se observó al microscopio óptico invertido.

IV.1.5.2. Diferenciación Osteogénica:

Para estudiar la capacidad de diferenciación de las CMM-LA a osteoblastos, tras obtener una confluencia del 70%, se añadió a los pocillos, el medio de cultivo específico para inducir la diferenciación osteogénica. El suplemento que se añade al medio DMEM contiene ascorbato-fosfato, β -glicerolfosfato y la proteína recombinante BMP-2. El control negativo se mantuvo en medio DMEM “completo” sin suplemento osteogénico. Cada 2-3 días, y durante un periodo de 17 días se cambió el medio de cultivo.

Para probar la capacidad de diferenciación osteogénica se utilizaron 2 técnicas:

- a) Tinción de los depósitos de calcio con el colorante Alizarin Red: Para la detección de los depósitos de calcio formados durante la diferenciación

osteogénica, tras retirar el medio de cultivo pasados los 17 días y lavar con PBS, las células fueron fijadas con metanol a -20 °C durante 5 minutos, retirando a continuación el exceso del fijador con varios lavados de agua destilada. La solución de Alizarin Red, en concentración 28 mg/mL, fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente y manteniendo una agitación constante. Tras retirar el exceso de colorante, con agua destilada, se observó al microscopio óptico invertido.

- b) Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina: Tras fijar con metanol a -20 °C y realizar los correspondientes lavados con agua destilada, las células fueron incubadas con el sustrato BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroazul de tetrazolio), durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se observó en el microscopio óptico invertido.

IV.1.5.3. Diferenciación Condrogénica:

Para observar la capacidad de diferenciación de las CMM-LA a condrocitos, tras alcanzar una confluencia del 90 %, se añadió a dos de los pocillos el medio de cultivo DMEM “completo” estándar para las muestras de control y al resto de pocillos el medio de cultivo específico para la diferenciación condrogénica. Se cambió el medio de cultivo cada 2-3 días, hasta el día 17, momento en el que se observó un cambio en la morfología de las células, y se realizó la tinción Azul alcian. Posteriormente se observaron las células al microscopio óptico.

IV.1.6. Caracterización fenotípica de las CM derivadas del LA

La caracterización fenotípica de las CMM, es la detección de proteínas específicas de superficie. Para confirmar la identidad de células madre mesenquimal de las células estudiadas y siguiendo los criterios establecidos por la ISCT para las CMM, por citometría de flujo se estudiaron los marcadores mesenquimales (CD90, CD73 y CD105), que deben estar presentes en las CMM y los marcadores hematopoyéticos (CD45 y CD34) que deben estar ausentes en las CMM. A continuación, se detallan los

anticuerpos usados para la caracterización fenotípica mesenquimal de las CMM-LA.

Marcadores mesenquimales:

- ✓ CD90 (mouse anti-human)-FITC
- ✓ CD105 (mouse anti-human)-APC
- ✓ CD73 (mouse anti-human)-PE

Marcadores hematopoyéticos:

- ✓ CD45 (mouse anti-human)-FITC
- ✓ CD34 (mouse anti human)-APC

Además, se estudió se mediante citometría la presencia de factores de la coagulación como el factor VIII (FVIII), el factor de von Willebrand (vWF) y el factor tisular (FT, CD142). Por último, se ha estudiado la presencia en la superficie de las CMM-LA de *podoplanina*, una glicoproteína que recientemente se ha relacionado con la interacción plaqueta-CMM. A continuación, se detallan los anticuerpos usados para la detección de estos marcadores.

Marcadores factores coagulación:

- ✓ Factor Tisular (FT) (mouse anti-human)-FITC
- ✓ Factor VIII (FVIII) (sheep anti-human)-FITC
- ✓ Factor von Willebrand (FvW) (mouse anti-human)-Alexa350

Procedimiento:

1. Despegamos las células del frasco de cultivo mediante el método de tripsinización descrito previamente y resuspendemos 1×10^6 células/ 500 μ L de PBS al 1 % SBF.
2. Marcamos 100 μ L de la suspensión celular con los anticuerpos específicos para las CMM-LA, como se detalla en la Tabla 1.
3. Incubamos 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente lavamos con PBS.
4. Centrifugamos 5 minutos a 500 g y decantamos el sobrenadante.
5. Añadimos 400 μ l de PBS y procedemos a su detección en el citómetro de flujo.

Tabla 1. Anticuerpos usados para el estudio fenotípico de las CMM-LA. Se especifica el fluorocromo y la dilución utilizada para cada anticuerpo y el fluorocromo de cada anticuerpo.

ANTICUERPOS	FLUOROCROMO	DILUCIÓN	VOLUMEN Ab (µL)
Blanco	----	----	----
CD90	FITC	[1/10]	5
CD105	APC	[1/10]	5
CD73	PE	[1/10]	5
CD45	FITC	[1/10]	5
CD34	APC	[1/10]	5
FT	FITC	[1/10]	5
FVIII	FITC	[1/10]	5
Podoplanina	APC	[1/10]	5

FITC: Fluorescein isothiocyanate; APC: allophycocyanin; PE: Phycoerythrin

IV.1.7. Análisis de la expresión de RNAm mediante PCR cualitativa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue desarrollada en 1980 por Kary Mullis, suponiendo un antes y un después en la biología molecular. Se trata de una reacción enzimática *in vitro* que amplifica secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) de manera específica. De manera que partiendo de una copia se pueden generar miles de millones de copias. Los elementos claves para llevar a cabo la reacción son el sustrato: ADN o ADN-complementario, producto del RNA mensajero, la enzima: *DNA polimerasa*, los primers, los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio, buffer y agua.

Se trata de una reacción compuesta por 3 etapas:

- **Desnaturalización:** en esta primera fase, se separan las hebras de ADN llevándolas a una temperatura de 95 °C durante aproximadamente 20-30 segundos (dependiendo del contenido de bases).
- **Hibridación:** en esta fase, los primers se incorporan en el extremo 3' a una temperatura de 50-60 °C, quedando lista la secuencia de ADN para ser copiada.

- **Extensión:** el último paso requiere de la *Taq polimerasa*, se encarga de crear la hebra complementaria de ADN añadiendo los nucleótidos correspondientes. En esta fase se mantiene una temperatura constante de 72 °C.

Estos tres pasos se repiten 25-35 veces, con una duración variable en función de la longitud de la región de ADN que se quiere copiar. Finalmente, los amplicones serán visualizados por electroforesis en gel de agarosa expuesto a luz ultravioleta (UV). Esta técnica, genera una corriente eléctrica que separa los ácidos nucleicos en función de su carga y tamaño (Tamay de Dios L, 2013).

Procedimiento:

1. Obtención del RNA. Se utilizó el Kit de extracción de RNA de Sigma, en el cual se realizan los siguientes pasos:
 - a) Partiendo de $2-3 \times 10^6$ de células, se despegan con tripsina y se centrifugan a 500 g durante 5 minutos. Se lavan con PBS y centrifugan a 500 g durante 5 minutos.
 - b) Se añaden 350 μL de buffer de lisis (RLT) y se agitan con ayuda de un vortex. Se añade 250 μL de etanol al 70 % y se transfiere el contenido de la muestra a una columna *RNeasy Mini spin column* ubicada en un tubo de 2 mL. Se centrifuga 15 segundos a 8000 g.
 - c) Se añaden 500 μL de buffer de lavado (RPE) y se centrifuga 15 segundos, 8000 g.
 - d) Se añaden 500 μL de buffer RPE y se centrifuga 2 minutos a 8000 g.
 - e) Trasladamos la columna *RNeasy Mini spin column* en un tubo nuevo de 1,5 mL y se añade 30 μL de agua libre de RNasa. Centrifugar 1 minuto a 8000 g, obteniendo finalmente el RNA.
2. Cuantificación del RNA: Para la cuantificación de las muestras de RNA se utilizó un espectrofotómetro para micromuestras (Nano Drop). Una vez medida la concentración (ng/ μL) por el equipo, hacemos el cálculo para obtener 1 μg de RNA y así realizar el siguiente protocolo.

3. Transcripción inversa del RNA: obtención de cDNA: se utilizó el kit de BioRad “iScrip cDNA Synthesis”, en el cual se realizan los siguientes pasos:
 - a) En un eppendorf con 1 µg de RNA, se añade (hasta un volumen total de 20 µL), los siguientes reactivos: 4 µL master mix; 1 µL *transcriptasa reversa*; (variable) µL nucleasa libre de agua; (variable) µL de RNA.
 - b) A continuación, se incuba la muestra en el termociclador: 5 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C, finalmente mantener a 4 °C hasta el siguiente paso.

4. Realización de la mezcla del cDNA con los reactivos, para realizar la PCR cualitativa: Para preparar el “mix” se mezclan los siguientes reactivos:
 - 5 µL Buffer (10X)
 - 2,5 µL MgCl₂ (10 mM)
 - 2 µL dNTPs
 - 2 µL Primers (F+R)
 - 0,5 µL *polimerasa*
 - 12 µL H₂O
 - 1-2 µL cDNA

5. Incubación en el termociclador: se siguen los siguientes pasos:
 - a) 94 °C durante 4 minutos
 - b) 94 °C durante 1 minuto
 - c) 58 °C durante 1 minuto
 - d) 72 °C durante 1 minuto
 - e) 72 °C durante 10 minutos
 - f) pasos b, c y d se repiten 40 ciclos.

6. Revelado: se prepara el gel de agarosa al 1,5 % en buffer TBE 1x, se carga con el producto de PCR y se revela. Para la preparación del gel de agarosa, se siguen los siguientes pasos:
 - a) Añadir 100 µL de tampón TBE al 1 % a 1,5 gramos de agarosa.
 - b) Calentar hasta que se disuelva.
 - c) Dejar enfriar hasta alcanzar los 60 °C.
 - d) Añadir Red Safe (5 µL por cada 100 mL).

- e) Verter el contenido del gel en una cubeta de electroforesis y dejar enfriar hasta solidificar. Una vez solidificado el gel rellenar con tampón de electroforesis.
- f) Realizar la electroforesis a 120 voltios durante 40 minutos.
- g) Una vez completada la electroforesis, revelar el gel bajo la luz UV.

IV.1.8. Inmunofluorescencia: detección del FVIII y vWF

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación, basada en la capacidad que tienen los anticuerpos de unirse específicamente a una determinada molécula. En este caso, el anticuerpo lleva unido químicamente una sustancia fluorescente llamada fluorocromo que al ser excitado a una determinada longitud de onda, emite una señal que será detectada por un microscopio de fluorescencia.

Procedimiento:

1. Se las células se lavan dos veces con PBS durante 5 minutos.
2. Se fijan con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 20 minutos/ T^a ambiente. Posteriormente se lava con PBS 15 minutos y luego 3 lavados de 5 minutos.
3. Se permeabiliza y bloquea durante 45 minutos con tritón 0,3 %, SBF 10 %, BSA 0.3 % en PBS.
4. Añadimos el anticuerpo primario (300µl): Para el FVIII y para el vWF en la solución: PBS con SBF 1 %, BSA 0.3 % y tritón 0.1 %. Lo dejamos toda la noche a 4 °C.
5. Al día siguiente, quitamos el anticuerpo, con lavados de PBS con SBF 1%, BSA 0.3 % y tritón al 0.1 % (3-6 lavados/ 5 minutos).
6. Añadimos el anticuerpo secundario (300µl) conjugado con fluoróforo específico: anti-mouse Rhodamina para el vWF y un anti-mouse Alexa 488 para el FVIII (a una dilución 1:200 en PBS, SBF y tritón 0.1 %, por 1 hora/ T^a Ambiente.
7. Retiramos el anticuerpo y hacemos 3-6 lavados/ 5 minutos con PBS y SBF 1%. Marcamos con Dapi (a una dilución 1:10) en PBS, incubar 2 minutos a 4 °C.
8. Lavamos 3 veces con PBS.
9. Montamos con “moviol” en un porta-objetos y se dejando secar 1-2 horas, para luego observar en el microscopio óptico de fluorescencia.

IV.2. ENSAYOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

IV.2.1. Muestra de sangre

Las muestras de sangre fueron extraídas mediante venopunción antecubital, en voluntarios sanos, tras la firma del Consentimiento Informado (Anexo).

Los voluntarios cumplieron los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Personas con edad comprendida entre 29-55 años.
- Con hemograma normal: hemoglobina > 12 g/dL en mujeres y 13 g/dL en hombres. Recuento plaquetario entre 150.000 y 400.000/mm³, recuento leucocitario entre 6.000 y 11.000/mm³.

Criterios de exclusión:

- Personas con patología conocida.

Todas las personas que participaron en el estudio, recibieron las siguientes recomendaciones:

- Al menos 24 horas sin haber realizado ejercicio físico.
- No fumar, ni beber café una hora antes de realizar la extracción sanguínea.
- No haber tomado anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), al menos 15 días antes de la extracción sanguínea.

AINES: Aspirina (ácido acetilsalicílico), celebrex (celecoxib), neobrufen (ibuprofeno), naproxeno, voltarén (diclofenaco), toradol (ketorolaco), indometacina, salicilatos.

- No haber tomado paracetamol, al menos 48 horas antes de la extracción.

La muestra fue extraída siempre por enfermeras expertas, con aguja del nº 21 y sin el uso del compresor o torniquete, todo ello para minimizar la estimulación plaquetaria. Los primeros mililitros (2,5 ml) se usaban para las determinaciones necesarias del proyecto que no fuesen el estudio directo de funcionalidad plaquetaria, como por ejemplo la realización del hemograma (Recomendaciones de la *International Society on Thrombosis and Haemostasis/ISTH*).

En todo momento es necesario procesar la muestra con cuidado para evitar la activación plaquetaria por la propia manipulación. Por ello, tras la extracción se deja reposar la sangre 15 minutos para su estabilización. Además, los estudios de función y activación plaquetaria se deben hacer lo más rápidamente posible después de la extracción de la sangre (no se debe exceder las 3 horas).

En algunos experimentos en los que no se puede procesar inmediatamente la muestra, se fija la suspensión diluida con 1 ml de paraformaldehído al 2 % en PBS y se mantiene a 4-8 °C durante 24-48 horas. Esto permite el estudio de la expresión de marcadores de activación plaquetaria en respuesta a un agonista plaquetario, ya que las plaquetas de las muestras fijadas pueden marcarse con anticuerpos monoclonales para su estudio mediante citometría de flujo.

Según la técnica utilizada, se mezcla la sangre extraída con diferentes anticoagulantes: EDTA, citrato sódico o hirudina.

- 3 mL de sangre en tubo con EDTA (0,342 mol/L) (los primeros mL de la extracción) para realización del recuento plaquetar (hemograma) mediante el analizador hematológico Cell tax (Nihon Kohden).
- 3 mL de sangre en tubo citrato al 3,2 %, para estudio plaquetar mediante sistema PFA-100 System Siemens, donde se mide el tiempo de obturación al adicionar 800 µL de sangre del paciente en cada uno de los 2 pocillos donde se encuentra el kit del agonista (COL/EPI y COL/ADP).
- 3 mL de sangre con citrato al 3,2 %, para el estudio de la hemostasia secundaria mediante el sistema ACL TOP 700 (Instrumentation Laboratory).

- 3 mL en tubo con hirudina (15 µg/mL) y 3 mL en tubo citrato al 3,2 % para estudio plaquetar (en sangre entera) por impedancia mediante el Sistema Multiplate Analyzer Roche, utilizando 20 µL de concentraciones crecientes de CMM-LA o diferentes agonistas (ADP, TRAP) en 300 µL sangre.
- 3 mL de sangre en tubo citrato al 3,13 %, para el estudio de la agregación, activación plaquetaria (expresión de P-selectina) y calcio citosólico mediante citometría de flujo con el sistema FACSCanto o Accuri C6 (ambos de BD Biosciences).

IV.2.2. Parámetros analizados.

Para el estudio de la función plaquetaria, se midieron las siguientes variables:

- **Contaje plaquetar** (n° plaquetas/µL), mediante hemograma en sangre anticoagulada con EDTA.
- **Tiempo de obturación** (s), mediante PFA-100. Medida global de la adhesión, activación y agregación plaquetaria en respuesta a agonistas, en sangre entera anticoagulada con citrato sódico. Esta prueba se equipara al tiempo de sangría.
- **Agregación plaquetaria**, estimada como:
 - Disminución del n° de plaquetas en respuesta a CMM-LA o agonistas (%), mediante citometría de flujo en sangre entera anticoagulada con citrato sódico.
 - Cambios en impedancia en respuesta a CMM-LA o agonistas (AUC o área bajo la curva, velocidad de agregación o agregación máxima), mediante agregómetro Multiplate en sangre entera anticoagulada con citrato sódico o hirudina.
- **Expresión de P-selectina** en respuesta a CMM-LA o agonistas (IF, intensidad de fluorescencia), mediante citometría de flujo en sangre entera anticoagulada con citrato sódico.
- **Niveles de Ca²⁺ citoplasmático** (IF), mediante citometría de flujo en sangre entera anticoagulada con citrato sódico o hirudina y diluida 1/100 en tampón Tyrode modificado.

V.2.3. Adhesión y agregación plaquetaria por PFA-100

En 1985, Kratzer y colaboradores, desarrollaron una nueva forma de evaluar la hemostasia primaria, mediante un sistema que simula la hemostasia primaria *in vitro*, conocido bajo las siglas PFA-100 (Analizador de la Función plaquetaria) (Figura 9). Este analizador, con obtención de resultados en 10 minutos, consta de un instrumento informático (microprocesador y software) y estuche de reactivos, con dos variedades: colágeno/epinefrina o colágeno/ADP. Los cartuchos son desechables, de uso único y constan de tres piezas: un capilar, un reservorio para la muestra y una membrana con actividad bioquímica que presenta una abertura central. La muestra requerida, sangre anticoagulada con citrato de sodio al 3,2 %, será aspirada a través del capilar, entrando en contacto con la membrana bioquímica del cartucho, la cual está revestida bien de colágeno/epinefrina o colágeno/ADP, agonistas plaquetarios que producen adhesión, activación y agregación plaquetaria. Una vez en la cubeta, la sangre completa citratada, es aspirada (se somete a un alto estrés) a través de un capilar que finaliza en una membrana revestida de colágeno, en la cual hay una apertura microscópica de 147 μm , que se rellena con ADP o epinefrina. Un trombo rico en plaquetas rellena este orificio, debido al estrés y los agonistas. El tiempo que necesitan las plaquetas para ocluir este orificio se define como Tiempo de Obturación (TO), que representa una medida de la hemostasia global relacionada con las plaquetas (Martínez-Arias, 2015; Campuzano-Maya, 2013).

Mediante el sistema PFA-100 se procesaron muestras anticoaguladas con citrato sódico y se determinó el tiempo de obturación (TO) en condiciones basales y tras la incubación con CMM-LA (150.000 y 300.000 células/mL de sangre) durante 15 minutos y a 37 °C.



Figura 9. Analizador PFA-100.

Procedimiento:

1. Se obtiene la muestra de sangre en un tubo BD Vacutainer® con citrato sódico 3,2 %. Una vez obtenida la sangre se deja reposar 15-30 minutos a temperatura ambiente.
2. Se mezcla la sangre invirtiendo suavemente el tubo de extracción (3-4 veces).
3. Pasados 10 minutos (sin dejar más de 2 horas), sujetando el soporte con los cartuchos sobre una superficie plana, se procede al pipeteo de la muestra.
4. El resultado de la prueba se muestra como “*tiempo de obturación*” (TO), expresado en segundos.

IV.2.4. Multiplate: agregación plaquetaria en sangre entera por impedancia

En 1980 Cardinal y Flower describieron un ensayo para medir por impedancia eléctrica la agregación plaquetaria. Este método consiste en medir la corriente eléctrica entre dos electrodos de platino colocados en una cubeta a 37 °C, en cuyo interior se encuentra la muestra de sangre. Al añadir un agonista, se produce la agregación de las plaquetas en la superficie de los electrodos, impidiendo un paso fluido de la corriente eléctrica, lo cual se traduce en un aumento en la resistencia al flujo de electricidad, que será proporcional a la agregación de las plaquetas (Córdova et al, 2011). La agregación por impedancia se basa en que las plaquetas cuando son activadas exponen receptores que

permiten la adhesión a los electrodos pre-calibrados. Esta adhesión requiere una plena activación de la plaqueta y reproduce los diferentes estados de la activación plaquetar.

El analizador Multiplate®, encargado de determinar la función plaquetaria está compuesto por una pantalla con cinco canales, celda de medición con dos sensores independientes, cada uno de los cuales incorpora dos filamentos de cobre de alta conductividad revestidos de plata y un imán encargado de realizar una agitación constante, pipeta electrónica y diferentes reactivos. El aumento de la resistencia al flujo de electricidad entre los sensores, se registra de manera continua y se expresa mediante el parámetro: área bajo la curva AUC (del inglés: *area under the curve*) expresado en unidades arbitrarias (UA*min o U; conversión: 1 U = 10 UA*min). Además de este parámetro, el analizador Multiplate®, también calcula la máxima agregación o altura de la curva (*agregación*) expresado en % y la pendiente máxima de la curva (*velocidad de agregación*) expresado en UA/min. (Figura 10).

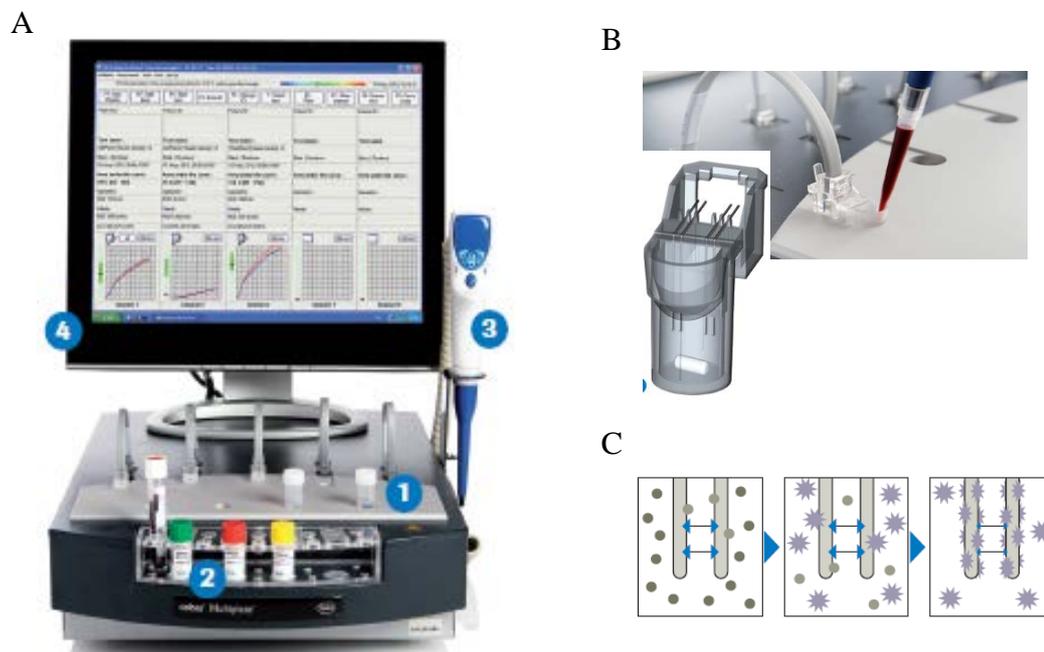


Figura 10. A) Analizador Multiplate ® (Dynabyte medical). B) Cubeta con electrodos. C) Agregación plaquetas en la superficie de los electrodos, tras la adición del agonista.

