

CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE EL AYUNTAMIENTO DE SALAMANCA Y LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA PARA LA EJECUCIÓN DE UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SOBRE CÉLULAS MESENQUIMALES EN EL PACIENTE TRAUMATIZADO

En la ciudad de Salamanca y en su Casa Consistorial, el día 27 de marzo de 2019

REUNIDOS

De una parte: El Ayuntamiento de Salamanca y en su nombre y representación, el Ilmo. Sr. **D. CARLOS MANUEL GARCIA CARBAYO**, Alcalde-Presidente del Excmo. Ayuntamiento de Salamanca, cuyas circunstancias personales no se consignan en razón del cargo que ejerce.

De otra parte: La Universidad de Salamanca, (en adelante USAL), con CIF Q3718001E, y domicilio en Patio de Escuelas, 1, 37008 Salamanca y en su nombre y representación la Sra. **Vicerrectora de Investigación y Transferencia de la citada Universidad, Dña. MARIA SUSANA PEREZ SANTOS**, con D.N.I. nº 07956224-H y con poderes suficientes para la firma de este acuerdo en virtud de la Resolución de 27 de diciembre de 2017, del Rectorado de la Universidad de Salamanca, por la que se publica la delegación de competencias del Rector en diversos órganos de gobierno unipersonales de esta Universidad (BOCyL núm. 3, de 4 de enero de 2018), poderes que no le han sido derogados ni modificados,

Las dos partes se reconocen capacidad legal suficiente para la celebración de este acto y

EXPONEN

PRIMERO: Que la Universidad de Salamanca (USAL) tiene como uno de los objetivos esenciales de su actividad, contribuir a la ampliación del conocimiento, mediante el fomento y la coordinación de la investigación y la formación de investigadores.

SEGUNDO: Que el Excmo. Ayuntamiento de Salamanca y la Universidad de Salamanca vienen colaborando en materia de investigación y formación en un marco de colaboración ya consolidado de cooperación recíproca. Asimismo, la participación del Ayuntamiento en el Plan Estratégico General de la Universidad de Salamanca y en el Campus Europeo de Ciudades Universitarias promueve el fortalecimiento de los lazos entre este Ayuntamiento y la Universidad de

Salamanca en el objetivo común de atracción y retención de talento y de apuesta por la investigación vinculada al ámbito local.

TERCERO: Que con motivo del VIII Centenario de la Universidad de Salamanca, ambas instituciones pretender continuar con el impulso a sus relaciones de colaboración y formación recíproca otorgándole a esa colaboración un carácter institucional, por lo que ambas partes acuerdan suscribir el presente Convenio de Colaboración sujeto a las siguientes:

ESTIPULACIONES

PRIMERA: Objeto

El objeto de este convenio es establecer el marco de colaboración entre las partes para la ejecución, por parte de la Universidad de Salamanca, de un proyecto de investigación sobre **CÉLULAS MENSENQUIMALES EN EL PACIENTE TRAUMATIZADO**, cuya descripción figura en el Anexo al presente Convenio, vinculando su desarrollo al ámbito local, con el objetivo de retener talento investigador.

SEGUNDA: CRÉDITO PRESUPUESTARIO

Existe consignación presupuestaria y crédito adecuado y suficiente para financiar los gastos objeto del presente convenio en la aplicación presupuestaria 31120,48900 "Salud Pública. Otras transferencias" por importe de 24.000 €, documento contable RC número 1009; y en la aplicación presupuestaria 31120,22699 "Salud Pública. Otros gastos diversos" por importe de 2.880 €, documento contable RC número 1054.

TERCERA: COMPROMISOS DE LAS PARTES

El Excmo. Ayuntamiento de Salamanca se compromete a abonar la cantidad de 26.880,00 €. La distribución de la citada cantidad se concreta en los conceptos siguientes:

- Retribución de personal investigador en el programa.....	21.120,00 €
- Material fungible para el proyecto (no inventariable).....	2.880,00 €
TOTAL	24.000,00 €

Por otra parte se abonará, en concepto de gasto corriente, la cantidad de 2.880,00 € tras la presentación de la correspondiente factura correspondiente al 12% de "Costes generales de la Universidad".

La Universidad de Salamanca se compromete durante el año 2019 a llevar a cabo una investigación sobre **CÉLULAS MENSENQUIMALES EN EL PACIENTE TRAUMATIZADO** y a facilitar los recursos humanos y técnicos necesarios para su desarrollo.

CUARTA. Forma de Pago:

El pago se realizará en un único plazo por el 100% del importe a la firma del presente Convenio, y siempre teniendo en cuenta el plan de disposición de fondos de la Tesorería Municipal.

El pago correspondiente a "Costes Generales de la Universidad", por importe de 2.880,00 euros se realizará previa presentación de la correspondiente factura por parte de la Universidad de Salamanca.

