

ASPECTOS TÉCNICOS DE LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA PARA USO CLÍNICO EN EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Sánchez R, Panadero N, Gutiérrez Y, Sánchez-Mora D, Martín T, Rico MA, Bautista G, Ruiz E, García-Marco JA, Sanjuán I, Gil S, Forés R, Krsnik I, Ojeda E, Cabrera R y Fernández MN.

Servicio de Hematología y Hemoterapia Hospital Universitario Puerta de Hierro, UAM. Ayudas P.I. AlloStem, Fundación Gabrielle Rich y FIS 03/0961 y 04/2794

Introducción: Las células estromales multipotenciales o células mesenquimales (MSC) se encuentran en diferentes tejidos humanos como médula ósea (MO), tejido adiposo y sangre de cordón umbilical. Tienen la capacidad de multiplicarse *in vitro* como células adherentes. Las de estas fuentes pueden obtenerse con facilidad sin problemas éticos y tienen gran potencial de expansión. En los últimos años se han realizado numerosos estudios referentes a sus características biológicas así como a su potencialidad en terapia celular y medicina reparativa mediante estudios pre-clínicos y clínicos.

Resultados: Presentamos los resultados que hemos obtenido en su generación en condiciones "GMP", a partir de aspirados de MO de 12 donantes adultos, para su uso como células auxiliares en Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos (TPH). La mediana de edad de los donantes fue de 32 años (16-53). Se obtuvieron entre 59-y 80 mL de MO por procedimiento estándar de aspiración de cresta ilíaca posterior. Los aspirados se trasladaron en bolsa cerrada al laboratorio de cultivos (área GMP clase 100) donde se procedió a la selección de células mononucleadas (CMN) en gradiente de Ficoll y a la siembra en frascos de 175 cm² para su cultivo *ex vivo*, siguiendo el protocolo consensuado en el Grupo de Trabajo de MSC del EBMT, hasta conseguir una cantidad adecuada de MSC en tiempo máximo de cultivo de 5 semanas y máximo de 2 pases. Se consiguió crecimiento satisfactorio en 11/12 casos (un cultivo resultó contaminado por hongos). La mediana de CMN obtenidas fue de 440 x10⁶ (270-640), de las que se sembró una mediana 14 (8-22) frascos. La duración mediana de los cultivos fue de 30 días (16-38), obteniéndose una mediana de 271x10⁶ (80-431) MSC, suficientes para 1-5 dosis de 10⁶/kg por paciente. Las MSC fueron criopreservadas siguiendo los protocolos estandarizados para células progenitoras hematopoyéticas. La mediana de recuperación celular post-descongelación ha sido de 100% (80-136) y la viabilidad (Azul Tripán) del 99-100 % en todos los casos. Durante el proceso se han realizado, en productos intermedios y finales, como controles de calidad, cultivos microbiológicos para detección aerobios, anaerobios y hongos y PCR para detección de micoplasma y se han conservado alícuotas para eventuales controles de EBV, CMV y HSV-1. La caracterización fenotípica de las MSC por citometría de flujo se realizó mediante evaluación de la expresión de los marcadores CD73, CD90, CD105, CD166 y HLA clase I y la ausencia de expresión de CD31, CD80, HLA clase II y de los marcadores hematopoyéticos CD14, CD34, CD45. En todos los lotes las MSC resultantes presentaron estas características. Las MSC así obtenidas están siendo objeto de uso en estudios como células auxiliares de TPH con intención preventiva de EICH y/o para su tratamiento en caso de refractariedad a esteroides. Los costos directos de cada caso son del orden de 2500-3000 €.