La agregación máxima y la velocidad de agregación, son parámetros usados preferentemente en investigación, mientras que el AUC se presenta como el parámetro de mayor relevancia para el propósito clínico. El AUC se afecta simultáneamente por la agregación máxima y la velocidad, y por ello se asume que expresa más adecuadamente el funcionamiento general de la plaqueta.

Cada cubeta dispone de dos electrodos, por lo que se realizan 2 mediciones separadas. Ambas curvas deben tener un coeficiente de correlación entre 0,9-1 y una diferencia de la media de ambas curvas es $< 20\%$ para que los resultados sean considerados válidos. En la figura 11 se representa una curva un ejemplo de las curvas de agregación obtenidas y de los parámetros medidos.

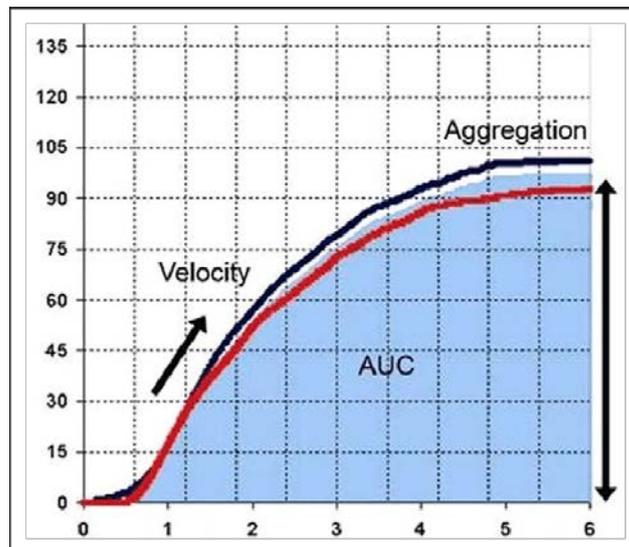


Figura 11. Representación de la agregación plaquetaria en sangre entera obtenida en el sistema Multiplate. Se representa velocidad de agregación (velocity), agregación máxima (Aggregation) y área bajo la curva (AUC).

Procedimiento:

1. Primero se obtiene la muestra de sangre entera, en un Vacutainer ®, con hirudina recombinante (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o citrato sódico al 3,2 %. Una vez obtenida la sangre se deja reposar 15-30 minutos a temperatura ambiente.

2. A partir de esta muestra, se preparan una serie de tubos, a los que se les adiciona dosis crecientes de CMM-LA, tal y como se detalla en la tabla 2. Los tubos se incuban a 37°C durante 30 minutos.

Tabla 2. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio del efecto de dosis crecientes de CMM-LA sobre una muestra de sangre periférica anticoagulada con hirudina.

TUBOS	SANGRE ENTERA CON HIRUDINA (μL)	CMM-LA (μL)
1) Control sin células	1000	----
2) 100,000 CMM-LA	1000	20
3) 30,000 CMM-LA	1000	20
4) 10,000 CMM-LA	1000	20
5) 3,000 CMM-LA	1000	20
6) 1,000 CMM-LA	1000	20

3. A continuación, se comienza a analizar la muestra en el Multiplate®, que previamente se ha encendido para que las medidas puedan realizarse a 37 °C. Una vez colocadas las cubetas con los imanes en sus orificios, se añaden los componentes en el orden y volumen prefijados por el sistema:
- 1º) 300 μL de solución salina (NaCl) en zona habilitada de la cubeta del Multiplate, se precalienta a 37 °C durante 3 minutos. En caso de usar citrato sódico como anticoagulante el salino contiene 2mM de CaCl_2 , ya que la agregación plaquetaria necesita calcio.
 - 2º) 300 μL de sangre entera, se incuba durante 3 minutos y se añade 20 μL del reactivo ADP (6,5 μM , concentración final) o TRAP (10 μM , concentración final). Las mediciones están estandarizadas y son fáciles de realizar gracias a los programas de pipeteo automático.
4. Tras añadir el agonista, se comienza a registrar los cambios en impedancia desde la basal (tiempo 0), durante 6 minutos. Visualizaremos las curvas de agregación plaquetaria en tiempo real en la pantalla del ordenador.

La adición de un agonista estimula la agregación de las plaquetas en la superficie de los electrodos, lo que dificulta el flujo de la corriente eléctrica. El aumento en la resistencia al flujo de electricidad o impedancia es proporcional a la agregación.

El adenosín difosfato (ADP), es un agonista débil que, desencadena la activación plaquetaria a través de los receptores de ADP de las plaquetas. El péptido activador del receptor de trombina (TRAP) es un agonista fuerte, que, desencadena la activación plaquetaria y estimula la agregación plaquetaria a través del receptor de trombina PAR-1.

IV.2.5. Citometría de flujo: agregación y activación plaquetaria

IV.2.5.1. Principio Del Ensayo

La citometría de flujo es una técnica que permite analizar y describir partículas, que se encuentran en suspensión, de manera individual. Se trata de una técnica rápida, que es capaz de analizar una media de 20.000 células por segundo pero que requiere un equipamiento complejo (Figura 12):

- Fuente de luz: debe ser, monocromática, coherente, intensa y direccionada. Generalmente se utiliza un rayo láser.
- Cámara de flujo: con este elemento se consigue el paso individual de partículas.
- Sistema óptico: compuesto por espejos dicroicos, filtros y cristales que iluminan la muestra.
- Detectores de luz: convierten las señales luminosas en impulsos eléctricos que terminan produciendo una señal digital.
- Componente informático: que recoge, almacena y posteriormente analiza los datos.

El principio básico de la citometría de flujo es medir los cambios en la dispersión que producen las partículas tras incidir sobre ellas un haz de luz. Se requiere un flujo laminar para que los elementos a analizar pasen por delante de la fuente de luz de manera individual, proceso conocido como enfoque hidrodinámico. Una limitación importante, es la escasa fluorescencia que presentan a veces las células, lo cual hace

necesario el uso de técnicas inmunofluorescentes. Para ello se marcan las células con anticuerpos combinados con fluorocromos, que van a unirse de forma específica a los antígenos. El fluorocromo, al ser excitado por una fuente de luz, emite radiación a una longitud de onda característica, lo cual permite su identificación. Cada fluoróforo presenta un espectro de emisión y excitación único. La luz dispersada en ángulos pequeños y de manera frontal nos da información acerca del tamaño celular y se representa en el eje de las abscisas del histograma, bajo las siglas FSC (del inglés: *Forward Scatter Channel*). La dispersión ortogonal, lateral y perpendicular al haz de luz, se relaciona con la complejidad celular, parámetro conocido bajo las siglas SSC (del inglés: *Side Scatter Channel*), y representado en el eje de las ordenadas. Además del histograma, representación monoparamétrica, la valoración de los parámetros se puede realizar mediante gráficas diparamétricas conocidas como dot-plot. En el histograma el eje X representa la intensidad de la fluorescencia y el eje Y el número de células en los que ha sido medida esa intensidad. Por su parte en los gráficos dot-plot, cada célula, se sitúa a modo de punto, entre los dos parámetros de intensidad de fluorescencia, (FSC y SCC). Los resultados obtenidos se expresan en porcentaje de células y en parámetros estadísticos como media, mediana y desviación de la intensidad de la fluorescencia (Otero & González-Navarro, 2013).

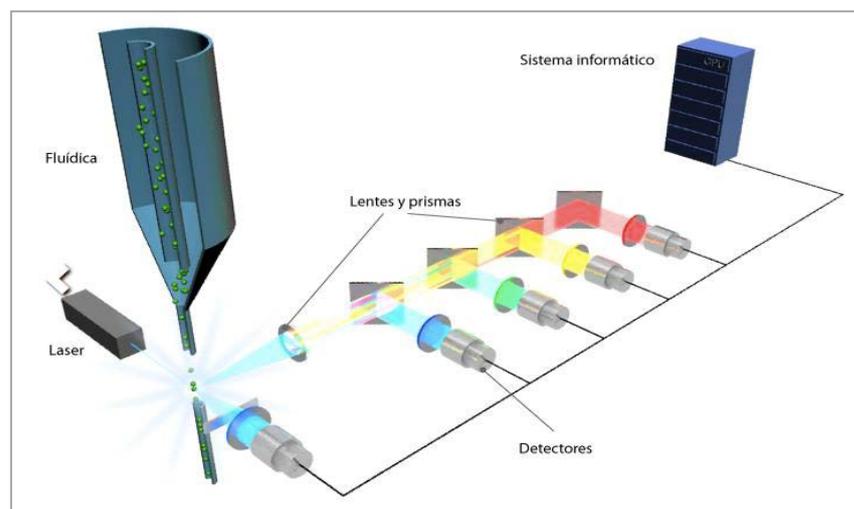


Figura 12. Esquema ilustrativo de un citómetro (biotechspain.com).

IV.2.5.2. Aplicaciones de la Citometría de Flujo

Las aplicaciones del citómetro de flujo son muy variadas, tanto en la práctica clínica diaria como en el campo de la investigación. La utilización de esta técnica es el gold standard para determinar moléculas de superficie leucocitaria, un ejemplo clásico es la diferenciación de linfocitos T, clave en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con VIH y otras inmunodeficiencias. A nivel hematológico esta herramienta resulta indispensable para diagnosticar y realizar un correcto seguimiento de neoplasias tanto mieloides como linfoides.

Además de marcajes a nivel superficial, existen anticuerpos marcados con fluorocromos que pueden acceder a nivel intracelular, esta aplicación resulta importante en inmunología para detectar citoquinas y en hematología para identificar una tirosinquinasa ZAP-70, presente en pacientes con leucemia linfática crónica (Otero & González-Navarro, 2014).

En el estudio de plaquetas, la citometría de flujo permite (Michelson, 2013):

- Analizar la actividad de las plaquetas.
- Diagnosticar enfermedades hematológicas relacionadas con las plaquetas.
- Monitorización de anticoagulantes y antiplaquetarios.
- Monitorización de la trombopoyesis.
- Medida de la asociación entre plaqueta-IgG.

En nuestro estudio utilizamos la citometría de flujo para estudiar la activación y agregación plaquetaria con objeto de eliminar los inconvenientes que presentan los clásicos ensayos empleados hasta ahora. El citómetro de flujo presenta las siguientes ventajas (Michelson, 2013):

- El análisis se realiza en su medio habitual, sangre entera.
- La mínima manipulación de las muestras reduce la clásica activación *in vitro* de las plaquetas, evitando la pérdida de las subpoblaciones.
- Se puede determinar tanto el estado de activación como la reactividad de las plaquetas circulantes.
- Detección de los cambios que ocurren en la superficie plaquetar durante la activación y agregación.

- Pequeños volúmenes de sangre son necesarios (5 μ L).
- Estados de trombocitopenia y trombocitosis no afectan en el análisis.

Pero como en toda técnica, encontramos ciertos inconvenientes, como la complejidad del aparato, su elevado coste y la necesidad de personal entrenado y adecuado.

El fenómeno de activación plaquetar se puede observar por citometría de flujo de diferentes maneras, bien utilizando anticuerpos monoclonales, detectando agregados leucocito-plaqueta, plaqueta-plaqueta, plaquetas procoagulantes y micropartículas derivadas de plaquetas y observando la fosforilación de proteínas intracelulares entre otros (Michelson, 2013).

Para nuestro estudio, las plaquetas serán marcadas con dos marcadores de superficie de membrana:

- ✓ **GP IIIa del complejo GP IIb/IIIa (CD61)**, es un marcador específico de glicoproteínas presentes en la membrana plaquetaria. Permite diferenciar la población plaquetaria, del resto de poblaciones celulares. Se encuentra tanto en plaquetas en reposo como en plaquetas activadas. El anticuerpo utilizado para detectar esta glucoproteína es el: anti-human CD61-PerCP.
- ✓ **La P-selectina (CD62-P)**, presente en los gránulos alfa de las plaquetas, se expresa en la membrana de los trombocitos cuando estas se activan. El anticuerpo utilizado en este caso será el anti-human CD62-ACP.

El MSA (Figura 13) es un sistema que combina el control de temperatura mediante un termobloque y el control de agitación (mediante pequeños imanes individuales en cada tubo). En él se realizan los protocolos de activación y agregación plaquetaria en sangre entera. Las muestras son fijadas inmediatamente después de finalizar el tiempo predeterminado en el protocolo y analizadas posteriormente en el citómetro.



Figura 13. MSA (Multi Sample Agitator, Universidad de Nottingham).

IV.2.5.3. Protocolo de agregación plaquetaria en presencia de CMM-LA

Para el estudio de la agregación plaquetaria inducida por las CMM-LA, se siguió el siguiente protocolo:

1. Se obtiene la muestra de sangre en Vacutainers ® con citrato sódico 3,2 %. Una vez obtenida la sangre se deja reposar 30 minutos a 37 °C.
2. Se preparan 6 tubos de 3 mL en los que se incluye un imán, cuya función es favorecer el fenómeno de agregación plaquetar, a los que se adicionaron 125 ó 135 μ L de sangre (según el diseño experimental especificado en tabla 3) a cada tubo, en los que se han depositado previamente los reactivos correspondientes, como se explica en la tabla 3. Los 6 tubos, se incubaron en el Multi Sample Agitator (MSA) durante 5 minutos, a 37 °C, con agitación de 1000 rpm.
3. Pasados los 5 minutos, se añaden 50,2 μ L del fijador AGGFixA a los 6 tubos. Se vuelve a incubar 20 minutos, a temperatura ambiente, para finalmente añadir otro fijador AGGFixB (225 μ L en 25 μ L de sangre fijada con AGGFixA. Estas dos fijaciones, permiten guardar la muestra de manera estable en el frigorífico a 4 °C, hasta el día de la lectura en el citómetro de flujo, durante un máximo de 7 días.

Tabla 3. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio de la agregación plaquetaria en presencia de CMM-LA.

TUBOS con Agitación	Solución salina	Sangre entera	CMM-LA (300.000)	ADP (150 µM)	TRAP (150µM)
1) Basal Control	5 µL	140 µL	-	-	-
2) Basal + CMM-LA	5 µL	130 µL	10 µL	-	-
3) ADP	-	140 µL	-	10 µL	-
4) ADP + CMM-LA	-	130 µL	10 µL	10 µL	-
5) TRAP	-	140 µL	-	-	10 µL
6) TRAP + CMM-LA	-	130 µL	10 µL	-	10 µL

Este proceso, se repite siguiendo los mismos pasos, añadiendo Heparina (5 U/mL) de concentración final como se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio de la agregación plaquetaria en presencia de CMM-LA + Heparina (5 U/mL, concentración final).

TUBOS con Agitación	Solución Salina	Sangre entera	CMM (300.000cell)	ADP (150 µM)	TRAP (150µM)	Heparina (150 U/mL)
1) Basal Control	5 µL	140 µL	-	-	-	5 µL
2) Basal+CMM-LA	5 µL	130 µL	10 µL	-	-	5 µL
3) ADP	-	140 µL	-	10 µL	-	5 µL
4) ADP+CMM-LA	-	130 µL	10 µL	10 µL	-	5 µL
5) TRAP	-	140 µL	-	-	10 µL	5 µL
6) TRAP+CMM-LA	-	130 µL	10 µL	-	10 µL	5 µL

Al día siguiente, se procede a su lectura por citometría de flujo. Las muestras guardadas a 4°C se atemperan y se realiza el marcaje: 5 µL de la sangre fijada y 10 µL de anticuerpo anti-CD61-PerCP diluido a 1:8 con PBS. Se incuba 30 minutos a 4 °C en oscuridad, ya que el complejo anticuerpo-fluorocromo es fotosensible. A continuación, se añaden 400 µL de PBS y se realiza la lectura en el citómetro de flujo.

IV.2.5.4. Protocolo de activación plaquetaria en presencia de CMM-LA

Para el estudio de la activación plaquetaria inducida por las CMM-LA, se siguió el siguiente protocolo:

1. Se obtiene la muestra de sangre en tubos Vacutainer® con citrato sódico al 3,2%. Una vez obtenida la sangre se deja reposar 30 minutos a 37 °C.
2. Se preparan 6 tubos de 3 mL a los que se adicionan 125 ó 135 µL de sangre (según el diseño experimental especificado en tabla 5), cada tubo tiene los reactivos correspondientes, como se explica en la tabla 5. Los 6 tubos, se incuban en el Multi Sample Agitator (MSA) durante 5 minutos, a 37 °C, pero esta vez sin agitación.
3. Pasados los 5 minutos, se añaden 250 µL del fijador PamFix en los 6 tubos y se guardan a 4 °C, para su correcta conservación hasta el día de la lectura en el citómetro de flujo, durante un máximo de 7 días.

Tabla 5. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio de la activación plaquetaria en presencia de CMM-LA.

TUBOS Sin Agitación	Solución Salina	EDTA (60 mM)	Sangre entera	CMM (300.000cell)	ADP (300 µM)	TRAP (300µM)
1) Basal Control	5 µL	10 µL	135 µL	-	-	-
2) Basal + CMM	5 µL	10 µL	125 µL	10 µL	-	-
3) ADP	-	10 µL	135 µL	-	5 µL	-
4) ADP + CMM	-	10 µL	125 µL	10 µL	5 µL	-
5) TRAP	-	10 µL	135 µL	-	-	5 µL
6) TRAP + CMM	-	10 µL	125 µL	10 µL	-	5 µL

Este proceso, se repite siguiendo los mismos pasos, añadiendo Heparina (5 U/mL, concentración final) (Tabla 6).

Tabla 6. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio de la activación plaquetaria en presencia de CMM-LA+Heparina (5 U/mL, concentración final).

TUBOS Sin Agitación	Solución Salina	EDTA (60 mM)	Sangre entera	CMM (300.000cell)	ADP (300 μM)	TRAP (300μM)	Heparina (150 U/mL)
1) Basal Control	5 μL	10 μL	135 μL	-	-	-	5 μL
2) Basal+CMM	5 μL	10 μL	125 μL	10 μL	-	-	5 μL
3) ADP	-	10 μL	135 μL	-	5 μL	-	5 μL
4) ADP+CMM	-	10 μL	125 μL	10 μL	5 μL	-	5 μL
5) TRAP	-	10 μL	135 μL	-	-	5 μL	5 μL
6)TRAP+CMM	-	10 μL	125 μL	10 μL	-	5 μL	5 μL

Al día siguiente, se procede a su lectura por citometría de flujo. Las muestras guardadas a 4 °C se atemperan y se realiza el marcaje: 5 μL de la sangre fijada, más 5 μL de anticuerpo anti-CD61-PerCP diluido a 1:8 y 5 μL de anticuerpo anti-CD62-ACP diluido a 1:20. Se incuba 30 min a 4 °C en oscuridad, ya que los complejo anticuerpo-fluorocromo son fotosensibles. A continuación, se añaden 400 μL de PBS y se realiza la lectura en el citómetro de flujo.

La agregación se determina como la caída en el contejo de plaquetas en la muestra de sangre comparado con una muestra de sangre que contiene EDTA. Así, la agregación se calcula como un porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Agregación} = \frac{100 \times [\text{contaje EDTA} - \text{contaje muestra}]}{[\text{contaje EDTA}]}$$

“contaje EDTA”: número de eventos plaquetarios presentes en una muestra conteniendo EDTA;

“contaje muestra”: número de eventos plaquetarios en la muestra a estudiar.

IV.2.6. Citometría de flujo: análisis del calcio citosólico en sangre completa y a tiempo real

La determinación de los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico, se ha realizado mediante la utilización de la sonda fluorescente Fluo-4 AM. Para ello, se utiliza una muestra de sangre entera anticoagulada con citrato sódico y diluida 1/10 con solución Tyrode modificada con (NaCl 137 mM; KCl 2,8 mM; Cl_2Mg 1 mM; CO_3HNa 12 mM; PO_3HNa 0,4 mM; D-Glucosa 5,5 mM; BSA 3,5 %; tampón hepes 25 mM). La sangre diluida se carga con la sonda de Fluo-4 AM (2 mM), a T^a ambiente, 15 minutos y las plaquetas se marcan con un anticuerpo fluorescente específico anti-CD61. Posteriormente, la sangre se vuelve a diluir 1/10 en solución Tyrode modificada, se reparten alícuotas de 1 mL en tubos de polipropileno. Los experimentos se realizan en tiempo real, a 37 °C y con agitación (300 rpm), mediante la combinación de un termobloque con agitación magnética y un citómetro de flujo Accuri C6 no presurizado, que aspira la muestra mediante una bomba peristáltica.

Procedimiento:

1. Para la determinación de la liberación intracelular de Ca^{2+} , la sangre entera estabilizada se diluye previamente 1:10 en solución Tyrode modificado y se marca con anti-CD61 humano conjugado con PerCP y con la sonda sensible a calcio Fluo-4AM (1 μM) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Antes del análisis por citometría de flujo, se diluyen alícuotas de cada suspensión de sangre 1:10 en tampón salino Tyrode hasta 1 ml.
2. Cada muestra se calienta previamente a 37 °C durante 3 minutos y se coloca en el citómetro y a continuación se comienza el registro de los eventos. Se registra los dos parámetros de dispersión, FSC (tamaño) y SSC (granularidad) y dos fluorescencias, una en el canal FL1 (para el Fluo-4 AM) y otra en el canal FL3 (para el CD61-PerCP).
3. Posteriormente, tras medir la intensidad de fluorescencia basal, se añaden los reactivos y/o CMM-LA (300.000 células/mL) y se registran los cambios a lo largo del tiempo

4. El ionóforo ionomicina se utilizó como control positivo para la movilización de Ca^{2+} . Posteriormente, los valores medios de intensidad de fluorescencia se analizaron con el software de análisis del propio citómetro.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Marcar 15 μl de sangre entera anticoagulada con citrato y estabilizada 30 min a 37 °C, diluida 1:10 en tampón Tyrode modificado con 7 μl de anti-CD61-PerCP. Incubar 15 min a T^a ambiente y oscuridad.
2. Tomar una parte de la sangre marcada con CD61 y diluirla 1/10 en Tyrode modificado con Fluo-4 AM (1 μM) concentración final. Incubar 15 min a T^a ambiente y oscuridad.
3. Preparar 7 tubos por experimento (Tubo 1-Control basal sin marcar; Tubo 2-CD61; Tubo 3- Fluo 4AM; Tubo 4, 5, 6, 7- CD61+Fluo 4AM)
4. Precalentar el tubo a 37 °C 3 minutos, colocarlo en el termobloque con agitación y comenzar a adquirir eventos. Añadir los reactivos en los tiempos adecuados, mediante una punta de pipeta sin parar la adquisición de eventos.
 - A los 60 segundos añadir nada, EDTA o CaCl_2 .
 - A los 120 segundos añadir CMM-LA (300.000 células/mL).
 - A los 7 minutos añadir ionomicina (5 μM).

IV.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este trabajo, los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. El software utilizado para el procesamiento de datos y realización de gráficas es *GraphPad Prism 5* y las comparaciones entre variables se realizan con la distribución *t de Student*, considerándose estadísticamente significativo un p-valor $<0,05$.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMM-LA

V.1.1. Cultivo de CM derivadas del LA:

Se procesaron un total de 14 muestras de líquido amniótico (LA) de cesáreas programadas, todas en la semana 38 y 39 del embarazo. Tras la siembra del LA, se encontraron células aisladas y con morfología variable, que fueron proliferando progresivamente, hasta que sobre el día 15 se observaron las primeras colonias (Figura 14). En torno al día 30, las células alcanzaron la confluencia. Un 20 % del total de líquidos procesados no mostraron crecimiento alguno, por lo que se desecharon.

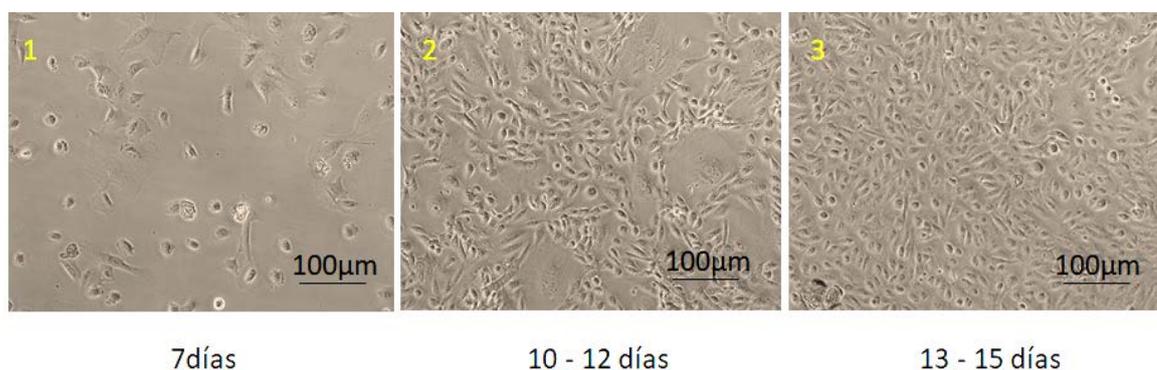


Figura 14. Células en cultivo obtenidas de LA, en pase 0, a los 7, 10-12 y 13-15 días tras su siembra.

Tras alcanzarse la confluencia en pase 0, se obtuvieron aproximadamente $0,5-4,0 \times 10^6$ células/frasco de 25 mm^2 , con una viabilidad media del 88 % (85-90 %). En los pases sucesivos se sembraron a una densidad de $10.000 \text{ células/mm}^2$ y tras 3-4 subcultivos (pases), se obtuvo un cultivo homogéneo de células con morfología alargada (Figura 15).

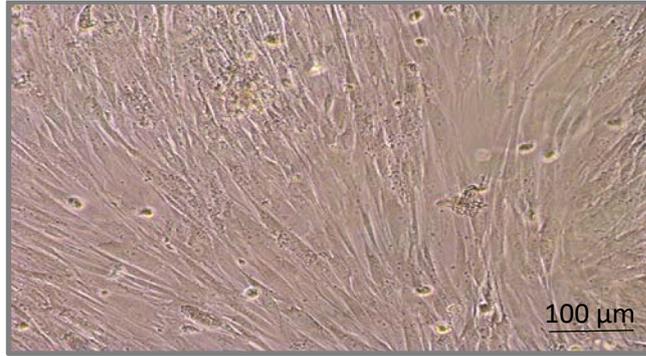


Figura 15. Células en cultivo derivadas de LA en pase 3-4.

V.1.2. Capacidad multipotencial de las CM derivadas del LA: estudios de diferenciación *in vitro*

Las CM derivadas del LA demostraron capacidad de diferenciación, bajo condiciones de cultivo con medios específicos, en células adipocíticas, osteocíticas y condrocíticas.

Diferenciación adipogénica: tras una semana de cultivo en medio de diferenciación adipogénica, empezaron a observarse cambios en la morfología de las células que adoptaron una forma redondeada y pequeñas vacuolas intracitoplasmáticas, cargadas de lípidos, visibles en color anaranjado mediante el colorante Oil Red O. El control utilizado, células en medio estándar, no evidenció diferenciación alguna (Figura 16).

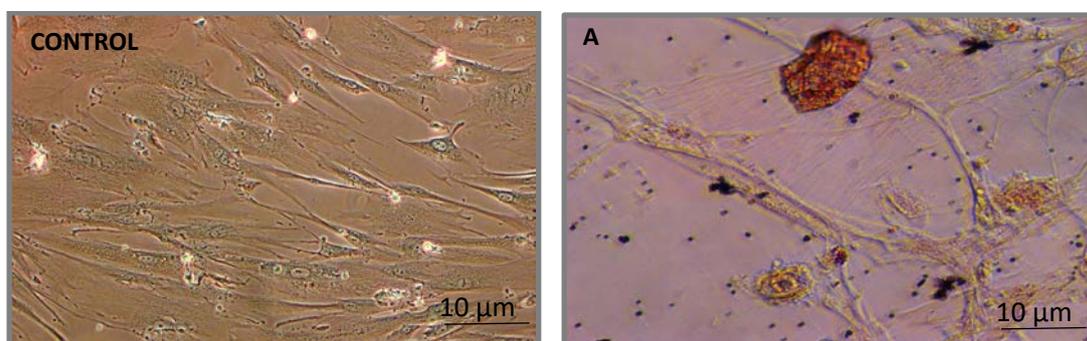


Figura 16. Diferenciación adipogénica de las CM derivadas de LA. (A) Tinción de Oil Red O con presencia de vacuolas lipídicas en el citoplasma de las células diferenciadas.

Diferenciación osteogénica: a partir de la tercera semana, se observó una coloración violeta en el citoplasma de las células, debida a la actividad de la fosfatasa alcalina tras ser incubadas con el sustrato BCIP/NBT (Figura 17), además se realizó la tinción con Alizarin Red, que tiñó los depósitos de calcio formados en los cultivos diferenciados (Figura 18). En las muestras control, las células en medio completo, no se evidenció diferenciación alguna.

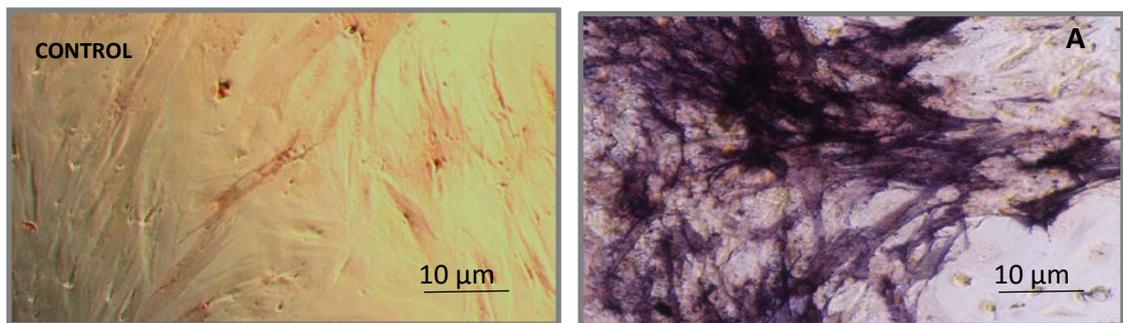


Figura 17. Diferenciación osteogénica de las CM derivadas del LA. (A) Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina, se observa una coloración violácea en las células diferenciadas.

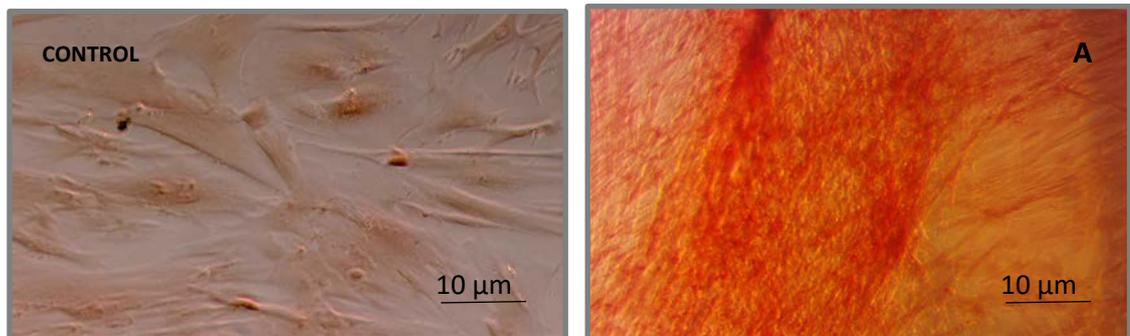


Figura18. Diferenciación osteogénica de las CM derivadas de LA. (A) Tinción con Alizarin Red, se observa una coloración naranja de los depósitos de calcio en células diferenciadas.

Diferenciación condrogénica: a partir de la tercera semana en medio específico para diferenciación condrogénica, se realizó la tinción de azul de alcian, revelando en color

azul los los depósitos de proteoglicanos y mucopolisacáridos (Figura 19). El control utilizado, células en medio completo, no evidenció diferenciación alguna

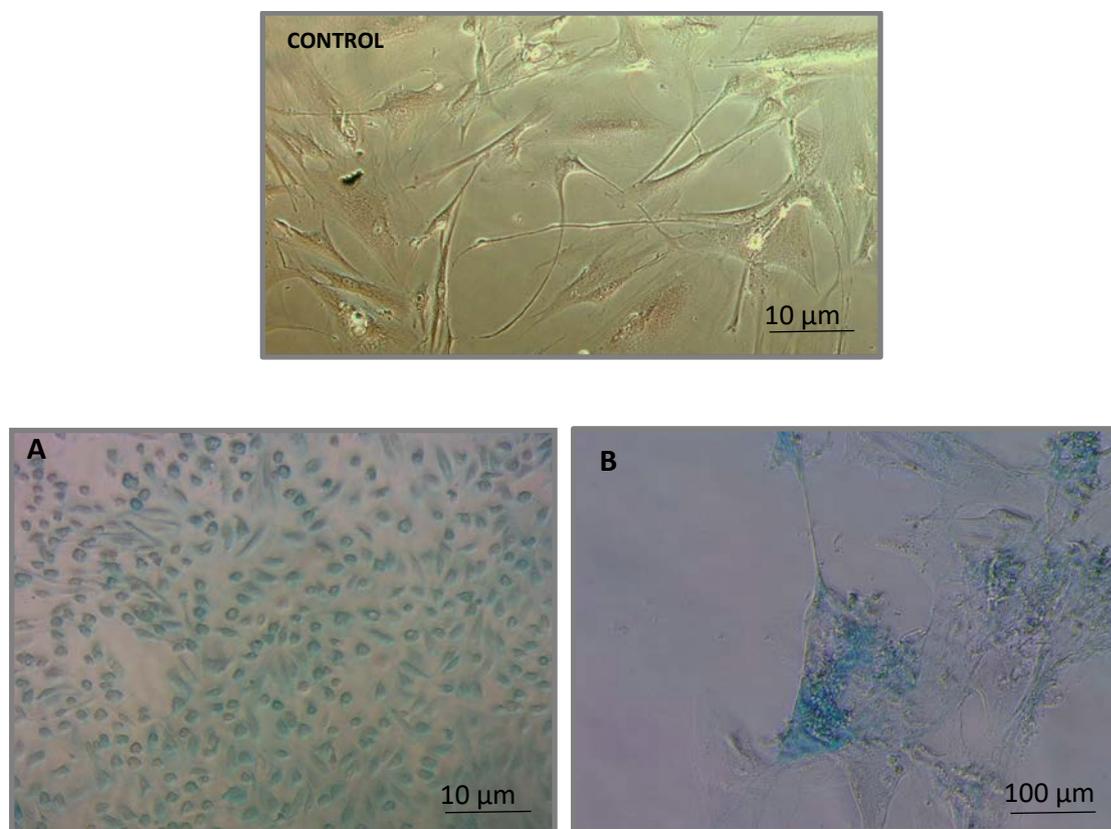


Figura 19. Diferenciación condrogénica de las CM derivadas de LA. (A y B) Tinción de proteoglicanos y mucopolisacáridos con azul de Alcian, se observa una coloración azul en las células indiferenciadas.

V.1.3. Caracterización fenotípica de las CM derivadas de LA

Mediante citometría de flujo, se comprobó que los cultivos de CM derivadas de LA, expresaron en un alto porcentaje los marcadores mesenquimales: CD105 (94,90 %), CD73 (97,75 %) y CD90 (94,04 %), mientras que la expresión de los marcadores hematopoyéticos fue mínima: CD 34 (0,38 %) y CD45 (0,29 %) (Figura 20). Por los que, junto con la capacidad de adherirse al plástico, de alta proliferación y de diferenciación, podemos decir que cumplen con los criterios establecidos por la ISTC,

para ser definidas como células madre mesenquimales (CMM), denominándolas a partir de ahora como CMM derivadas de LA o CMM-LA.

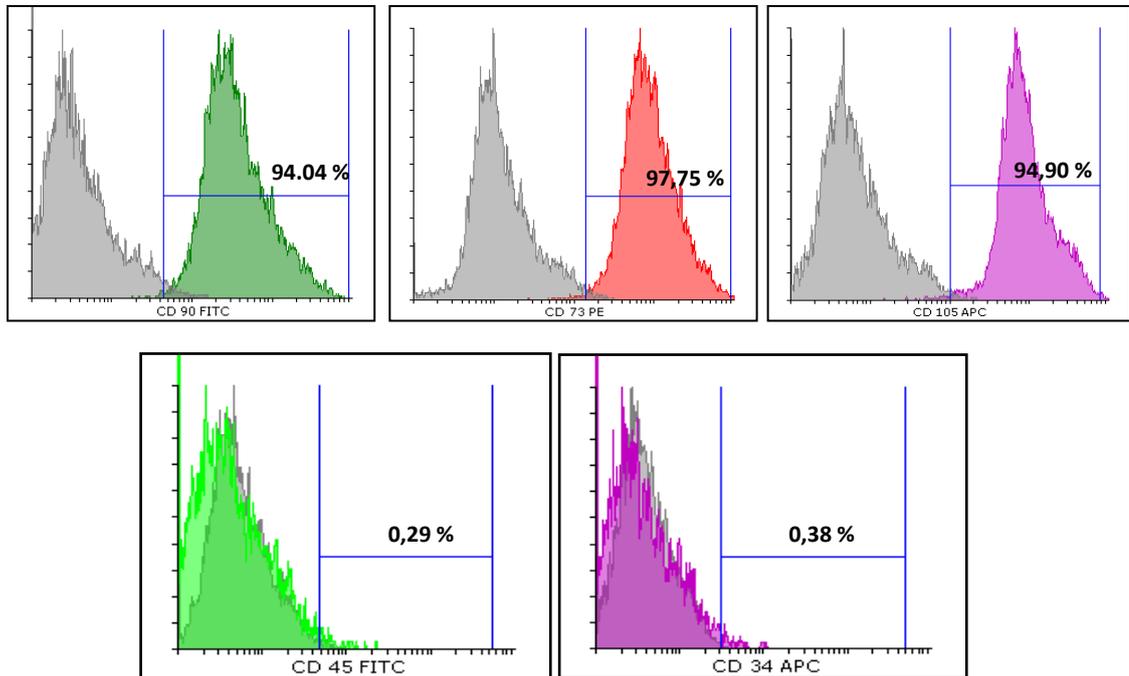


Figura 20. Caracterización fenotípica de la población de CM derivadas de LA por citometría de flujo. Nivel de expresión de la intensidad media de fluorescencia de marcadores mesenquimales (CD90, CD73 y CD105) y marcadores hematopoyéticos (CD45 y CD34).

En las CMM-LA utilizadas en los experimentos (pase 4-6) expresaron factor tisular (FT) (27,72 %), factor VIII (85,87 %) y la proteína de adhesión Podoplanina (56,81%) (Figura 21).

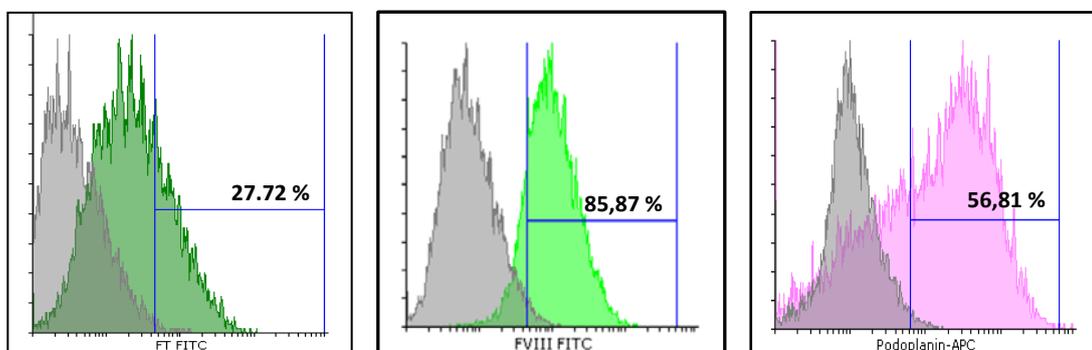


Figura 21. Expresión fenotípica del factor tisular (FT), factor VIII y Podoplanina de la población de CMM-LA, medida por citometría de flujo.

V.1.4. Expresión de RNAm en las CMM-LA mediante PCR cualitativa

Los resultados obtenidos por PCR, evidenciaron la expresión génica positiva de los factores de la coagulación FVIII (Figura 22), vWF (Figura 23), FT (Figura 24) y de la glicoproteína de adhesión podoplanina (Figura 25) en las CMM-LA.

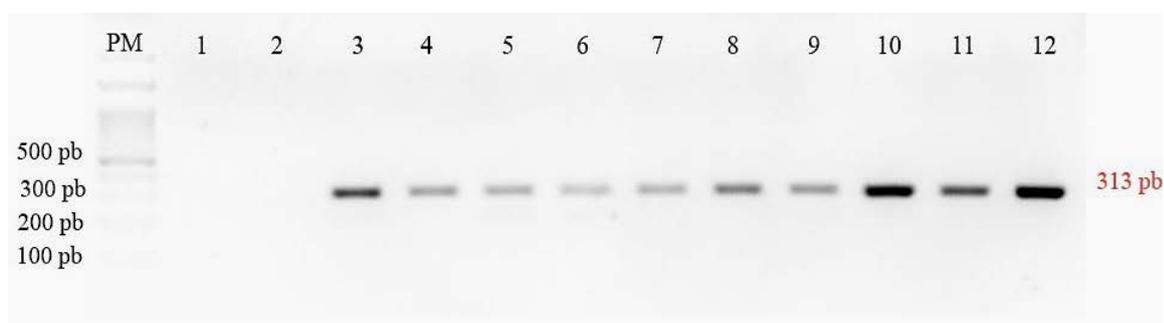


Figura 22. Análisis de los resultados de la PCR cualitativa de CMM-LA. Expresión génica del FVIII, en diferentes muestras en fase 3-5. La muestra 1: agua, como control negativo; muestra 2: células sinusoidales hepáticas, como control positivo. Muestras de la 3-12: CMM-LA.

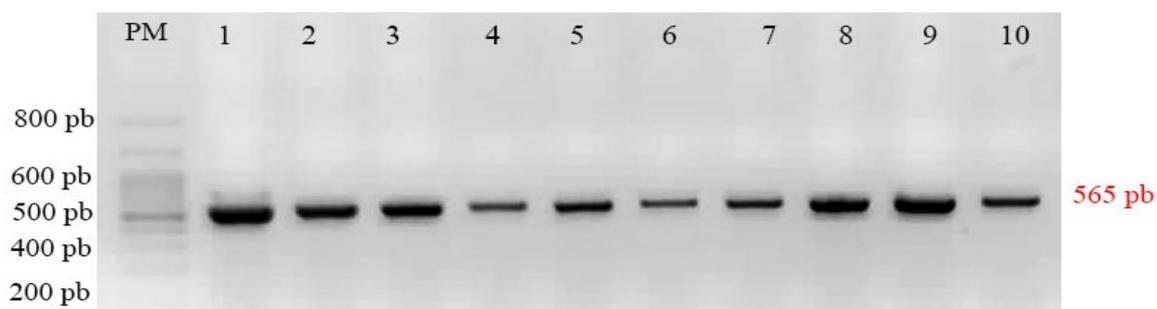


Figura 23. Análisis de los resultados de la PCR cualitativa de CMM-LA. Expresión génica del vWF, en diferentes muestras en pase 3-5. La muestra 1: células sinusoidales hepáticas, como control positivo; muestras 2-10: CMM-LA.

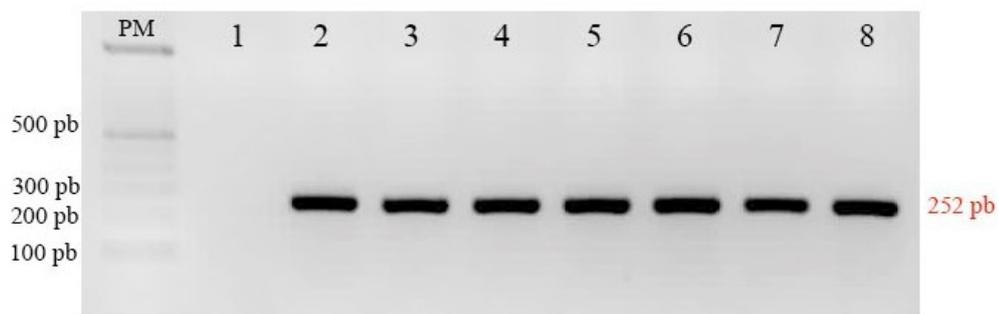


Figura 24. Análisis de los resultados de la PCR cualitativa de CMM-LA. Expresión génica del FT, en diferentes muestras en pase 4-6. La muestra 1: agua, como control negativo; de la muestra 2-5: CMM-LA; muestra 6: células de membrana amniótica humana; muestra 7: células de médula ósea humana y muestra 8: células de cordón umbilical.

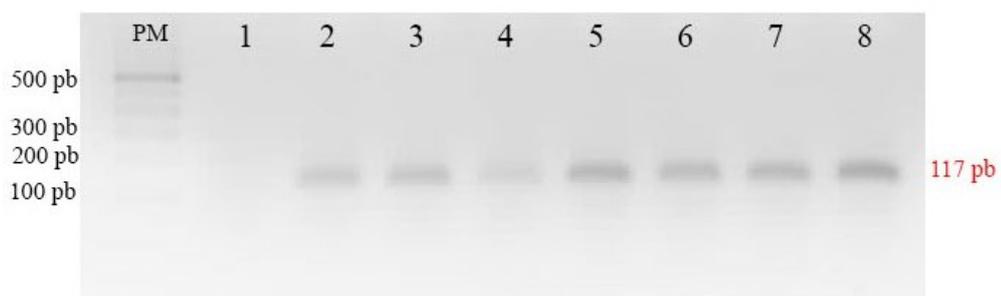


Figura 25. Análisis de los resultados de la PCR cualitativa de CMM-LA. Expresión génica de la Podoplanina, en diferentes muestras en pase 3-5. La muestra 1: agua, corresponde al control; muestras 2-8: CMM-LA.

V.1.5. Inmunofluorescencia: detección del FVIII y vWF en CMM-LA

El objetivo de emplear técnicas de inmunofluorescencia en este estudio es el de localizar las proteínas FVIII y vWF en las CMM-LA, una vez observada la expresión de RNAm mediante técnicas de PCR cualitativa. Las inmunofluorescencias se realizaron con anticuerpos frente a antígenos de FVIII marcado en FITC (La fluoresceína al ser excitada por una luz de longitud de onda de aproximadamente 495 nm (azul) emite una luz de color verde cuya longitud de onda esta alrededor de 519 nm) y vWF en Rhodamina (se excita a 562 nm y emite una luz de color rojo cuyo espectro de detección se encuentra en torno a 578 nm). En la Figura 26, se observa como las CMM-LA sintetizan ambos factores de la coagulación.

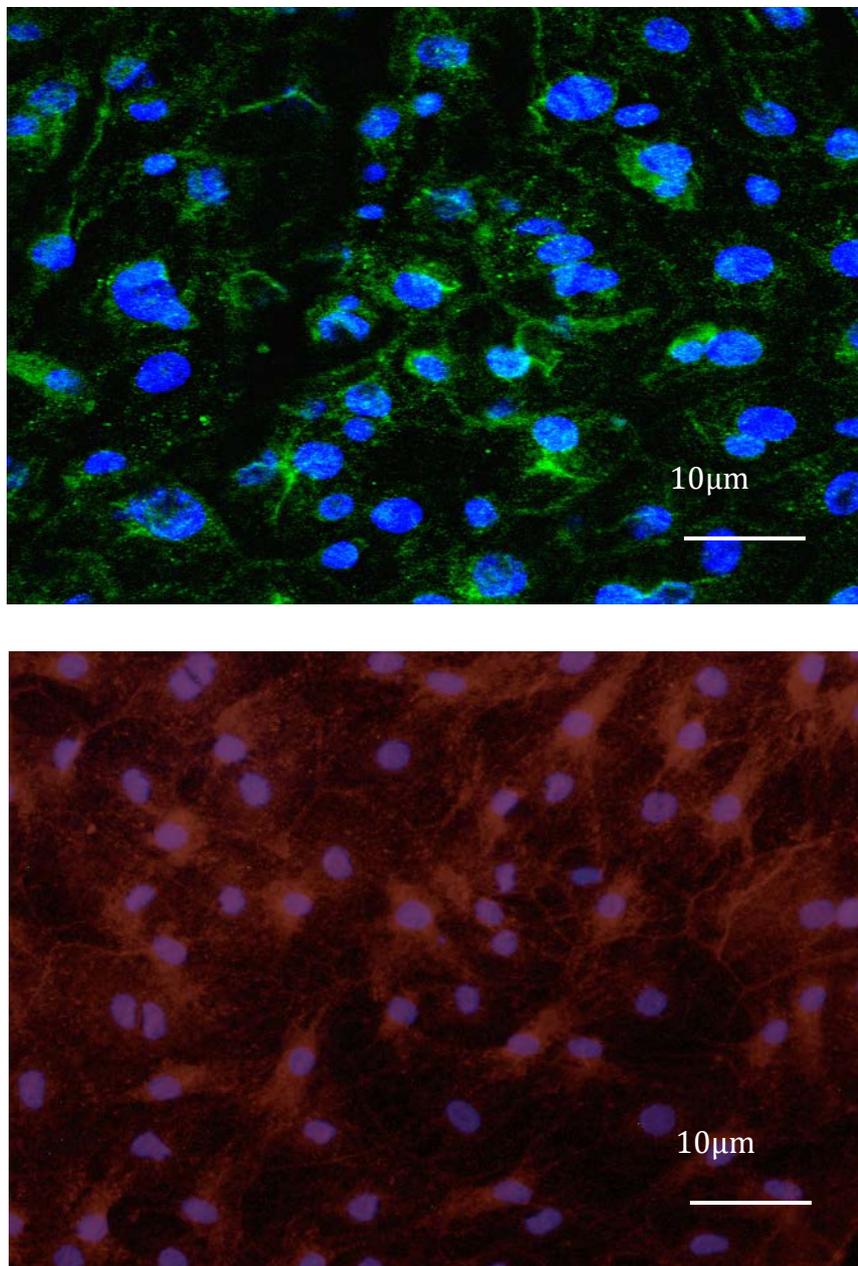


Figura 26. Análisis de la expresión de FVIII en CMM-LA mediante inmunofluorescencia. En la imagen superior, marcaje de FVIII con FITC (verde), nuclear con DAPI (azul). Imagen inferior marcaje de vWF con Rhodamina (rojo), nuclear con DAPI (azul). Muestras en pase 4.

V.2. EFECTO DE LAS CMM-LA SOBRE LA COAGULACIÓN.

Se observa que el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) disminuye al incubar la sangre con CMM-LA (150.000-300.000/mL) ($p < 0.05$). El tiempo de protrombina (TP), INR y fibrinógeno no sufren cambios significativos (Tabla 7).

Tabla 7. Representación de los diferentes parámetros de coagulación en muestras de sangre, en condiciones basales (sin CMM) y tras incubación 30 minutos a 37°C con diferentes dosis de CMM-LA (células/mL de sangre), n=6. (N.d: no determinado).

	Basal	150.000 CMM-LA	300.000 CMM-LA
TTPa (seg)	30,86	20,12	16,60
TP (seg)	12,10	12,32	11,60
TP-INR (seg)	1,13	1,12	1,06
Fibrinógeno (mg/dL)	275	270	N.d.

V.3. EFECTO DE LAS CMM-LA SOBRE LA HEMOSTASIA PRIMARIA: PFA-100

Los datos obtenidos en el estudio de la función plaquetaria con PFA-100, muestran que el tiempo de obturación (TO) en respuesta a colágeno/ADP (Tabla 8) o a colágeno/epinefrina (Tabla 9) no cambia significativamente tras la incubación de la sangre con dos dosis crecientes de CMM-LA (150.000-300.000 células/mL sangre).

Tabla 8. Representación del tiempo de obturación (TO) en segundos, en respuesta a colágeno/ADP. Basal (sin células añadidas) o tras incubación 30 minutos a 37 °C con 150.000 o 300.000 CMM-LA/mL. (n=6).

	Basal	150.000 CMM-LA	300.000 CMM-LA
Media	80,5±17,2	82,8±16,2	86,4±15,5
Error estándar	6,1	6,1	6,9

Tabla 9. Representación del tiempo de obturación (TO) en segundos, en respuesta a colágeno/epinefrina. Basal (sin células añadidas) o tras incubación 30 minutos a 37°C con 150.000 o 300.000 CMM-LA/mL. (n=6).

	Basal	150.000 CMM-	300.000 CMM-LA
Media	94,2±19,6	103,5±20,1	114,4±9,1
Error estándar	6,9	7,1	4,1

V.4. EFECTO DE LAS CMM-LA SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN SANGRE ENTERA MEDIDA POR EL MÉTODO DE IMPEDANCIA (MULTIPLATE)

V.4.1. Efecto de las CMM-LA sobre la función plaquetaria en condiciones basales (ausencia agonista)

Para comprobar si la interacción de las plaquetas con las CMM-LA produce agregación plaquetaria, se estudió el aumento de impedancia producido por la incubación durante 6 minutos (a 37 °C y en agitación), con respecto a una muestra basal sin células. En la Figura 27 se muestra un trazado representativo obtenido en ausencia de agonistas con/sin CMM-LA. Como puede verse en la Figura 28, en condiciones basales (sin células), la propia agitación da lugar a un aumento de impedancia o agregación plaquetaria, que es menor en presencia de hirudina. La presencia de CMM-LA en

sangre con hirudina produce un mayor aumento de la impedancia, indicando que las CMM-LA inducen la activación plaquetaria con formación de agregados, que se adhieren a los electrodos.

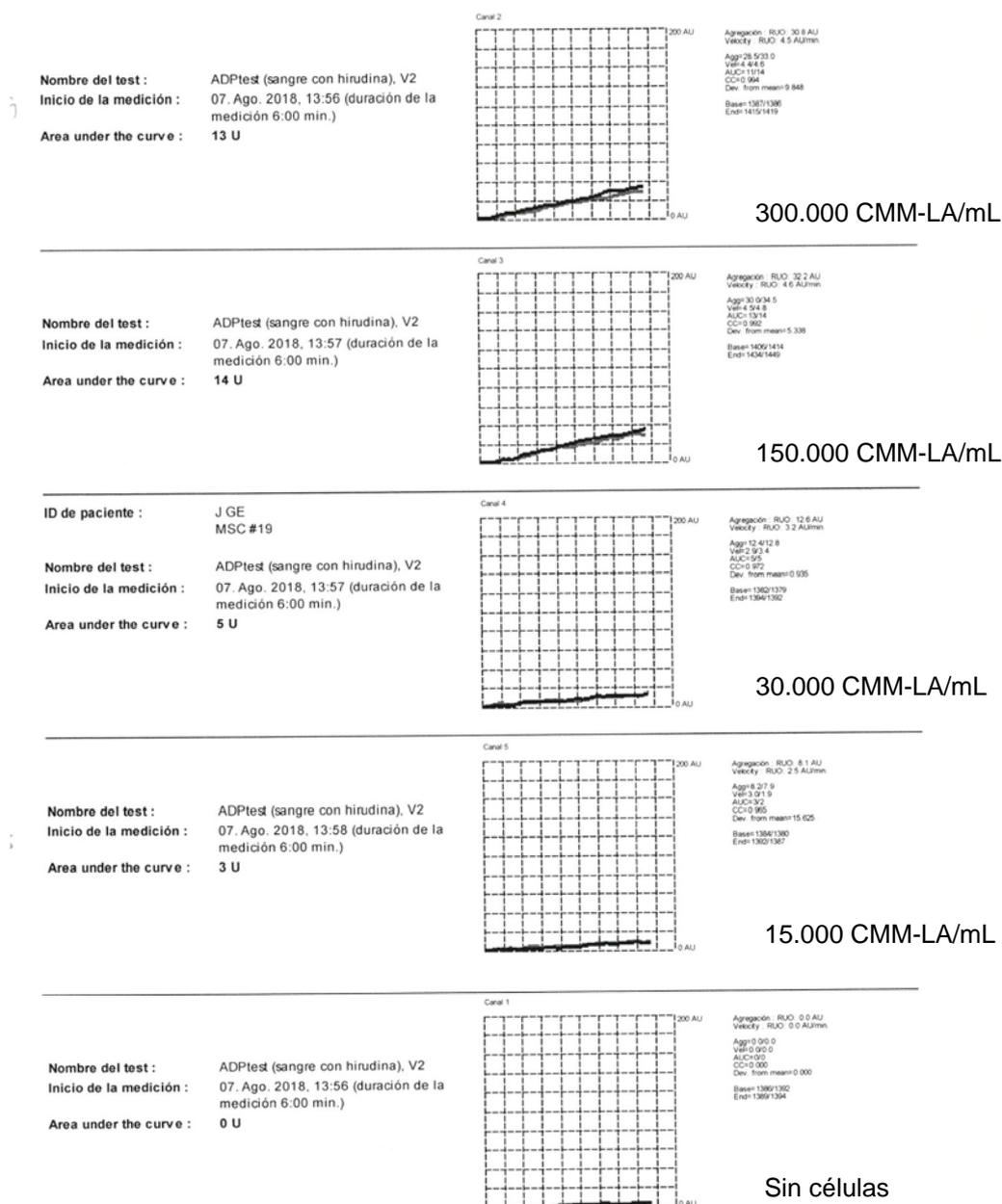


Figura 27. Trazo representativo de las curvas de agregación en sangre entera obtenidas en el sistema Multiplate en condiciones basales (ausencia de agonistas) sin células.

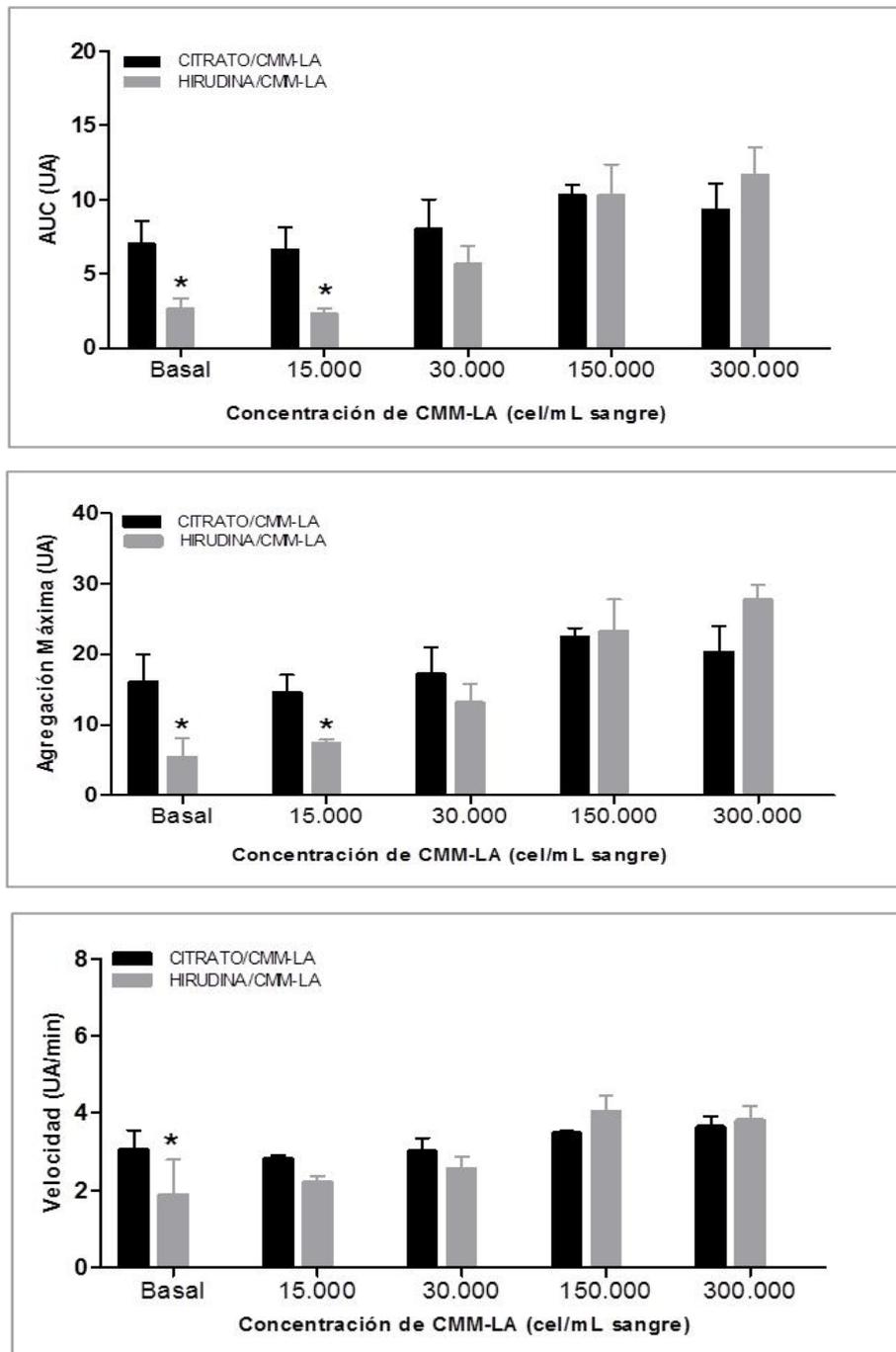


Figura 28. Incremento en la impedancia producido al incubar durante 6 minutos a 37 °C y en agitación sangre anticoagulada con citrato o hirudina sin/con concentraciones crecientes de CMM-LA. El aumento en impedancia se expresa como AUC, agregación máxima y velocidad. * $p < 0,05$ con respecto Basal (sin células) + citrato. ($n=3$).

IV.4.2. Efecto de las CMM-LA sobre la agregación plaquetaria en respuesta a agonistas: ADP/TRAP

El Multiplate está estandarizado en clínica para el estudio de la respuesta de agregación plaquetaria en sangre entera, utilizando varios agonistas. Nosotros hemos utilizado un agonista débil como el ADP (6,5 μM) y un agonista fuerte como el el TRAP (10 μM), para poder ver si se produce potenciación y/o inhibición, respectivamente, de la respuesta plaquetaria. El estudio se ha realizado con dos anticoagulantes: citrato sódico e hirudina. La hirudina es un anticoagulante que inhibe irreversiblemente a la trombina.

Para comprobar si la interacción de las plaquetas con las CMM-LA modifica la respuesta plaquetaria a agonistas, se incubó primero la sangre sin/con CMM-LA a dosis crecientes durante 30 minutos y a continuación se colocó en las cubetas del Multiplate para registrar la respuesta a los agonistas. En la Figura 29 se muestra un trazado representativo obtenido en respuesta a TRAP, tanto en ausencia como en presencia de CMM-LA.

Se observó una disminución de la agregación plaquetaria, tanto en respuesta al ADP (Tabla 10: respuesta a ADP en sangre citratada; Tabla 11 respuesta a ADP en sangre anticoagulada con hirudina) como al agonista TRAP (Tabla 12: respuesta a TRAP en sangre citratada; Tabla 13 respuesta a TRAP en sangre anticoagulada con hirudina).

La presencia de hirudina produjo una mayor inhibición de la agregación plaquetaria al agonista ADP conforme aumentaba la dosis de CMM-LA (Figura 30). Así, se observó una mayor inhibición de la agregación máxima (panel A, Figura 30) y del AUC (panel C, figura 30), en muestras de sangre extraídas con hirudina y estimuladas con ADP con respecto a las muestras extraídas con citrato ($p < 0.05$).

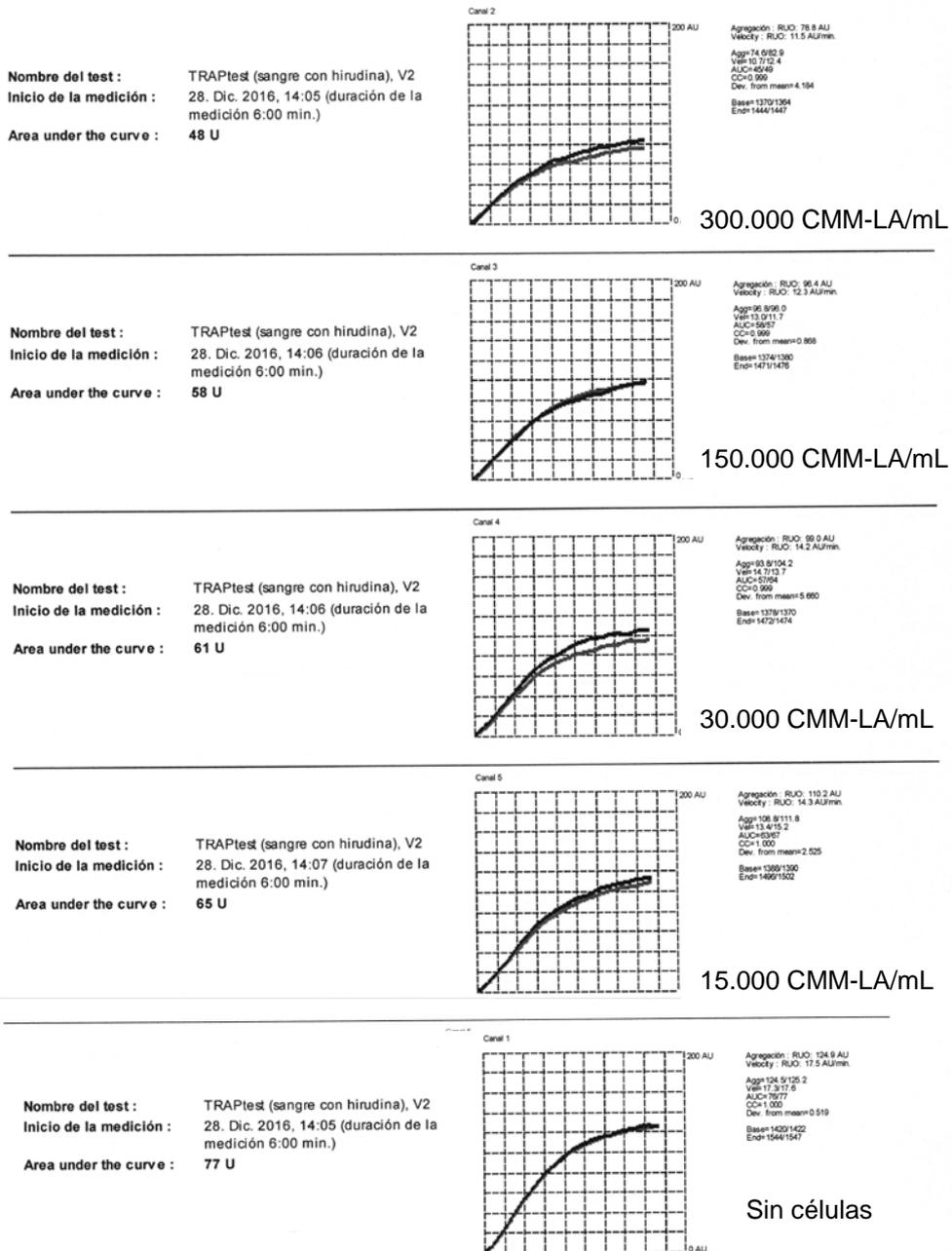


Figura 29. Trazo representativo de las curvas de agregación en sangre entera obtenidas en el sistema Multiplate en respuesta al agonista TRAP, tanto en ausencia como en presencia de CMM-LA.

Tabla 10. Medición de la agregación plaquetaria en respuesta a ADP (6,5 μ M) en sangre anticoagulada con citrato sódico: efecto de diferentes dosis de CMM-LA (células/mL) (n=8).

	CMM-LA:				
	--	15.000	30.000	150.000	300.000
AUC media (UA*min)	49,1 \pm 11,1	42,6 \pm 8,4	43,1 \pm 10,5	41,3 \pm 9,0	41,0 \pm 7,3
Agregación máxima (UA)	88,0 \pm 19,0	77,9 \pm 13,4	78,7 \pm 17,4	75,4 \pm 15,9	74,3 \pm 12,2
Velocidad media (UA/min)	10,8 \pm 2,4	9,6 \pm 2,2	9,3 \pm 2,3	9,3 \pm 2,0	9,1 \pm 1,6

Tabla 11. Medición de la agregación plaquetaria en respuesta a ADP (6,5 μ M) en sangre anticoagulada con hirudina: efecto de diferentes dosis de CMM-LA (células/mL) (n=8).

	CMM-LA:				
	--	15.000	30.000	150.000	300.000
AUC media (UA)	55,0 \pm 9,2	48,4 \pm 10,8	45,4 \pm 13,0	44,1 \pm 13,5	41,6 \pm 9,2
Agregación máxima (UA)	98,5 \pm 15,0	88,6 \pm 19,6	81,6 \pm 23,5	79,0 \pm 22,8	74,8 \pm 15,1
Velocidad media (UA/min)	12,5 \pm 2,0	11,1 \pm 2,3	10,1 \pm 3,1	10,58 \pm 3,5	9,74 \pm 2,9

Tabla 12. Medición de la agregación plaquetaria es respuesta a TRAP (10 μ M) en sangre anticoagulada con citrato sódico: efecto de diferentes dosis de CMM-LA (células/mL) (n=8).

	CMM-LA:				
	--	15.000	30.000	150.000	300.000
AUC media (UA)	82,9 \pm 12,2	75,6 \pm 11,6	73,7 \pm 11,5	66,0 \pm 10,2	62,5 \pm 9,9
Agregación máxima (UA)	133,4 \pm 18,2	122,5 \pm 16,8	118,5 \pm 18,2	107,7 \pm 14,9	101,8 \pm 14,7
Velocidad media (UA/min)	19,1 \pm 3,6	17,7 \pm 3,1	17,7 \pm 3	14,7 \pm 2,5	14,5 \pm 2,8

Tabla 13. Medición de la agregación plaquetaria en respuesta a TRAP (10 μ M) en sangre anticoagulada con hirudina: tras el efecto de diferentes dosis de CMM-LA (células/mL) (n=8).

	--	CMM-LA:			
		15.000	30.000	150.000	300.000
AUC media (UA)	84,0 \pm 12,3	70,3 \pm 15,2	70,8 \pm 9,6	62,2 \pm 17,7	61,8 \pm 13,8
Agregación máxima (UA)	141,3 \pm 20,8	119,2 \pm 26,2	119,7 \pm 17,1	105,5 \pm 28,6	104,4 \pm 22,6
Velocidad media (UA/min)	19,6 \pm 3,4	15,6 \pm 3,1	16,7 \pm 2,4	14,8 \pm 4,0	14,8 \pm 3,5

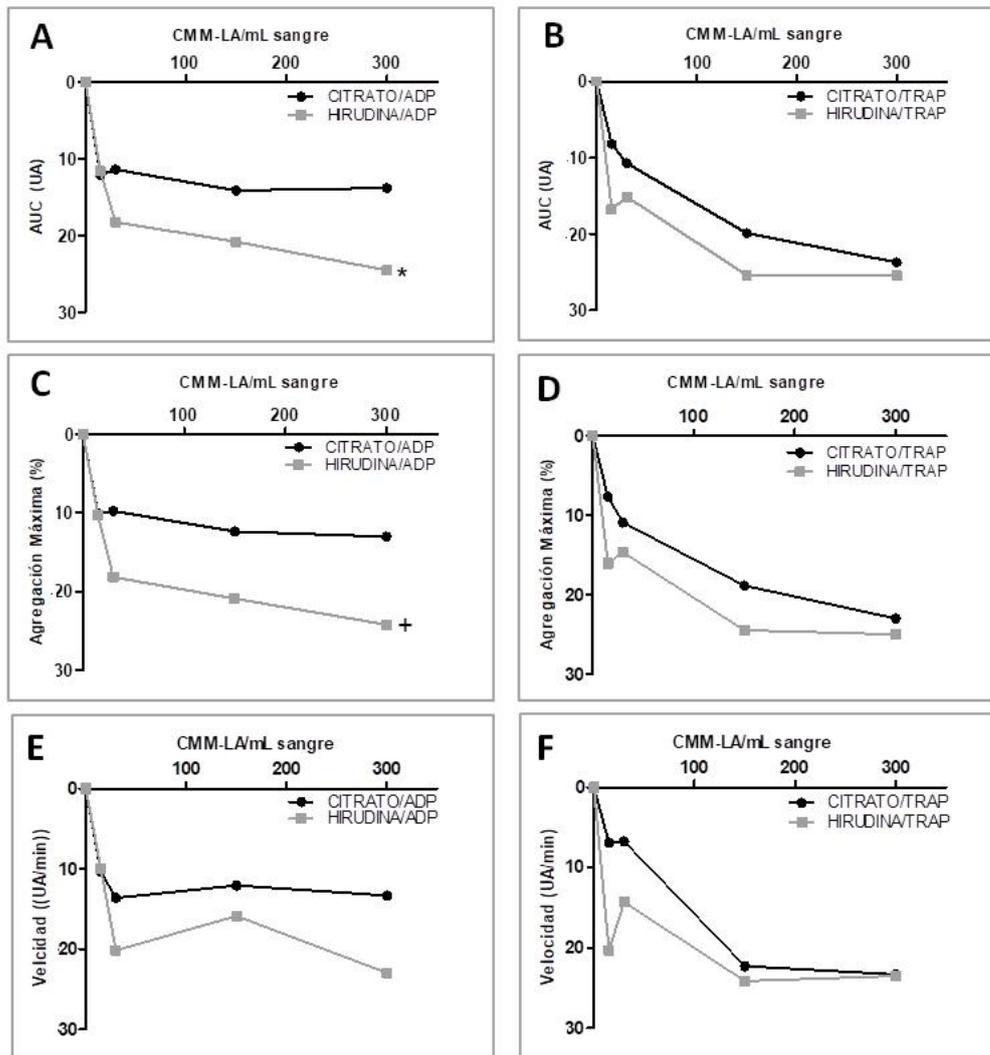


Figura 30. Porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria en respuesta a ADP (A, C, E) y TRAP (B, D, F), expresada como área bajo la curva (AUC, paneles superiores), agregación máxima (paneles intermedios), velocidad (paneles inferiores). Medición en Multiplate. Se observa una mayor inhibición de la agregación cuando el anticoagulante es la hirudina. ▲ $p < 0,05$ vs TRAP. (n=8).

V.5. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

V.5.1. Agregación en sangre entera por el método de citometría de flujo: Efecto de la presencia de CMM-LA.

Como se ha mostrado previamente, la incubación de la sangre con CMM-LA produjo una disminución en el conteo plaquetario y cierta agregación basal (aumento impedancia en el Multiplate), aunque disminuyó la respuesta a agonistas (Multiplate).

En el análisis de la agregación plaquetaria en sangre entera por citometría de flujo, también se observó que, en condiciones basales (en ausencia de agonista), la incubación de la sangre con CMM-LA produjo una agregación plaquetaria del 20 %. La presencia de heparina produjo una menor agregación basal. Al añadir los agonistas (ADP y TRAP) a la sangre, previamente incubada con CMM-LA, no se produjo alteración de la agregación plaquetaria, pero en presencia de heparina, sí observamos como las CMM-LA disminuyen significativamente la agregación plaquetaria, en respuesta al agonista TRAP (Figura 31).

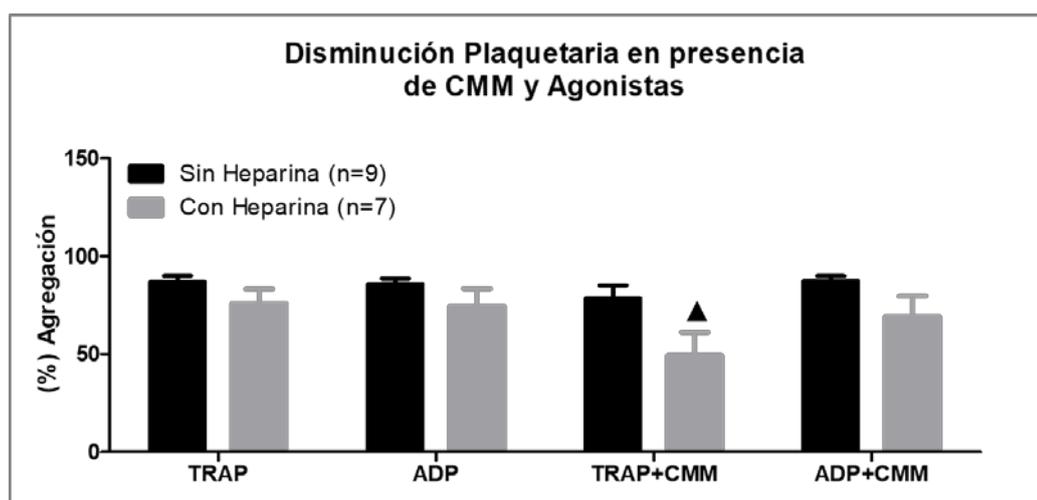


Figura 31. Agregación plaquetaria por citometría de flujo: el efecto de las CMM-LA (300.000 células/mL). Se observa una disminución de la agregación en las muestras incubadas con CMM respecto a su grupo control con heparina: ▲ $p < 0,05$ vs TRAP.

IV.5.2. Activación: Efecto de las CMM-LA sobre la expresión del marcador de activación plaquetaria P-selectina en respuesta a los agonistas ADP y TRAP.

Cuando hemos medido la agregación en respuesta a los agonistas ADP y TRAP, tanto en el Multiplate como por citometría hemos encontrado que las CMM-LA inhiben la respuesta de agregación plaquetaria. Esta inhibición de la agregación plaquetaria en respuesta a agonistas podría deberse a una verdadera inhibición plaquetaria por las CMM-LA o ser secundaria a la disminución del conteo plaquetario que se observa antes de añadir el agonista.

La citometría de flujo es una técnica que permite evaluar la activación plaquetaria (expresión de marcadores de activación) independientemente del conteo plaquetario. Por ello, nos propusimos utilizar éste método para valorar el efecto de las CMM-LA sobre las plaquetas aisladas (no unidas a CMM-LA o agregadas).

El análisis de la activación plaquetaria por citometría de flujo, muestra como en condiciones basales, la incubación de la sangre con CMM-LA no produce expresión de P-selectina en las plaquetas aisladas, es decir no hay una activación plaquetaria basal en presencia de CMM-LA. En presencia de heparina no se modifica la respuesta.

Al añadir agonistas a la sangre, previamente incubada con CMM-LA, la expresión de la P-selectina disminuye significativamente en respuesta a TRAP con respecto a su control sin CMM-LA. A su vez observamos que en presencia de heparina la expresión de P-selectina es aún menor respecto a su control sin CMM-LA. En respuesta al agonista ADP las plaquetas incubadas con CMM-LA no producen cambios en la expresión de P-selectina con respecto a su control sin CMM-LA (Figura 32).

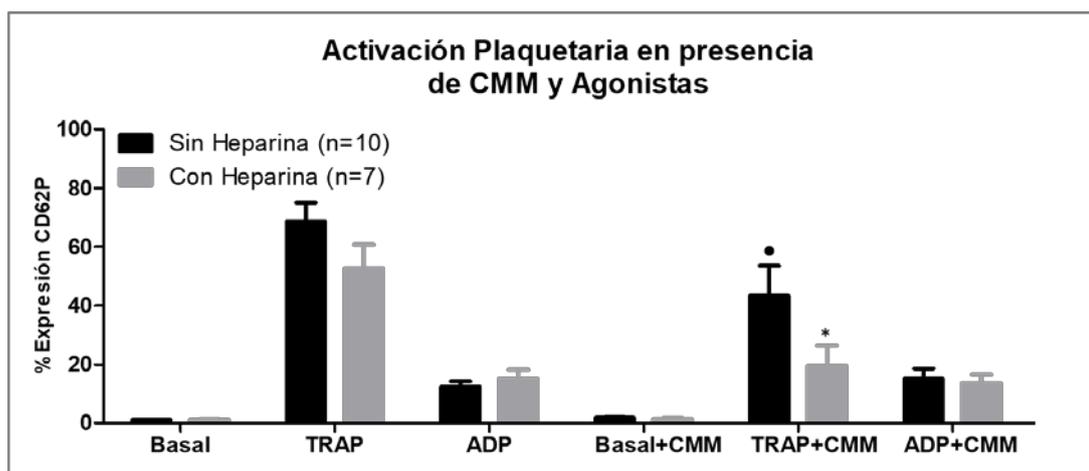


Figura 32. Expresión plaquetaria de P-Selectina por citometría de flujo: efecto de las CMM-LA (300.000 células/mL). Se observa una disminución de la activación en las muestras incubadas con CMM respecto a su grupo control sin y con heparina respectivamente: • $p < 0,05$ vs TRAP Sin Heparina; * $p < 0,05$ vs TRAP Con Heparina.

V.5.3. Medición del calcio plaquetario por citometría de flujo en presencia de CMM-LA

En la Figura 33 se muestra la estrategia de análisis utilizada para el estudio de la respuesta plaquetaria a las CMM-LA (300.000 /mL). En primer lugar (A), se representó un plot enfrentando SSC frente a FSC, lo que nos permitió localizar la población de plaquetas (P1) y la de glóbulos rojos (P2). Luego se representó un plot (B) enfrentando CD61 frente FSC, localizando la población de plaquetas CD61+(R1) y la población de agregados celulares (R2). Posteriormente se representaron los cambios de Ca^{2+} citoplasmático (Fluo-4AM) frente al tiempo (plot C), los cambios de CD61 frente al tiempo (plot D) y los cambios de FSC frente al tiempo (plot E), los tres plot se representan para toda la población, sin selecciones de población (gates). Finalmente, se representa los cambios de Ca^{2+} (Fluo-4AM) y de CD61 frente al tiempo en cada población: gate P1 (plot F, I), gate R1 (plot G, J), gate R2 (plot H, K).

Posteriormente se analizan los datos, para obtener en la población R1 (plaquetas CD61+) y en R2 (agregados plaquetas-CMM-LA) los valores medios de Fluo-4 cada 10 segundos, durante 7 minutos de registro.

La medición del Ca^{2+} plaquetario por medio de citometría de flujo, muestra como en condiciones basales, la incubación de la sangre con CMM-LA, produce en las plaquetas aisladas (gate R1 de la figura 33) un pequeño y transitorio aumento del calcio citoplasmático, seguido de un pequeño aumento mantenido (Figura 34). La ausencia de Ca^{2+} extracelular no cambia el aumento transitorio, pero impide el aumento mantenido, por lo que éste último probablemente se debe a entrada de Ca^{2+} extracelular. En presencia de heparina, no se altera la respuesta, por lo que la trombina no está implicada en esta activación de las plaquetas aisladas.

La adición de CMM-LA (300.000/mL) a sangre entera diluida permite observar la aparición de una población celular con alto FSC, lo que indica que son partículas de gran tamaño (agregados celulares). Estas partículas son más grandes que los agregados únicamente plaquetarios, pero son CD61+, lo que indica que contienen plaquetas. Serían agregados plaqueta-CMM-LA. En esta población, además se produce gran un aumento de Ca^{2+} citoplasmático, que es progresivo e irreversible (Figura 35). La ausencia de Ca^{2+} externo con EGTA (etilenglicol-bis (β -aminoetiléter)-N, N, N', ácido N'-tetraacético) o la inhibición de la trombina con heparina no impide los agregados CMM-LA. Estos datos indican que las plaquetas que se unen a las CMM-LA se activan y que ésta unión es independiente de Ca^{2+} y de la trombina que se pueda formar al activarse la hemostasia secundaria por el FT de las CMM-LA.

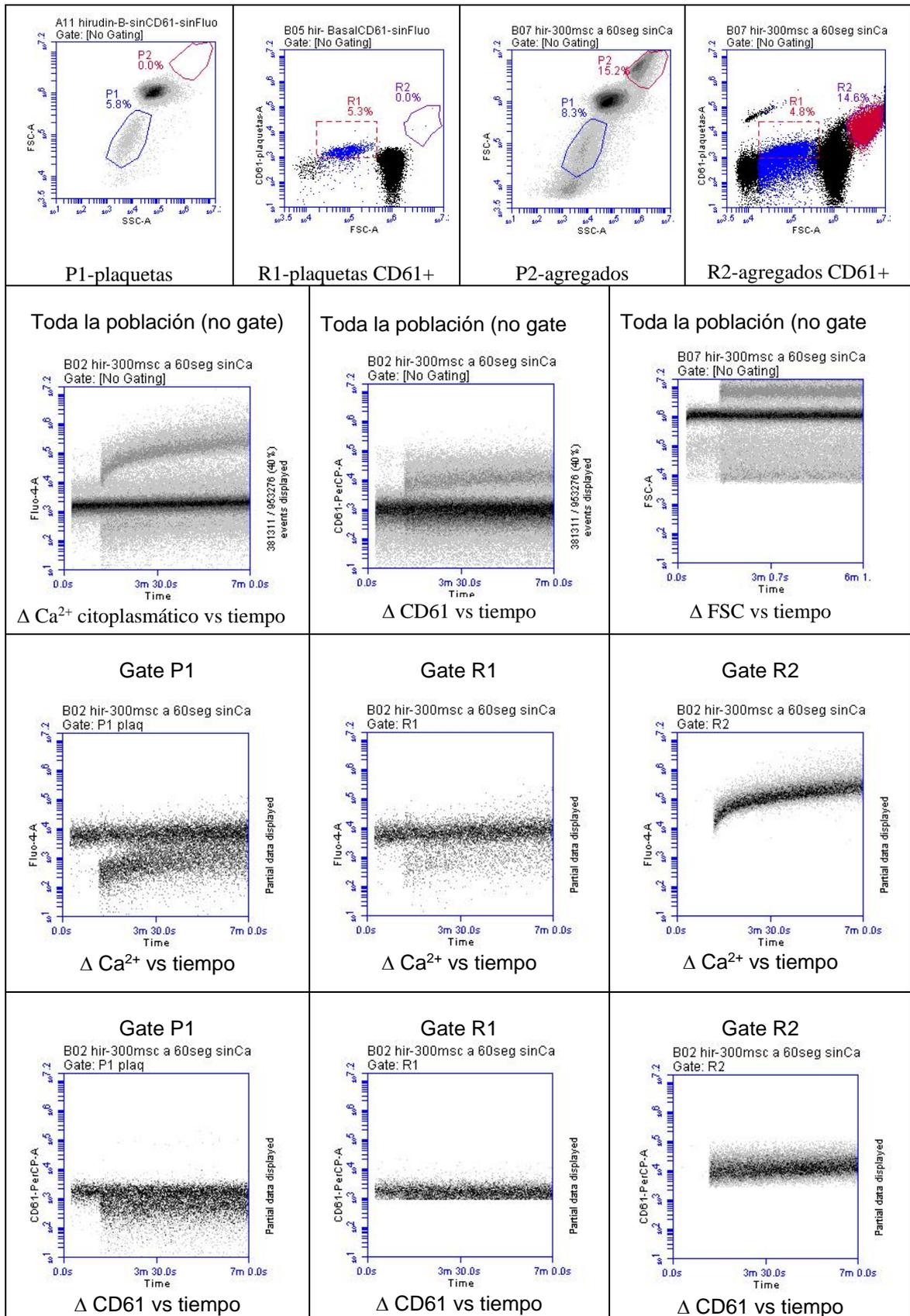


Figura 33. Estrategia de análisis utilizada para el estudio de los cambios de Ca^{2+} citoplasmático a lo largo del tiempo, en las distintas poblaciones celulares: R1-plaquetas, R2-agregados.

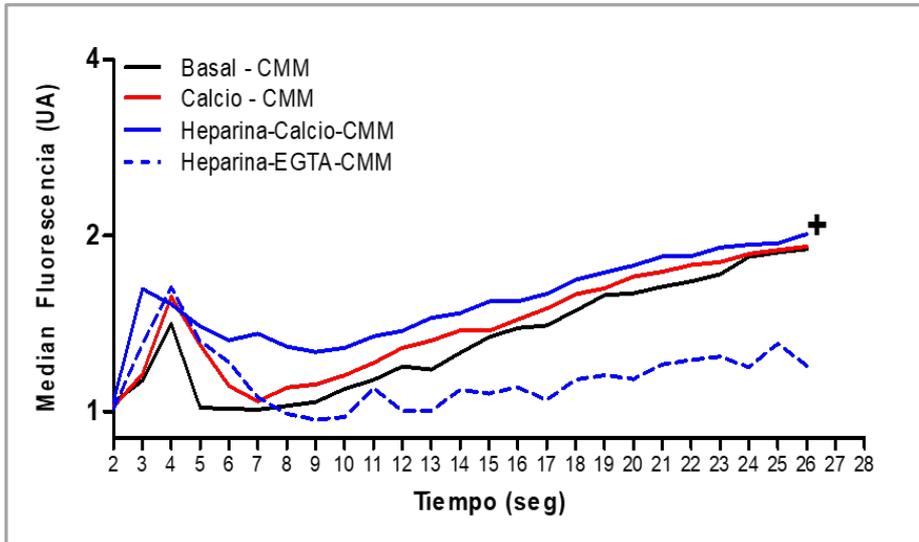


Figura 34. Incremento de Ca^{2+} intracitoplasmático en las plaquetas aisladas, en sangre con CMM-LA (300.000 células/mL), bajo diferentes condiciones experimentales, $+p < 0,05$ vs Heparina-EGTA. (n=8).

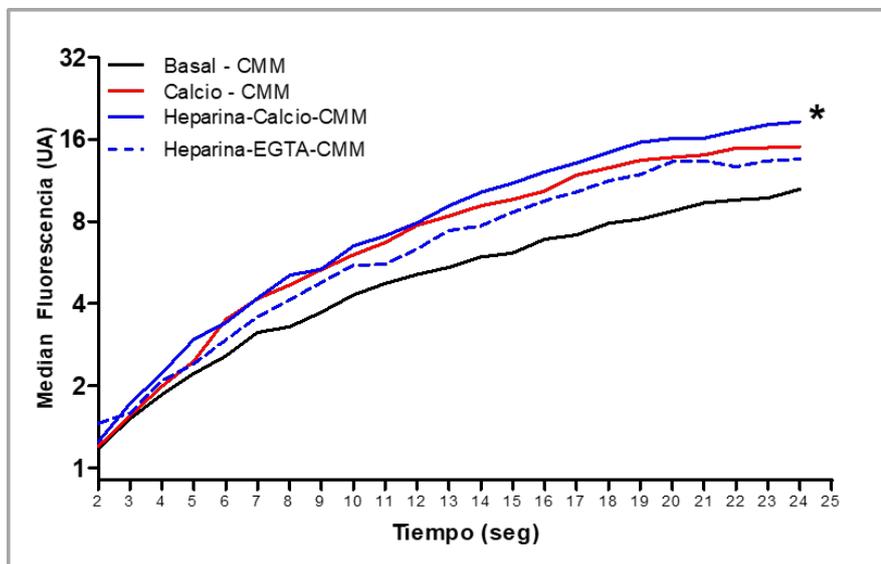


Figura 35. Incremento de Ca^{2+} intracitoplasmático en las plaquetas unidas a CMM-LA (300.000 células/mL), bajo diferentes condiciones experimentales, $*p < 0,05$ vs Basal. (n=8).

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

El uso de células madre en medicina regenerativa es hoy en día una excelente opción para el tratamiento de enfermedades y regeneración de tejidos y órganos (Mahla, 2016). Las primeras CM utilizadas con este fin fueron las células madre embrionarias (CME) y las células madre adultas (CMA), pero los problemas éticos, las posibilidades de rechazo inmune y formación de teratomas *in vivo* de las primeras, así como la dificultad de aislamiento, potencial de diferenciación limitado, especificidad organizada y vida útil acortada de las segundas (Xuetao Fei et al, 2013) hicieron necesaria la búsqueda de alternativas, postulándose las células madre mesenquimales (CMM) de tejidos extraembrionarios como excelentes candidatas (Prusa et al, 2003, In't Anker et al, 2003).

En nuestro estudio, se han utilizado CMM, aisladas a partir del líquido amniótico (LA) procedente de cesáreas de partos llevados a término entre la semana 36-39, siguiendo un método previamente descrito por Savickiene en 2015. Con este método obtuvimos CMM con morfología mesenquimal-fusiforme, correcta adherencia al plástico, alta capacidad de renovación y expansión *in vitro*. Como muestra el artículo de Hamid, et al (2017), el potencial de diferenciación *in vitro* de las CMM de partos a término es el mismo que las CMM aisladas en torno a la semana 12-15 tras realización de amniocentesis. En cuanto a la caracterización fenotípica, observamos la expresión de CD105, CD73 y CD90, los tres, marcadores de células mesenquimales y a su vez la no expresión de marcadores hematopoyéticos, CD34 y CD45. Las células se diferenciaron *in vitro*, con medios de cultivo específicos, a condrocitos, adipocitos y osteocitos. Todo ello, confirma la naturaleza mesenquimal de las células aisladas en este trabajo, cumpliendo con los criterios mínimos establecidos por la ISCT (Dominici et al, 2006).

El factor VIII de la coagulación se produce principalmente en las células sinusoidales hepáticas, almacenándose en los cuerpos de Weibel-Palade junto con el vWF, desde donde se secretan a plasma formando el complejo factor VIII-vWF (Turner et Moake, 2015; Yee et al, 2014). Diversos estudios muestran que los cultivos de CMM humanas de médula ósea, producen FVIII *in vitro*, secretándolo al medio de cultivo y que el vWF no está expresado en estas células (Sanada et al., 2013). En cambio, en nuestro estudio,

hemos detectado la expresión de ambos factores (vWF y FVIII) en las CMM-LA, en base a la expresión genotípica y fenotípica. Además, en estudios previos de nuestro grupo, también se ha encontrado la presencia del vWF y FVIII en membrana amniótica murina (Guillén, 2014). La síntesis de FVIII y vWF en una misma célula es importante, ya que el vWF puede aumentar la vida media del FVIII sintetizado por las CMM-LA, lo que puede ser un ventajoso, en caso de usarse éstas como Terapia celular en pacientes con hemofilia A.

Aunque a en la década de los 90, el equipo de Pronk, describió efectos protrombóticos asociados a las CMM, los primeros estudios clínicos de seguridad (usando principalmente CMM derivadas de médula ósea), no resaltaron este aspecto. Probablemente, los pocos efectos adversos trombóticos en estos estudios se debió a la fuente celular (médula ósea) y al menor número de células infundidas. Pero, actualmente, ya se ha demostrado que las CMM pueden interferir en el proceso hemostático tras ser administradas por vía intravenosa, produciendo reacciones adversas trombóticas, lo cual es de gran importancia, ya que esta fuente de CM se utiliza cada vez más en tratamientos con terapia celular (Furlani, 2009; Moll et al, 2012; Tatsumi et al, 2013). Esta acción se atribuye a la expresión del factor tisular (FT) en la superficie de las CMM, que desencadenaría la activación de la *vía extrínseca* de la coagulación, produciendo finalmente trombina (Gleeson, 2015). Las CMM-LA utilizadas en nuestros experimentos, mostraron una expresión media de FT del 27,72 %, al medirse mediante citometría de flujo. Esta expresión de FT es un valor intermedio frente a los niveles encontrados en otras fuentes de CMM. Christy y col, en 2017, describieron una expresión cercana al 100% en CMM de tejido adiposo frente a un 30-50 %, de expresión en CMM de médula ósea. La expresión de FT se debería acompañar por una estimulación de la *vía extraínseca*. En nuestro estudio hemos utilizado las pruebas clásicas de coagulación en plasma citratado, para ver si eran válidas para el estudio de los efectos en la hemostasia secundaria de las CMM-LA. Nuestros resultados muestran un acortamiento del TTPa, sin cambios en el TPa, en plasma de muestras de sangre citratada de individuos sanos, incubadas con CMM-LA *in vitro*. La medida del TPa en clínica está pensada para el estudio de déficit de factores, que producen un alargamiento de tiempo de coagulación. Por ello, pensamos que esta técnica no sería adecuada para detectar un acortamiento del TPa, por la infusión con CMM, aunque haya un exceso de FT.

El efecto *in vitro* procoagulante de las CMM, contrasta con la escasez de efectos adversos reportados tras su uso en la práctica clínica, a pesar del gran número de ensayos de seguridad realizados con CMM procedentes de médula ósea. Esto puede deberse a que las CMM de médula ósea, hasta ahora mayormente utilizadas en la práctica clínica, expresan un menor % de FT que las CMM de tejido adiposo. Sin embargo, el actual mayor uso de las CMM de tejido adiposo, responde a una más fácil obtención respecto a las de médula ósea y posibilidad de uso en trasplante alogénico, lo cual las convierte en una nueva fuente atractiva (Toyserkani, 2017). Puesto que los ensayos con CMM de tejido adiposo por vía endovenosa o arterial han ido aumentando, debería revisarse si los efectos adversos de tipo trombótico son más frecuentes con este tipo de CMM.

Otra posible explicación de los escasos efectos adversos reportados en los primeros ensayos de seguridad con CMM, es que las dosis inicialmente utilizadas eran bajas (hasta 1×10^6 cel/Kg) por lo tanto, al ser menor la expresión de FT, no se produjeron efectos trombóticos. Actualmente, al no haberse obtenido eficacia adecuada en los ensayos clínicos, se ha optado por aumentar la dosis de las CMM e incluso en realizar infusiones repetidas, lo cual se traduciría en mayor cantidad de FT y con ello mayor efecto procoagulante. Es por ello, que para el uso del tratamiento con infusión intravenosa de CMM, las células están acompañados de heparina ó sus análogos, como la hirudina, ya que diferentes autores han descrito su efecto protector, cuya función es inhibir la formación de trombina debida al FT, evitando los efectos trombóticos asociados al uso de la infusión intravenosa (Stephenne et al, 2012; Tatsumi et al, 2013; Gleeson et al, 2015; Moll et al, 2015, Li Liao et al, 2017).

Aun así, la regulación de la expresión del FT es compleja. Como se ha comentado previamente, depende de la fuente celular de las CMM, pero también de otros factores, como los suplementos usados en el medio de cultivo o del número de pases. Se ha descrito que, en pases iniciales, los niveles de FT son elevados y se mantienen hasta pases avanzados (pase 20), a partir de los cuales declina (Christy et al, 2017). En nuestro caso, utilizamos las CMM-LA entre un pase 4-6, que además de permitirnos obtener un número de células suficientes, presentaban una expresión media de FT por debajo del 30 %. Además, así evitamos el deterioro de las funciones celulares que se ha descrito en pases avanzados (Fei et al, 2013).

Otro efecto de las CMM sobre la hemostasia secundaria es el aumento de la fibrinólisis (Agis, 2008). En nuestros experimentos no se ha desarrollado este punto, pero sí parece interesante destacar que *in vivo*, este efecto activador de la fibrinólisis podría contrarrestar el efecto procoagulante de las CMM y explicar los escasos desenlaces finales trombóticos descritos en los ensayos clínicos.

Actualmente se buscan otras fuentes de CMM, alternativas al uso autólogo de médula ósea. Se prefieren fuentes alogénicas, de más fácil obtención y menor coste. Esto resulta muy interesante, puesto que en este trabajo estaríamos ante unas CMM-LA obtenidas de partos a término, de fácil aislamiento, cultivo y expansión. Además, las CMM-LA, en nuestras condiciones de cultivo, mostraron una baja expresión de de FT. Además muestran producción de vWF y FVIII. Todo ello, las convierte en excelentes candidatas para su uso en terapia celular y más particularmente en tratamiento de hemofilia A.

En este trabajo nos centramos en estudiar el efecto que tienen las CMM-LA sobre la función plaquetaria. Para el estudio, el adecuado proceso de extracción y manipulación de la muestra sanguínea es fundamental, para evitar la activación plaquetaria. Para ello se ha seguido el protocolo estandarizado de la ISTH (Cattaneo et al, 2013). Los datos de expresión del marcador de activación plaquetaria P-selectina en las muestras basales, demuestran que las plaquetas usadas en este estudio no estaban estimuladas tras la extracción, confirmando así la correcta manipulación de la sangre.

La incubación de sangre anticoagulada con las CMM-LA produjo una disminución del número de plaquetas, lo cual sugiere que las plaquetas podrían estar uniéndose a las CMM-LA y/o agregándose. Un estudio reciente realizado por Sheriff y col (2018), muestra una reducción de la turbidez del plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido a partir de muestras humanas, al adicionar CMM de cordón umbilical. Ellos relacionan esta disminución de la turbidez con una activación y agregación plaquetaria. De forma similar, se ha descrito una disminución del conteo plaquetario tras la infusión intravenosa, tanto en animales, como en humanos (Sheriff et al, 2018; Moll et al, 2012). La activación de la hemostasia secundaria producida por las CMM podría dar lugar a un aumento de trombina, que es un agonista plaquetario. Por ello, es importante que para descartar que la activación plaquetaria sea secundaria a la activación de la vía extrínseca

por el FT, se deben realizar los experimentos en presencia de un inhibidor de la trombina. De hecho, como se ha comentado previamente, el tratamiento de las CMM con heparina o análogos inhibe los efectos tromboticos de las CMM. En el estudio de Sheriff, el PRP puede ser una fuente de trombina, que pueda explicar la activación plaquetaria. Por ello, en nuestros experimentos hemos utilizado la heparina o la hirudina, que permite descartar que el efecto sobre la función plaquetaria sea debido a la formación de pequeñas cantidades de trombina.

El ensayo de agregometría óptica con PRP, es el clásico método utilizado en investigación para el estudio de la función plaquetaria (Guevara et al, 2012), aunque actualmente en el laboratorio clínico se prefiere el uso de la agregometría por impedancia en sangre entera (o Multiplate®), lo cual elimina las variables confusas en la preparación del PRP, al usar sangre entera, además de ser más simple y fácil de realizar. En este trabajo, hemos observado como al incubar la sangre de los voluntarios con CMM-LA, se detecta un aumento de impedancia, debido probablemente a la unión de las plaquetas activadas (agregados plaquetarios/plaquetas adheridas a CMM) al electrodo. Este ensayo puede realizarse con sangre citratada y con sangre anticoagulada con hirudina, lo que permite el estudio del efecto proagregante de las CMM, sin la formación de trombina. Esta prueba puede resultar útil para observar el efecto de las CMM-LA en el paciente antes de su infusión en terapia celular.

En el laboratorio clínico se utiliza el PFA-100, para estimar la adhesión y agregación plaquetaria, un sustituto del tiempo de sangría *in vivo*. En esta prueba se utiliza sangre citratada, que pasa a través de unos capilares cubiertos de colágeno-agonista, midiéndose el tiempo que tardan en obturarse, los capilares, al adherirse y agregarse las plaquetas. En nuestros experimentos, el tiempo de obturación en respuesta a estos agonistas no se modificó significativamente tras la pre-incubación de la sangre con CMM. Esto sugiere que las CMM-LA no modifican la adhesión-agregación plaquetaria en estas condiciones, ó que esta prueba no es lo suficientemente sensible ó adecuada para ver el efecto de las CMM sobre la función plaquetaria. Según se ha comentado previamente, las CMM-LA disminuyen la activación plaquetaria, lo que debería aumentar el tiempo de obturación. Pero también, Sheriff et al (2018) han descrito que cuando las CMM se unen a las plaquetas y las activan (como las CMM-LA), se produce un aumento de la adhesión de las plaquetas activadas al colágeno sub-endotelial. La

disminución de la activación se podría así compensar con el aumento en la adhesión, produciendo un tiempo de obturación final similar al medido previamente en ausencia de CMM.

En el metabolismo de los nucleótidos de purina, participan dos ectonucleotidasas. La primera de ellas, la difosfohidrolasa-1 ectonucleósido trifosfato (CD39), es una proteína de membrana integral, que fosfohidroliza en un primer paso la adenosina 5'-trifosfato (ATP) y de manera menos eficiente la adenosin 5'- difosfato (ADP), en presencia de calcio y magnesio para producir adenosina 5'-monofosfato (AMP). La segunda ectonucleotidasa, es la ecto-5'-nucleotidasa (CD73), que defosforila el AMP extracelular en adenosina (Antonioli et al, 2013). El producto final, la adenosina, puede interactuar con diferentes receptores de membrana. Por ejemplo, unirse a receptores A2A de Células T (A2A), adquiriendo estas células el estado de anergia y produciendo células T reguladoras. También pueden unirse a receptores A2B de las células presentadoras de antígeno (CPA), adquiriendo un fenotipo tolerogénico (Dunavin, 2018).

Ambas ectonucleasas están siendo estudiadas como dianas terapéuticas para el tratamiento de numerosas enfermedades (trastornos autoinmunes, inflamatorios, infecciones, procesos tumorales, aterosclerosis...), con la finalidad de evitar la producción de adenosina (Antonioli et al, 2013).

La adenosina presenta fuertes propiedades inmunosupresoras, Zhang describió en 2011, los efectos negativos de la adenosina extracelular generada por el tumor sobre la respuesta inmune de las células T, lo cual incluye la inhibición de la respuesta inducida por antígenos de proliferación, secreción de IL-2 y citoquinas proinflamatorias como el INF- γ y TNF- α , regulación positiva de CD25, inducción de moléculas efectoras citolíticas (perforina y ligando Fas) y supresión de células natural killer (CNK). Sin embargo, las células tumorales expresan poca cantidad de CD39, resultando una escasa producción de adenosina (Schuler, 2016). Autores como Kerkela, subrayan como en presencia de células T, las células tumorales si pueden convertir nucleótidos en adenosina, ya que los linfocitos T si son CD39+ (Schuler, 2016). Este efecto ya fue reportado en 2011 por Saldanha-Araujo y col, quienes observaron una producción incrementada de adenosina al incubar las CMM con linfocitos T. Zhang y col (2011)

describieron un posible mecanismo de inmunoterapia dirigida contra la enzima de superficie CD73, basado en inhibidores ó anticuerpos monoclonales, donde se controlaría la producción de adenosina, evitando el crecimiento tumoral y permitiendo el papel inmunomodulador de las células T.

Respecto a las CMM, se ha demostrado ampliamente su potencial inmunomodulador, habiéndose descrito varios mecanismos responsables de este efecto (Haddad& Saldanha-Araujo, 2014; Lee et al, 2014). Recientemente, Kerkela et al (2016) han hallado un nuevo mecanismo inmunosupresor de las CMM, llevado a cabo por la vía adenosinérgica en presencia de las ectonucleotidasas CD73 y CD39. En cuanto a la expresión de las ectonucleotidasas en CMM, se ha visto que depende de la fuente de CMM, es decir del tejido celular del que se obtienen (Schuler, 2016). El CD73 es un marcador típicamente expresado en las CMM, pero respecto al CD39 los resultados no están claros, ya que pocos autores lo encuentran expresado en estas células, que se describen típicamente como CD39^{neg}. Algunos autores han encontrado expresión de CD39 en CMM derivadas del estroma oral (Schuler et al, 2016) o de médula ósea (Lee et al, 2014; Kerkela et al, 2016), aunque éstos últimos describen que la expresión de CD39 en CMM de médula ósea es de baja intensidad, en un 30-70 % de las células, a diferencia de la expresión de CD73 que se produce con alta intensidad en el 100 % de las CMM. En nuestro estudio, las CMM-LA expresaron el CD73, prácticamente el 100% de la población celular y en alta intensidad. Respecto al CD39 no se ha medido, por lo que no podemos descartar que se exprese en estas células.

Recientemente Netsch et al (2018) han mostrado que la co-incubación de CMM con plaquetas, produce inhibición de la respuesta plaquetaria a agonistas, debido a que aumenta la adenosina, producida a partir del ATP/ADP, liberados por las propias plaquetas activadas tras la adición de los agonistas. Estos nucleótidos se transforman en adenosina, en presencia de CMM, ya que las plaquetas son ricas en CD39, pero pobres en CD73, ectonucleotidasa que sería aportada por las CMM. Este efecto regulatorio de la función plaquetaria, lo observan en presencia de agonista, pero no basalmente.

En nuestro caso, hemos observado también un efecto inhibitorio de la activación y agregación plaquetaria en presencia de CMM-LA. Puesto que nuestras CMM expresan CD73 casi al 100 %, posiblemente parte del efecto inhibitorio sea debido a la

producción de adenosina debida a la interacción entre el CD39 expresado en plaquetas y el CD73 presente en las CMM-LA. Pero nosotros también hemos detectado que en condiciones basales se produce una estimulación de la agregación (adhesión de plaquetas con otras plaquetas, leucocitos y CMM), que se acompaña de una activación de las plaquetas formando parte de los agregados (aumento del calcio intracelular). Por tanto, esta activación de las plaquetas adheridas a las CMM-LA produciría adenosina en condiciones basales (ausencia de agonistas plaquetarios), inhibiendo las plaquetas no unidas a las CMM y condicionando la posterior menor respuesta de estas plaquetas a los agonistas.

Estudios recientes, como el realizado por Leng Teo y col en 2015, muestra como las CMM pueden unirse a diferentes células sanguíneas, como las plaquetas o leucocitos. Previamente hemos comentado cómo la interacción CMM-linfocitos, produce adenosina y contribuye al efecto inmunosupresor de las CMM sobre los linfocitos T. En 2009, Langer y col, describieron como las plaquetas desempeñan un papel fundamental en el reclutamiento, proliferación, migración e integración de las CMM en el endotelio. Pero se conoce poco sobre los mecanismos de adhesión plaqueta-CMM y si esta interacción modifica la ulterior adhesión de las CMM al endotelio inflamado/matriz sub-endotelial.

La unión de las CMM a las plaquetas se produce a través de integrinas beta-1 (CD29, receptor del colágeno) (Sheriff et al, 2018). También se ha descrito que las CMM poseen receptores de la P-selectina, como la Galectina-1 (Suila et al, 2014) o ligandos para el receptor plaquetario CLEC-2, como la podoplanina (Sheriff et al, 2018). Recientemente, en el artículo publicado por Sheriff et al (2018), se describe como al incubar la sangre con CMM de cordón umbilical, las plaquetas se activan y agregan, resultando una disminución final en el recuento de plaquetas, mientras que al incubar la sangre con CMM de médula ósea no se observa activación alguna ni cambios en el conteo final de las plaquetas. Este efecto fue atribuido a la presencia de podoplanina en las CMM de cordón umbilical pero no en las de médula ósea. En nuestro caso, las CMM-LA también expresaron podoplanina, detectada por PCR y citometría de flujo, lo cual sugiere que las CMM-LA pueden adherirse a las plaquetas y activarlas, en ausencia de agonistas. Esta adhesión explica la disminución del conteo plaquetario producido en nuestros experimentos. Así, al incubar *in vitro* la sangre con las CMM-LA, hemos observado que, en ausencia de agonistas añadidos, disminuye el número de plaquetas

(tubo de hemograma anticoagulado con EDTA, citrato o hirudina; o contaje relativo de plaquetas mediante citometría) y se produce aumento de impedancia en el Multiplate, lo que sugiere agregados. Futuros experimentos son necesarios para confirmar el papel de la podoplanina en la regulación de la función plaquetaria de los agregados plaqueta-CMM-LA. Y cómo las plaquetas activadas unidas a CMM-LA pueden modular la interacción con la matriz sub-endotelial o endotelio vascular y el injerto de las CMM en los tejidos.

Estudios futuros, son necesarios para determinar el tipo de interacción entre las plaquetas y CMM (receptores implicados); si esta interacción puede ser determinante en los efectos adversos producidos tras infusión intravenosa. De igual manera, es importante evaluar la eficacia de la modificación de la interacción plaqueta-CMM, es decir si la disminución de los agregados CMM-plaquetas altera la adhesión, injerto y propiedades inmoduladoras de las CMM.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

De la interpretación de los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir:

1. El líquido amniótico obtenido de partos a término es una fuente adecuada de células madre mesenquimales.
2. Las células madre mesenquimales derivadas de líquido amniótico (CMM-LA) expresan factores de la coagulación y adhesión celular, pudiendo modular la hemostasia, lo que sugiere su potencial papel en la modulación de la hemostasia.
3. Las CMM-LA inducen cambios en la función plaquetaria, independientemente de sus efectos procoagulantes.

VIII. RESUMEN

VIII. RESUMEN

Introducción: Las células madre mesenquimales (CMM) obtenidas a partir de tejidos extraembrionarios, representan una nueva fuente de células madre para su uso en terapia celular. Están exentas de los problemas éticos y potencial tumorigénico asociados a las células madre embrionarias. Y respecto a las células madre adultas, presentan una mayor capacidad de proliferación y de diferenciación. Una de las fuentes de las CMM es el líquido amniótico, las cuales han demostrado tener excelentes propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, así como baja inmunogenicidad y teratogenicidad en trasplantes *in vivo*. Recientemente, se han descrito efectos secundarios, principalmente fenómenos trombóticos cuando se administran las CMM por vía intravenosa. Estos efectos adversos se han relacionado con una mayor expresión del factor tisular, el cual activaría la vía extrínseca de la coagulación produciendo finalmente trombina. Se ha visto como las CMM interactúan con otras células, entre ellas las plaquetas, elementos con un papel fundamental en la hemostasia.

Objetivos: El objetivo principal es evaluar el efecto *in vitro* de las células madre mesenquimales de líquido amniótico (CMM-LA) sobre la función plaquetaria. Como objetivos secundarios nos planteamos el aislamiento, cultivo, caracterización de CMM-LA obtenidas de partos a término, analizar el efecto de las CMM-LA sobre la agregación y adhesión, evaluar el efecto de las CMM-LA sobre la expresión de marcadores de activación plaquetaria y el estudio del efecto de las CMM-LA sobre los niveles citoplasmáticos del calcio plaquetario.

Material y métodos: las CMM se obtuvieron de líquidos amnióticos (LA) de cesáreas programadas de partos a término. Posteriormente se cultivaron en medio *Amniomed*, realizando un seguimiento del cultivo cada 48-72 horas. A los 30 días, se evaluó su capacidad de diferenciación a condrocitos, adipocitos y osteocitos, así como su identificación realizando la caracterización fenotípica. Así mismo se llevó a cabo el análisis molecular de las CMM-LA. En cuanto al análisis del efecto de las CMM-LA sobre la función plaquetaria se realizaron los ensayos clásicos de PFA-100 y Multiplate. Por citometría de flujo también se analizó el efecto de las CMM-LA sobre la agregación plaquetaria, sobre la expresión de marcadores de activación plaquetaria y sobre los niveles citoplasmáticos del calcio plaquetario.

Resultados: Los cultivos de CMM-LA mostraron alta proliferación, capacidad de diferenciación y expresaron los marcadores mesenquimales CD105+, CD90+ y CD73+ y los factores de la coagulación y adhesión: factor VIII, factor de von Willebrand, factor tisular y podoplanina, siendo negativas para los marcadores hematopoyéticos CD45- y CD34-. En cuanto al estudio del efecto de las CMM-LA sobre la función plaquetaria, no se observaron diferencias por el analizador PFA-100. Por el contrario, el sistema Multiplate y el análisis por citometría de flujo sí mostraron cambios en la agregación y activación plaquetaria (expresión de P-selectina) tanto basalmente como en presencia de agonistas. Al evaluar el calcio plaquetario por citometría de flujo, observamos como la presencia de CMM-LA produce un ligero aumento de calcio citoplasmático en las plaquetas aisladas, mantenido solo en presencia de calcio extracelular, por el contrario las plaquetas que si interaccionan con las CMM-LA mostraron un progresivo y significativo aumento del calcio citoplasmático. Al realizar los mismos experimentos con heparina, cuya función es inhibir la producción de trombina, se observaron cambios significativos en la agregación, donde se observó una reducción de la respuesta, en la activación donde se disminuyó aún más la expresión de P-selectina, y en el aumento de calcio citoplasmático plaquetario de los agregados.

Conclusiones: El líquido amniótico obtenido de partos a término es una fuente adecuada para la obtención de CMM. Las CMM-LA inducen cambios en la función plaquetaria, independientemente de sus efectos procoagulantes.

Palabras clave: células madre, líquido amniótico, función plaquetaria.

ABSTRACT

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from extraembryonic tissues, represent a new source of stem cells for use in cell therapy. They are exempt from the ethical problems and tumorigenic potential associated with embryonic stem cells. Moreover, with respect to adult stem cells, they have a greater capacity for proliferation and differentiation. One of the sources of MSCs is amniotic fluid, which have shown to have excellent immunomodulatory, anti-inflammatory properties, as well as low immunogenicity and teratogenicity in *in vivo* transplants. Recently, side effects have been described, mainly thrombotic phenomena were administered intravenously. These adverse effects, have been related to a greater expression of tissue factor, which would activate the extrinsic coagulation pathway, ultimately producing thrombin. It has been seen how MSCs interact with other cells, including platelets, elements with a fundamental role in hemostasis.

Objectives: The main objective is to evaluate the *in vitro* effect of amniotic fluid mesenchymal stem cells (MSCs-LA) on platelet function. As secondary objectives we consider the isolation, culture, characterization of MSCs-LA obtained from term births, analyze the effect of the MSCs -LA on the aggregation and adhesion, evaluate the effect of the MSCs-LA on the expression of activation markers platelet and the study of the effect of the MSCs -LA on the cytoplasmic levels of platelet calcium.

Material and methods: MSCs were obtained from amniotic fluids (LA) of scheduled cesarean deliveries at term. Later they were cultivated in *Amniomed medium*, monitoring the culture every 48-72 hours. After 30 days, their capacity for differentiation into chondrocytes, adipocytes and osteocytes was evaluated, as well as their identification by phenotypic characterization. Likewise, the molecular analysis of the MSCs-LA was carried out. Regarding the analysis of the effect of the MSCs -LA on the platelet function, the classic PFA-100 and Multiplate trials were carried out. The effect of MSCs-LA on platelet aggregation, on the expression of platelet activation markers and on the cytoplasmic levels of platelet calcium was also analyzed by flow cytometry.

Results: The cultures of MSCs-LA showed high proliferation, differentiation capacity and expressed the mesenchymal markers CD105+, CD90+ and CD73+ and the factors of coagulation and adhesion: factor VIII, von Willebrand factor, tissue factor and

podoplanin, being negative for the hematopoietic markers CD45- and CD34-. No differences were observed by PFA-100 analyzer. By the other way, the Multiplate system and the flow cytometric analysis did show changes in aggregation and platelet activation (expression of P-selectin) both basally and in the presence of agonists. When evaluating platelet calcium by flow cytometry, we observed how the presence of MSCs-LA produces a slight increase in cytoplasmic calcium in isolated platelets, maintained only in the presence of extracellular calcium. On the contrary, platelets that interact with MSCs-LA showed a progressive and significant increase in cytoplasmic calcium. heparin potentiate the inhibition of the aggregation and activation in platelets.

Conclusions: The amniotic fluid obtained from term deliveries is an adequate source for obtaining MSCs. MSCs-LA induce changes in platelet function, regardless of their procoagulant effects.

Key words: stem cells, amniotic fluid, platelet function.

X. BIBLIOGRAFIA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Agis H, Kandler B, Fischer MB, Watzek G, Gruber R. Activated platelets increase fibrinolysis of mesenchymal progenitor cells. *J Orthop Res*. 2009;27(7):972–80.
- Alvarado Arteaga IM. Fisiología de la coagulación: nuevos conceptos aplicados al cuidado perioperatorio. *Univ Méd*. 2013;54(3):338–52.
- Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):203–9
- Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. NIH Public Access. *Trends Mol Med*. 2013;19(6):355–67.
- Antonucci I, Stuppia L, Kaneko Y, Yu S, Tajiri N, Bae EC, et al. Amniotic fluid as a rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. *Cell Transplant*. 2011;20(6):789–95.
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108(7):863–8.
- Batsali AK, Kastrinaki M-C, Papadaki HA, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013; 8:144–55
- Bermejo E. Plaquetas Platelets. 2017; 21:10–8.
- Bernard A. Biología de las células madre. 9ª edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana. 39-55
- Campuzano-Maya G. PFA-100: una nueva prueba de función plaquetaria sustituta del tiempo de sangría. 2013; 19:511–48.
- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: A consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*. 2013;11(6):1183–9.
- Caussinus E, Gonzalez C. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*. 2005;37(10):1125–9.
- Christy BA, Herzig MC, Montgomery RK, Delavan C, Bynum JA, Reddoch KM, et al. Pro-coagulant activity of human mesenchymal stem cells. *J Trauma Acute Care Surg*. 2017;83(1).

- Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, et al. Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):113–7.
- Córdova Pluma VH, Vargas Viveros P, Vega C, Quintero M, Hurtado Monroy R. Agregometría Plaquetaria: El Estudio De La Agregación De Las Plaquetas Y La Disfunción Plaquetaria. *Med Interna México Vol Med Int Mex*. 2011;2727(11):58–74.
- De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. 2007;25(1):100–6.
- 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* [2006 [cited 2018 Mar 13];8(4):315–7.
- Dunavin N, Dias, Li M, McGuirk J. Mesenchymal Stromal Cells: ¿What Is the Mechanism in Acute Graft-Versus-Host Disease? *Biomedicines*. 2017;5(3):39.
- Fauza D, Crane JP, Cheung SW, Milunsky A, Hoehn H, Salk D, et al. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(6):877–91.
- Fei X, Jiang S, Zhang S. Isolation, Culture, and Identification of Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Biochem Biophys*. 2013; 67:689–94.
- Flores-Rivera OI, Meza-Márquez JM, Nava-López JA, Ramírez-Morales K. Fisiología de la coagulación. *Rev Mex Anestesiología*. 2014;37: S382–6.
- Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu MM, Cheng L, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006;27(9):1114–22.
- Furlani D, Ugurlucan M, Ong LL, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? *Mesenchymal stem cells and intravital microscopy*. *Microvasc Res*. 2009;77(3):370–6.
- García-Guillén A.I, Soriano-Filiu A, García-Navarro E, Romecín PA, Millán-R JE, Moraleda JM, García-Bernal D, Atucha NM. Isolation, culture and characterization of the biological properties of murine amniotic membrane stem cells for regenerative cell therapy studies. *Human Gene Therapy*, vol 25 (11): A116-A117. 2014. ISSN: 1043-0342
- Gebhard C, Akhmedov A, Mocharla P, Angstenberger J, Sahbai S, Camici GG, et al. PDGF-CC induces tissue factor expression: role of PDGF receptor α/β . *Basic Res Cardiol*. 2010;105(3):349–56.
- George JN. Platelets. *Lancet*. 2000; 355:1531–9.
- Gleeson BM, Martin K, Ali MT, Kumar AHS, Pillai MGK, Kumar SPG, et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Have Innate Procoagulant Activity and Cause Microvascular Obstruction Following Intracoronary Delivery: Amelioration by Antithrombin Therapy. *Stem Cells*. 2015;33(9):2726–37.

- González-Merlo J, Laílla Vicens J.M, Fabre González E, González Bosquet E. La placenta, las membranas ovulares, el líquido amniótico y sus funciones. En: González Merlo, J. *Obstetricia*. 6ª edición. Elsevier; 2013. 56-59
- Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Kölble N, Done' E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: Isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2009;116(2):166–72.
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*. 2004;114(5–6 SPEC. ISS.):397–407.
- Guevara-Arismendy NM, Escobar-Gallo GE, Campuzano-Maya G. Utilidad clínica de la agregometría plaquetaria. *Medicina&Laboratorio*. 2012;18(7–8):311–32.
- Haddad R et Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: What do we know so far? *Biomed Res Int*. 2014;
- Hamid AA, Joharry MK, Mun-Fun H, Hamzah SN, Rejali Z, Yazid MN, et al. Highly potent stem cells from full-term amniotic fluid: A realistic perspective. *Reprod Biol*. 2017;17(1):9–18.
- Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Braumgartner J, Dash PK, et al. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 2009;110(6):1189–97.
- Hill GR, Morris ES, Fuery M, Hutchins C, Butler J, Grigg A, et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation with Peripheral Blood Stem Cells Mobilized by Pegylated G-CSF. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(6):603–7.
- Holden C. Stem cells. Versatile stem cells without the ethical baggage? *Science*. 2007;315(5809):170.
- In't Anker PS. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003;102(4):1548–9.
- Izaguirre-Avila. R. El descubrimiento de las plaquetas. *Rev Biomédica*. 1997;8(3):197–208.
- Jiang L, Song XH, Liu P, Zeng CL, Huang Z Sen, Zhu LJ, et al. Platelet-mediated mesenchymal stem cells homing to the lung reduces monocrotaline-induced rat pulmonary hypertension. *Cell Transplant*. 2012;21(7):1463–75.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002;30(8):896–904.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41–9.

- Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998;394(6694):690–4.
- Kerkelä E, Laitinen A, Rabinä J, Valkonen S, Takatalo M, Larjo A, et al. Adenosinergic Immunosuppression by Human Mesenchymal Stromal Cells Requires Co-Operation with T cells. *Stem Cells*. 2016;34(3):781–90.
- Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif*. 2007;40(1):75–90.
- Klemmt PAB, Vafaizadeh V, Groner B. Murine amniotic fluid stem cells contribute mesenchymal but not epithelial components to reconstituted mammary ducts. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(3):1–13.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000;6(11):1229–34.
- Langer HF, Stellos K, Steingen C, Frohofer A, Schönberger T, Krämer B, et al. Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(2):315–25.
- Lee JJ, Jeong HJ, Kim MK, Wee WR, Lee WW, Kim SU, et al. CD39-mediated effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the human Th17 cell function. *Purinergic Signal*. 2014;10(2):357–65.
- Leger AJ, Jacques SL, Badar J, Kaneider NC, Derian CK, Andrade-Gordon P, et al. Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis. *Circulation*. 2006;113(9):1244–54.
- Liao L, Shi B, Chang H, Su X, Zhang L, Bi C, et al. Heparin improves BMSC cell therapy: Anticoagulant treatment by heparin improves the safety and therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cell cytotrapy. *Theranostics*. 2017;7(1):106–16.
- Loh Y, Agarwal S, Park I, Urbach A, Huo H, Heffner GC, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Hematop Stem Cells*. 2009;113(22):1–3.
- MacKman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg*. 2009;108(5):1447–52.
- Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int J Cell Biol*. 2016;2016.
- Martínez-Arias M, López-Martínez B, Parra-Ortega RESUMEN I. Pruebas de laboratorio para la evaluación de la función de las plaquetas. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2015;62(4):245–52.
- Mateo J, Santamaria A, Borrell M, Souto JC, Fontcuberta J. “Fisiología y exploración de la hemostasia”. En: Sans Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL, eds. *Hematología Clínica*. Madrid: Harcourt, 2001; 597-618.

- Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: Potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4(SUPPL. 1):21–6.
- McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost*. 2001;86(3):746–56.
- Michelle A. Berny-Lang, A.L. Frelinger III, Marc R. Barnard and Alan D. Michelson. Flow Cytometry. En: Alan Michelson. *Platelets*. 3ª edición. Boston: Elsevier; 2013. 581-602
- Moll G, Ignatowicz L, Catar R, Luecht C, Sadeghi B, Hamad O, et al. Different Procoagulant Activity of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Placental Decidua. *Stem Cells Dev*. 2015;24(19):2269–79.
- Moll G, Rasmusson-Duprez I, von Bahr L, Connolly-Andersen A-M, Elgue G, Funke L, et al. Are Therapeutic Human Mesenchymal Stromal Cells Compatible with Human Blood?. *Stem Cells*. 2012;30(7):1565–74.
- Morgan-Ortiz F, Valentín Morgan-Ruiz F, Quevedo-Castro E, Gutierrez-Jimenez G, Báez-Barraza J, Morgan Ortiz Eustaquio F. Anatomía y fisiología de la placenta y líquido amniótico. 2015;5(4):156–64.
- Netsch P, Elvers-Hornung S, Uhlig S, Klüter H, Huck V, Kirschhöfer F, et al. Human mesenchymal stromal cells inhibit platelet activation and aggregation involving CD73-converted adenosine. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):1–17.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson J a. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19(3):193–204.
- Ohyama M, Udey MC, Vogel JC, Ohyama M, Terunuma A, Tock CL. Characterization and isolation of stem cell– enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest*. 2006;116(1):249–60.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701–5.
- Otero MJ, González-Navarro EA. Educación continuada en el laboratorio clínico. 2014; 19–27.
- Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al. P63 Identifies Keratinocyte Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(6):3156–61.
- Pérez JCJ, Garza Veloz I, Rocío OL. Células Madre. *Med Univ*. 2007;9(36):140.
- Pronk A, de Groot PG, Hoyneck van Papendrecht AAG., Verbrugh HA, Leguit P, van Vroonhoven TJM., et al. Thrombogenicity and Procoagulant Activity of Human Mesothelial Cells. 1992;12(12):1428–36.
- Prusa A-R, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschläger M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research?. *Hum Reprod*. 2003;18(7):1489–93.

- Prusa A-R et Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit.* 2002;8(11): RA253-A257.
- Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, et al. Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans. *Stem Cells Dev.* 2011;20(8):1297–308
- Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the Origin of the Term “Stem Cell.” *Cell Stem Cell.* 2007;1(1):35–8.
- Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2006;312(12):2169–79.
- Rennie K, Gruslin A, Hengstschläger M, Pei D, Cai J, Nikaido T, et al. Applications of amniotic membrane and fluid in stem cell biology and regenerative medicine. *Stem Cells Int.* 2012;2012.
- Robey PG. Series Introduction: Stem cells near the century mark. *Stem cells near the century mark. J Clin Invest.* 2000;105(11):1489–91.
- Rodríguez-Pardo VM. Células madre y perspectivas de investigación. *Pontif Univ Javeriana.* 2005;10(1):5–14.
- Ross, Pawlina. *Histología.* 5ª edición. Buenos Aires, Argentina; 2007. 124-127 p.
- Ruf W, Riewald M. Regulation of Tissue Factor Expression. *Madame Curie database.*
- Saldanha-Araujo F, Ferreira FIS, Palma P V., Araujo AG, Queiroz RHC, Covas DT, et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res.* 2011;7(1):66–74.
- Sanada C, Kuo C-J, Colletti EJ, Soland M, Mokhtari S, Knovich MA, et al. Mesenchymal stem cells contribute to endogenous FVIII:c production. *J Cell Physiol.* 2013;228(5):1010–6.
- Savickiene J, Treigyte G, Baronaite S, Valiuliene G, Kaupinis A, Valius M, et al. Human amniotic fluid mesenchymal stem cells from second- and third-trimester amniocentesis: Differentiation potential, molecular signature, and proteome analysis. *Stem Cells Int.* 2015.
- Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier. *Transplant Proc.* 2007;39(2):573–6.
- Schuler PJ et Brandau S. Adenosine Producing Mesenchymal Stem Cells. Vol. 35, *Stem Cells.* 2016.
- Sheriff L, Alanazi A, Ward LSC, Ward C, Munir H, Rayes J, et al. Origin-Specific Adhesive Interactions of Mesenchymal Stem Cells with Platelets Influence Their Behavior After Infusion. *Stem Cells.* 2018;36(7):1062–74.

- Springer TA, Schneppenheim R, Budde U. von Willebrand factor: The complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein. *J Thromb Haemost.* 2011;9(1 S):209–15.
- Srivastava M, Ahlawat N, Srivastava A. Amniotic Fluid Stem Cells: A New Era in Regenerative Medicine. *J Obstet Gynecol India.* 2018;68(1):15–9.
- Stephenne X, Nicastro E, Eeckhoudt S, Hermans C, Nyabi O, Lombard C, et al. Bivalirudin in combination with heparin to control mesenchymal cell procoagulant activity. *PLoS One.* 2012;7(8).
- Suila H, Hirvonen T, Kotovuori A, Ritamo I, Kerkelä E, Anderson H, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells display a novel interaction between P-selectin and galectin-1. *Scand J Immunol.* 2014;80(1):12–21.
- 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.
- 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.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;2(5):70–8.
- Tatsumi K, Ohashi K, Matsubara Y, Kohori A, Ohno T, Kakidachi H, et al. Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;431(2):203–9.
- Teo GSL, Yang Z, Carman C V., Karp JM, Lin CP. Intravital imaging of mesenchymal stem cell trafficking and association with platelets and neutrophils. *Stem Cells.* 2015;33(1):265–77.
- Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science (80-).* 2013;1145(1998):1145–8.
- Toyserkani NM, Jørgensen MG, Tabatabaeifar S, Harken Jensen C, Sheikh SP, Sorensen JA. Concise Review: A Safety Assessment of Adipose-Derived Cell Therapy in Clinical Trials: A Systematic Review of Reported Adverse Events. *Stem Cells Transl Med.* 2017;(6):1786–94.
- Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 2006;27(2):208–19.
- Tsai M-S, Hwang S-M, Tsai Y-L, Cheng F-C, Lee J-L, Chang Y-J. Clonal Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Express Characteristics of Both Mesenchymal and Neural Stem Cells1. *Biol Reprod.* 2006;74(3):545–51.

- Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J Orthop Res.* 2003;21(1):44–53.
- Turner NA, Moake JL. Factor VIII is synthesized in human endothelial cells, packaged in weibel-palade bodies and secreted bound to ULVWF strings. *PLoS One.* 2015;10(10):1–28.
- Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002; 8924:502–8.
- Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet.* 2004;363(9411):783–4.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402–16.
- Walczak P, Zhang J, Gilad AA, Kedziorek DA, Ruiz-Cabello J, Young RG, et al. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke.* 2008;39(5):1569–74.
- Wazen RM, Kuroda S, Nishio C, Sellin K, Brunski JB, Nanci A. *NIH Public Access.* 2014;8(9):1385–95.
- Wei Zhang, Wei Ge, Changhong Li, Shengguo You, Lianming Liao, Qin Han, Weimin Deng and RCHZ. Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells Dev.* 2013;271(November):263–71.
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100(1):157–68.
- Wu PS, Egger B, Brand AH. Asymmetric stem cell division: Lessons from *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(3):283–93.
- Yee A, Gildersleeve RD, Gu S, Kretz C a, Mcgee BM, Carr KM, et al. THROMBOSIS AND HEMOSTASIS A von Willebrand factor fragment containing the D 9 D3 domains is sufficient to stabilize coagulation factor VIII in mice. *Blood.* 2014;124(3):445–52.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (80).* 2007;318(5858):1917–20.
- Zhang B. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Res.* 2010;70(16):6407–11.
- Zhang J, Li L. Stem cell niche: Microenvironment and beyond. *J Biol Chem.* 2008;283(15):9499–503.

Zipori D. The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. *Stem Cells*. 2005;23(6):719–26.

X. ANEXOS

X. ANEXOS

X.1. ANEXO 1. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS:

- Figura 1. Capacidad de diferenciación en los tres linajes: ectodermo, mesodermo y endodermo.
- Figura 2. Esquema de diferenciación de CMM a condrocitos, adipocitos, osteoblastos y miocitos.
- Figura 3. Ilustración del amnios y corion, en un corte transverso de la placenta.
- Figura 4. Esquema de la estructura plaquetaria.
- Figura 5. Esquema de la cascada de activación plaquetaria. Fases de la respuesta plaquetaria (vasoconstricción, adhesión, activación, secreción y agregación).
- Figura 6. Modelo clásico de la coagulación: vía extrínseca, intrínseca y común.
- Figura 7. Modelo molecular y celular de la coagulación.
- Figura 8. Modelo molecular actual de la coagulación con las 3 fases diferenciadas: iniciación, amplificación y propagación.
- Figura 9. Analizador PFA-100.
- Figura 10. Analizador Multiplate.
- Figura 11. Representación de la agregación plaquetaria en sangre entera obtenida por el sistema Multiplate.
- Figura 12. Esquema ilustrativo de un citómetro.
- Figura 13. MSA (Multi Sample Agitator, University of Nottingham).
- Figura 14. Células en cultivo obtenidas del LA, en pase 0, a los 7, 10-12 y 13-15 días tras su siembra.
- Figura 15. Células en cultivo derivadas del LA en pase 3-4.
- Figura 16. Diferenciación adipogénica de las CM derivadas de LA. Tinción de Oil Red O.
- Figura 17. Diferenciación osteogénica de las CM derivadas de LA. Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina.

- Figura 18. Diferenciación osteogénica de las CM derivadas del LA. Tinción con Alzarin Red.
- Figura 19. Diferenciación condrogénica de las CM derivadas del LA.
- Figura 20. Caracterización fenotípica de la población de CM derivadas del LA por citometría de flujo.
- Figura 21. Expresión fenotípica del factor tisular (FT) y Podoplanina de la población de CMM-LA, medida por citometría de flujo.
- Figura 22. Análisis de los resultados de la PCR cualitativa de CMM-LA. Expresión génica del FVIII.
- Figura 23. Análisis de los resultados de la PCR cualitativa de CMM-LA. Expresión génica del vWF.
- Figura 24. Análisis de los resultados de la PCR cualitativa de CMM-LA. Expresión génica del FT.
- Figura 25. Análisis de los resultados de la PCR cualitativa de CMM-LA. Expresión génica de la Podoplanina.
- Figura 26. Análisis de la expresión de FVIII y vWF en CMM-LA mediante inmunofluorescencia.
- Figura 27. Trazo representativo de las curvas de agregación en sangre entera obtenidas en el sistema Multiplate en condiciones basales (ausencia de agonistas) sin células.
- Figura 28. Incremento en la impedancia producido al incubar durante 6 minutos a 37 °C y en agitación sangre anticoagulada con citrato o hirudina sin/con concentraciones crecientes de CMM-LA.
- Figura 29. Trazo representativo de las curvas de agregación en sangre entera obtenidas en el sistema Multiplate en respuesta a TRAP, tanto en ausencia como en presencia de CMM.LA.
- Figura 30. Porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria en respuesta a ADP y TRAP. Multiplate.
- Figura 31. Agregación plaquetaria por citometria de flujo, tras el efecto de las CMM-LA.
- Figura 32. Expresión plaquetaria de P-Selectina por citometría de flujo, tras el efecto de las CMM-LA.

Figura 33. Estrategia de análisis utilizada para el estudio de la respuesta plaquetaria a las CMM-LA.

Figura 34. Incremento de Ca^{2+} intracitoplasmático en las plaquetas aisladas en sangre con CMM-LA (300.000 células/mL), bajo diferentes condiciones experimentales.

Figura 35. Incremento de Ca^{2+} intracitoplasmático en las plaquetas unidas a CMM-LA.

INDICE DE TABLAS:

- Tabla 1. Anticuerpos usados para el estudio fenotípico de las CMM-LA.
- Tabla 2. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio del efecto de dosis crecientes de CMM-LA sobre una muestra de sangre periférica anticoagulada con hirudina.
- Tabla 3. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio de la agregación plaquetaria en presencia de CMM-LA.
- Tabla 4. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio de la agregación plaquetaria en presencia de CMM-LA + Heparina.
- Tabla 5. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio de la activación plaquetaria en presencia de CMM-LA.
- Tabla 6. Esquema de la preparación de los tubos para el estudio de la activación plaquetaria en presencia de CMM-LA+ Heparina.
- Tabla 7. Representación de los diferentes parámetros de coagulación en muestras de sangre, en condiciones basales (sin CMM) y tras incubación 30 minutos a 37°C con diferentes dosis de CMM-LA.
- Tabla 8. Representación del tiempo de obturación (TO) en segundos, en respuesta a colágeno/ADP.
- Tabla 9. Representación del tiempo de obturación (TO) en segundos, en respuesta a colágeno/epinefrina.
- Tabla 10. Medición de la agregación plaquetaria en respuesta a ADP (6,5 μM) en sangre anticoagulada con citrato sódico: efecto de diferentes dosis de CMM-LA.
- Tabla 11. Medición de la agregación plaquetaria en respuesta a ADP (6,5 μM) en

sangre anticoagulada con hirudina: efecto de diferentes dosis de CMM-LA.

Tabla 12. Medición de la agregación plaquetaria es respuesta a TRAP (10 μ M) en sangre anticoagulada con citrato sódico: efecto de diferentes dosis de CMM-LA.

Tabla 13. Medición de la agregación plaquetaria es respuesta a TRAP (10 μ M) en sangre anticoagulada con heparina: tras el efecto de diferentes dosis de CMM-LA.

Tabla 14. Cebadores utilizados para la realización de la PCR cualitativa.

X.2. ANEXO 2:

MATERIAL FUNGIBLE E INVENTARIABLE

X.2.1. Cultivos celulares

Medios de cultivo y soluciones específicas para cultivos celulares:

- ✓ DMEN bajo en glucosa, con L-glutamina y piruvato de sodio. Biowest, Ref. L0060-500.
- ✓ DMSO: solución dimetil sulfóxido >99.9 % de pureza. CryoPur™ CP-10. Biomedical.
- ✓ Medio de cultivo para células del LA, *Amniomed Plus*. Euroclone, Ref. EK AMG 200. Es un medio desarrollado específicamente para el cultivo primario de células de líquido amniótico, estéril, completo, que no requiere adiciones. Contiene L-glutamina, suero bovino fetal, rojo de fenol, bicarbonato de sodio, antibióticos y todos los factores de crecimiento necesarios para un crecimiento celular óptimo.
- ✓ Medios específicos para la diferenciación de CMM-LA. PromoCell.
 - *Diferenciación Adipogénica* (Ref. C-28016), con suplemento (Ref. 39816).
 - *Diferenciación Condrogénica* (Ref. C-28012), con suplemento (Ref. 39812).
 - *Diferenciación Osteogénica* (Ref. C-28013), con suplemento (Ref. 39813).
- ✓ Nucleósidos: EmbryoMax® 100x Nucleósidos para células madre embrionarias. Millipore, Ref. ES-008-D.
- ✓ PBS: tampón fosfato salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline Dulbecco's*) Gibco, Ref. 14190.094.
- ✓ Penicilina/Estreptomicina (P/E). 5000U Penicilina/ml. 5000 U/mL estreptomicina. Lonza, Ref. DE17-603E.
- ✓ SBF: Suero bovino fetal. Gibco, Ref. 10270106.
- ✓ Solución azul tripán (0.4 %). Preparada en 0,81% de cloruro sódico y 0,06% de fosfato potásico dibásico. Sigma Aldrich, Ref. T8154.
- ✓ Tripsina-EDTA. 0,25 %. 2,5 tripsina porcina, 0,2g EDTA· 4Na por litro de solución de Hanks con rojo fenol. Sigma Aldrich, Ref. T4049.

- ✓ Ultraglutamina: Ultraglutamine I 200mM en 0,85 % solución de NaCl. Lonza, Ref. BE17-605E/U1.

Material fungible:

- ✓ Frascos de cultivo celular de 25 y 75 cm². Sarstedt, Ref. 83.3910.006 - 83.3911.002, respectivamente.
- ✓ Placas de cultivo celular de 24 pocillos fondo plano. Poliestireno. CellStar, Ref. 662.160.
- ✓ Pipetas desechables estériles de 5, 10, 25 mL. Falcon®
- ✓ Tamiz celular 40µm. Nylon. Falcon, Ref. 352340.
- ✓ Tamiz celular 100 µm. Nylon. Falcon, Ref. 352360.
- ✓ Tubos cónicos graduados Cellstar® para centrifugación celular de 15 y 50 mL. Polipropileno (PP). Greiner bio-one, Ref. 210 261 y 352096, respectivamente.
- ✓ Tubos hirudina para Multiplate. Ref. 06675751001
- ✓ Tubos de Vacutainer BD de citrato sódico 3,2 %. Ref. 363048

X.2.2. Reactivos

- ✓ Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Sigma-Aldrich, Ref. E0272.
- ✓ ADP (Adenosín Difosfato). Sigma-Aldrich, Ref. 01905.
- ✓ Agarosa. Conda pronadisa, Ref. 45090007.
- ✓ AGGFixA y AGGFixB. Platelet Solutions, Ref. PSR-002A/2B.
- ✓ Agua para biología molecular: libre de DNAsas y RNAsas. Sigma-Aldrich, Ref. W4502.
- ✓ BSA: Albúmina sérica bovina. Sigma-Aldrich, Ref. A9647.
- ✓ Cytifix/Cytoperm. Kit de fijación y permeabilización. BD Bioscience, Ref. 554714.
- ✓ DMSO: solución dimetil sulfóxido >99.9 % de pureza. CryoPur™ CP-10. Biomedical.
- ✓ EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético disódico. Panreac Quimica SA, Ref. 1316691210.
- ✓ Fluo-4 Calcium Assay. Thermo Fisher, Ref F10471.

- ✓ GoTaq Hot Start Polymerase. Promega, Ref. M5006.
- ✓ Metanol. Merck Millipore, Ref. 322415.
- ✓ NBT: SIGMA FAST™ BCIP®/NBT. Sustrato de fosfatasa alcalina. Sigma-Aldrich, Ref. B5655-25TAB.
- ✓ PAMFix. Platelet Solutions, Ref. PSR-001.
- ✓ Qiagen's RNeasy Mini Kit. Ref. 74104.
- ✓ Red Safe. iNtRON Biotechnology, Ref. 21141.
- ✓ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR. BioRad, Ref. 1708841.
- ✓ Solución Alizarin Red. Sigma-Aldrich. Ref. A5533.
- ✓ Solución Azul alcían: 1 % en 3 % de ácido acético pH 2,5. Sigma-Aldrich, Ref. B8438.
- ✓ Solución Oil Red O. Sigma-Aldrich, Ref. O0625-25.
- ✓ Solución May Grünwald-Giemsa. Merck-Millipore, Ref. 1.01424.0500.
- ✓ Solución rojo Alizarín S. Sigma-Aldrich, Ref. A5533-25.
- ✓ Tampón tris/ácido bórico/ácido etilendiaminotetraacético (TBE). BioRad, Ref. 161-0770.
- ✓ TRAP-6. Tocris, Ref. 3497.
- ✓ Tubos de citómetro: tubo de 5 ml de Poliestireno con fondo redondo. Falcon.
- ✓ Tubos eppendorf 2 mL. Polipropileno. Ref. 0030120094

X.2.3. Anticuerpos

Marcadores Mesenquimales:

- ✓ CD90 (mouse anti-human)-FITC. BD Biosciences, Ref. 555595.
- ✓ CD105 (mouse anti-human)-APC. BD Biosciences, Ref. 562408.
- ✓ CD73 (mouse anti-human)-PE. BD Biosciences, Ref. 550257.

Marcadores Hematopoyéticos:

- ✓ CD45 (mouse anti-human)-FITC. BD Biosciences, Ref. 345808.
- ✓ CD34 (mouse anti-human)-APC. Miltenyi Biotec, Ref. 130-190-954.

Marcadores Trombogénicos:

- ✓ FT (mouse anti-human)-FITC. CekiSui Diagnostics, Ref. 4507CJ.

Marcadores Plaquetarios:

- ✓ CD61 (mouse anti-human)-PerCP. BD Biosciences, Ref. 347408.
- ✓ CD62-P (mouse anti-human)-ACP. BD Biosciences, Ref. 560888.

X.2.4. Primers

En la tabla 14, se detalla la secuencia de los cebadores utilizados para la realización de la PCR cualitativa.

Tabla 14. Cebadores utilizados para la realización de la PCR cualitativa

Molécula	Sentido	Secuencia	Tamaño Amplicón (pb)	T^a Annealing (°C)
hTF	Forward	CGACGAGATTGTGAAGGATG	252	55
hTF	Reverse	CGGAGGCTTAGGAAAGTGTTG		
hPodoplanina	Forward	CATCGAGGATCTGCCAACTT	117	58
hPodoplanina	Reverse	TGTGTGTCTCCATCCACTTTC		
hFactor VIII	Forward	CTGACCCACTGTGCCTTACC	313	58
hFactor VIII	Reverse	ACTGATTTCTGTGGCATCC		
h_vWF	Forward	GTCCTCCTCTTACCACTGTTTG	565	58
h_vWF	Reverse	GGTCACACACACACTCATACTC		

X.2.5. Equipos:

- ✓ Agitador magnético: Shaker DOS10l. ELMi Skyline
- ✓ Analizador de electroforesis: G: BOX de Syngene.

- ✓ Balanza de precisión: Precisa XB 320.
- ✓ Balanza: Precisa XB320M Max: 320 gramos, min: 0,02g.
- ✓ Baño termostatzado OVAN.
- ✓ BD FACScalibur System BD Bioscience. Dos láseres, cuatro colores.
- ✓ BD FACSCanto System. BD Bioscience. Dos láseres, seis colores.
- ✓ BIORAD iQ5 real time PCR detection system.
- ✓ Bomba de vacío: Rocker 300.
- ✓ Cabina de flujo laminar seguridad tipo II. TELSTAR BIO-II-A.
- ✓ Cabina de Flujo Laminar tipo II con filtros HEPA.
- ✓ Cabina de PCR: TELSTAR XB Mini-V/PCR.
- ✓ Cámara de microscopio invertido: DS-L3. DS Camera Head. DS-Fi2
- ✓ Centrífuga Heraeus. Multifuge 3 SR+. Thermo Scientific.
- ✓ Centrífuga: Thermo Scientific. FRESCO 21. HERAEUS.
- ✓ Citómetro de flujo Accuri C6™ de 4 colores y 2 láseres. Becton Dickinson®.
- ✓ Cubeta de electroforesis. Elite 300. Wealtec.
- ✓ *Easy-load® Masterflex® Digital Console drive. Modelo: 7518-00.*
- ✓ Esterilizador de material quirúrgico: Steri 250.
- ✓ Estufa de Cultivo 37 °C, 5 % CO₂.
- ✓ *Fast Real Time PCR System 7500*, de Applied Biosystems.
- ✓ Incubador HERA Cell 150 Thermo Scientific.
- ✓ Lector de placas: Infinite 200 Pro. TECAN.
- ✓ Lupa: Nikon SMZ1000. 1X WD70.
- ✓ *Microondas TEKA.*
- ✓ Microscopio confocal SP2 LEICA.
- ✓ Microscopio confocal Sp8 LEICA.
- ✓ Microscopio invertido trilocular AE30/AE31, MOTIC®.
- ✓ Microscopio óptico invertido: Motic A E30.
- ✓ MSA: Multi Sample Agitator. Este agitador, es un termo-bloque de aluminio formado por 12 pocillos internos y otros 17 pocillos externos, diseñado y donado por la Universidad de Nottingham, que permite agitar muestras biológicas de forma homogénea y reproducible.
- ✓ Nanodrop: Nanodrop SimpliNano™ GE Healthcare.
- ✓ Termociclador SensoQuest Labcycler. Thermo Scientific.

X.3. ANEXO 3: CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

X.3.1. Hoja informativa y consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (MEMBRANA AMNIÓTICA, CORDÓN UMBILICAL Y LÍQUIDO AMNIÓTICO) PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN PACIENTES ADULTOS

IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente muestras biológicas (membrana amniótica, cordón umbilical y líquido amniótico) sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa un correcto diagnóstico y tratamiento para usted. La principal vía de obtener dichas muestras es la utilización de las muestras sobrantes de las extracciones que se hacen con fines diagnósticos. Parte de la muestra no es necesaria para el correspondiente estudio y para establecer un diagnóstico y por ello, es normalmente destruida. Dichas muestras biológicas (membrana amniótica, cordón umbilical y líquido amniótico) serán utilizadas en el proyecto de investigación biomédica titulado: “*Síntesis de FVIII por las células estromales mesenquimales de los tejidos extraembrionarios*”, que está siendo realizado por el **Dr. José María Moraleda Jiménez** del **Servicio de Hematología y Hemoterapia** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.

Las regulaciones locales requieren el consentimiento informado antes de que usted done voluntariamente muestras biológicas para que pueda comprender la naturaleza, los beneficios y los riesgos de la donación. Entonces usted puede decidir si dona o no de una manera voluntaria e informada. La firma del formulario de consentimiento indicará que usted ha sido informado y que otorga su consentimiento.

Es importante que lea detenidamente esta hoja de información al paciente, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

OBJETIVO

El avance de la ciencia y de la medicina exige la realización de investigación sobre muestras humanas, ya sea de donantes sanos o de enfermos.

La finalidad de esta donación de muestras biológicas (membrana amniótica, cordón umbilical y líquido amniótico) es el estudio de la capacidad de síntesis del factor VIII de la coagulación por las células mesenquimales de estos tejidos; un factor fundamental para la regulación de la hemostasia en los pacientes hemofílicos. Su estudio permitirá conocer el uso potencial de estas células en el tratamiento de los pacientes con hemofilia A y se realiza con el fin de que los avances obtenidos puedan trasladarse lo antes posible a la práctica clínica.

¿EN QUÉ CONSISTE LA DONACIÓN?

Le solicitamos permiso para la donación con fines científicos de un fragmento de unos 20 cm² de membrana amniótica, del cordón umbilical y de unos 50 ml de líquido amniótico.

En el proceso de donación de muestras biológicas será de aplicación la Ley 14/2007 de 3 Julio de Investigación Biomédica y conforme a la cual, previa a la firma del consentimiento para la utilización de una muestra biológica con fines de investigación biomédica recibirá la información que se detalla en el capítulo III de la ley citada referente a la finalidad, beneficios esperados, posibles inconvenientes, identidad del responsable, derecho de revocación del consentimiento, lugar de realización de los análisis y destino de las muestras, derecho a conocer los datos genéticos, garantías de confidencialidad, conservación de los datos y muestras, acceso a datos y derecho a no ser informado. Para ello se le entrega una hoja de información sobre la donación de muestras biológicas que podrá leer detenidamente así como preguntar las dudas que le surjan previo a la firma del consentimiento específico para dicha donación.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS GENERALES DE LA DONACIÓN?

No se prevé ningún riesgo o molestia adicional para usted ya que únicamente va a autorizar la investigación con muestras biológicas (membrana amniótica, cordón umbilical y líquido amniótico) sobrantes, que de otra forma se desecharían tras el parto. Para la obtención de este material, no se llevará a cabo ninguna prueba o intervención distinta durante el parto.

La donación de membrana amniótica, cordón umbilical y líquido amniótico no tiene efectos secundarios, ni para la madre ni para el niño, ya que se toman de los tejidos y líquidos que se van desechando durante el parto.

BENEFICIOS ESPERADOS

Tal como recoge la Ley de Investigación Biomédica de 3 de Julio de 2007, “La donación y la utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, cualquiera que sea su origen específico, sin que en ningún caso las compensaciones que se prevén en la ley tengan un carácter lucrativo o comercial. La donación implica, así mismo, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras biológicas”. Los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pretenden ayudar al avance médico y a mejorar el conocimiento de las causas por las que se produce la enfermedad.

No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. Sin embargo, si las investigaciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que padecen Hemofilia A grave.

La donación implica, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con las muestras biológicas.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

La titularidad de los resultados de la investigación realizada con las muestras corresponderá a los investigadores responsables.

CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna

explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico/tratamiento y/o seguimiento.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se haya utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de la investigación que ya se haya llevado a cabo con anterioridad.

¿A QUIÉN PUEDO PREGUNTAR EN CASO DE DUDA?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para donación de muestras biológicas (membrana amniótica, cordón umbilical y líquido amniótico).

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto de la donación y sus implicaciones contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. José María Moraleda Jiménez en el teléfono 968 369532.

CONFIDENCIALIDAD

Los investigadores responsables de la investigación se comprometen a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos que participen en el estudio, de conformidad a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

Todas las muestras biológicas y todos los resultados analíticos se enmascararán utilizando etiquetas con un número de código único, por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tienen carácter estrictamente confidencial. Toda la información de investigación biológica obtenida de su muestra de membrana amniótica, cordón umbilical y líquido amniótico será estrictamente confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los del proyecto, accediendo únicamente a la información obtenida los investigadores responsables.

Asimismo, se informa que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE LA DONACIÓN

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio referido. Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted.

A estos efectos, se entenderá que no desea recibir tal información, tanto en relación con su persona como con su familia, salvo que manifieste lo contrario.

En el caso de que el médico responsable considere que usted debe recibir dicha información para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta del comité asistencial si lo hubiera. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades.

Los productos biológicos que se generen en este estudio, se podrán mantener en el Biobanco de la Región de Murcia para ser utilizadas para cualquier otra investigación futura y para ello, se le entrega junto con esta información Hoja de información y autorización específica del Biobanco (Anexo I).

X.3.2. Hoja de información y autorización del Biobanco



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE (v.3)

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

En el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios

Solicitamos su autorización para incorporar al *Biobanc-Mur Nodo Área I* del hospital el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta

¿Qué es un biobanco?: Institución para favorecer la investigación y la salud.

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas.

Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de un comité científico y otro de ética. Las muestras se cederán generalmente sin información personal asociada, aunque a veces podrá ser necesario el acceso a la historia clínica o al resultado de otras pruebas para completar la investigación.

La investigación biomédica es, hoy en día, un fenómeno global por lo que ocasionalmente estas muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación fuera de España, siempre que se cumplan los requisitos de la legislación española y lo aprueben los correspondientes comités.

Muestras biológicas e información asociada: En ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco *Biobanc-Mur Nodo Área I* del *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* hasta su extinción. Este Biobanco forma parte como nodo de la Red Temática de Investigación Cooperativa (RETIC) de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III con la referencia **RD09/0076/00065**, y está en proceso de Registro con el desarrollo de la normativa regional de Biobancos que aplica la normativa nacional.

Este biobanco acoge colecciones organizadas de muestras biológicas e información asociada en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité de Ética de la Investigación (CEI) competente, que velará para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Además, el comité científico del biobanco garantizará que los proyectos sean de excelencia científica.

A partir de las muestras donadas, en los casos en que la investigación lo requiera, se realizarán estudios genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información acerca de su salud y la de sus familiares. Siempre se actuará velando por la protección de esta información (ver apartado de protección de datos y confidencialidad).

Por este consentimiento, los responsables del Biobanco del Hospital podrán consultar su historial clínico, solamente en el caso de que ello sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización por parte del Comité de Ética correspondiente.

En caso de ser necesaria alguna muestra adicional, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración. En este caso se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

Protección de datos y confidencialidad: Las muestras se conservarán codificadas.

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que soliciten muestras al biobanco no podrán conocer ningún dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizados, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos.

*Responsable del fichero : Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.
 Dirección Postal: Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia*

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia
 Responsable del nodo Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia
 Tel.: 968359757 E-mail: juanp.serna@carm.es

Carácter altruista de la donación. La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca es gratuita.

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Participación voluntaria. Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

Revocación del consentimiento: si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Director del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

Información sobre los resultados de la investigación: se le proporcionará información si usted desea recibirla

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.

Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínicamente o genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de este documento.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede comentar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área I*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

Confirmo que:

1. Autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanc-Mur Nodo Área I*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....

DONANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a..... de..... de.....



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos - ISCHII. Versión julio 2012



CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... <div style="text-align: center; color: #ccc; font-size: small;">Etiqueta Identificativa Paciente</div> Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
---	--

Nombre y apellidos del testigo que firma..... DNI.....
 Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante confirma que el donante:

1. Autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanc-Mur Nodo Área I*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.
 SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TESTIGO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a.... de..... de.....





CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del tutor legal que firma..... DNI.....
 Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área I*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

El abajo firmante confirma que:

1. Se me ha informado que, llegada la mayoría de edad de mi representado, este tendrá derecho a revocar o modificar este consentimiento, para lo cual deberá estar debidamente informado. En caso de que no ejerza dicho derecho, se considerará que el actual documento de consentimiento informado sigue vigente.

SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TUTOR	ASENTIMIENTO DEL MENOR CAPACITADO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma	Firma





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



En....., a..... de..... de.....

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

POR EL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI anulo el consentimiento prestado en fecha..... de..... de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área I**, que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En..... a..... de..... de 20.....

POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI, Como representante legal de D/Dña..... con DNI....., anulo el consentimiento prestado en fecha..... de..... de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área I**, que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En..... a..... de..... de 20.....



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión julio 2012

X.4. INFORME DEL COMITÉ DE BIOÉTICA



Arrixaca
Hospital Universitario
"Virgen de la Arrixaca"
 Ctra. Madrid - Cartagena • Telf. 968 36 95 00
 30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
 Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 17/02/2014, acta 02/2014 ha evaluado la propuesta del investigador **Dr. José M^a Moraleda Jiménez** referida al estudio:

Título: Síntesis de FVIII por las células estromales mesenquimales (MSCs) de los tejidos extraembrionarios

1º. Considera que

- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE** y acepta que sea realizado por el **Dr. José M^a Moraleda Jiménez** como investigador principal en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

Lo que firmo en Murcia, a 17 de febrero de 2014

Fdo:



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
 Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

X.5. APORTACIONES A JORNADAS Y CONGRESOS

- ✓ Propiedad de síntesis de FVIII y FvW por las células madre mesenquimales procedentes del líquido amniótico (A.Soriano-Filiu, A.I. García-Guillén, M. Fernández-Arrausi, E. García-Navarro, J.E. Millán-Rivero, D. Sánchez-Salinas, J.M. Moraleda, M.P. Quesada-Rico, N. Marín-Atucha).

Tipo de participación: comunicación oral.

Jornada: II Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia. Murcia 2016.

- ✓ Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells (AF-MSCs) decrease agonists platelet reponse (M. Fernández-Arrausi, D. Iyu, E.G. Navarro, J.J. Cerezo-Manchado, M. Rodriguez-Valiente, A.I. García-Guillén, J.M. Moraleda, F.Garcia-Candel, N.M. Atucha).

Tipo de participación: poster.

Congreso: XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 63rd Annual Scientific and Standarization Committee (SSC) Meeting. Berlin 2017.