Se dispensa a la Universidad de Salamanca de prestar garantías por los anticipos fijados, por su carácter de entidad no lucrativa que desarrolla programas de acción social.

QUINTA. Justificación.

La justificación de la subvención por importe de 24.000,00 €, se realizará hasta 1 de febrero del ejercicio siguiente al de la aprobación de la misma, mediante la presentación de la siguiente documentación, debiendo ejecutarse los gastos, en todo caso, en la anualidad presupuestaria correspondiente a la ejecución del proyecto de investigación:

La Universidad de Salamanca deberá justificar al Ayuntamiento de Salamanca la aplicación de la cantidad total concedida mediante certificación acreditativa de haber contraído e ingresado en contabilidad el importe de la subvención y el certificado de obligaciones reconocidas por el importe de la cantidad aplicada a los presupuestos del año 2019, se aceptarán los justificantes fechados hasta el 31-12-2019. Dicha certificación se expedirá por el responsable del control interno de la actividad económica-financiera de la Entidad.

En la relación de obligaciones reconocidas deberá figurar la fecha y número de cada uno de los justificantes, así como el C.I.F. o N.I.F. de los acreedores, concepto e importe; si se trata de pago a personal contratado si el importe es bruto o neto, cuota de la Seguridad Social relativa a la empresa, y fecha de emisión.

Así mismo, se presentará memoria detallada de las actividades realizadas y un ejemplar de toda la documentación impresa generada por la actividad.

La entidad deberá reintegrar la parte de la ayuda económica no invertida con carácter previo a la entrega de la justificación de la misma. El reintegro



deberá hacerse en la cuenta número (IBAN) ES06 2103 1000 4000 3000 0499 de UNICAJA BANCO, y con el documento acreditativo del ingreso deberá formalizar la carta de pago correspondiente en la Tesorería Municipal que, posteriormente adjuntará al resto de documentación justificativa.

SEXTA. COMISIÓN DE SEGUIMIENTO

Para la adecuada evaluación y seguimiento de este Convenio se crea una Comisión que estará formada por dos miembros designados por la Universidad de Salamanca y dos miembros por parte del Ayuntamiento de Salamanca.

La Comisión se reunirá de forma ordinaria dos veces durante la vigencia anual del Convenio, y de forma extraordinaria siempre que lo soliciten la mitad de sus miembros.

La Comisión, aparte de otras funciones que se le puedan asignar, tendrá encomendadas las siguientes:

- a) Renovación y revisión del Convenio
- b) Establecer los indicadores y mecanismos de evaluación del programa.
- c) Toma de decisiones acerca de las investigaciones a financiar
- d) Resolver cuantas discrepancias se produzcan en la ejecución e interpretación del contenido del Convenio.

Por parte de la Universidad de Salamanca será miembro nato de esta comisión el/la Vicerrector/a de Investigación y Transferencia.

SÉPTIMA. Relaciones laborales.

La Universidad de Salamanca mantendrá la titularidad de las relaciones laborales del personal necesario para el desarrollo de las actividades objeto del presente convenio, quedando el Ayuntamiento de Salamanca exento de cualquier relación laboral con dichas personas.

OCTAVA.- Memoria de Actividades.

La Universidad de Salamanca estará obligada a presentar al Ayuntamiento de Salamanca, con la justificación de la subvención, una memoria anual donde se recojan pormenorizadamente las diferentes actividades realizadas en el desarrollo del mismo (actividades realizadas y resultados obtenidos).

Así mismo se compromete a remitir cuanta información le sea requerida por el Ayuntamiento de Salamanca sobre los programas y actividades a las que se refiere este Convenio de Colaboración.

NOVENA. Vigencia.

El presente Convenio de Colaboración tendrá vigencia desde el 1 de enero hasta el 31 de diciembre del año 2019 pudiendo renovarse por otro año más, siempre y cuando no medie denuncia expresa de alguna de las entidades firmantes formulada con una antelación de al menos un mes antes de la finalización del presente ejercicio, y supeditado en todo caso a la existencia de crédito suficiente y adecuado que para cada ejercicio se consigne en los respectivos presupuestos.

DÉCIMA. Compatibilidad

La aportación concedida en virtud del presente Convenio será compatible con otras ayudas, subvenciones o convenios para la misma finalidad otorgadas por cualesquiera Administraciones Públicas o Entidades Públicas o Privadas, pero en ningún caso será de cuantía tal que, aisladamente o en concurrencia con éstas, superen el coste total de las actividades.

UNDÉCIMA.- PUBLICIDAD E IMAGEN CORPORATIVA.

Cada una de las partes firmantes se obliga a incluir el nombre, las marcas y los logos de ambas Instituciones, tanto en la difusión del presente convenio como en la difusión y ejecución de las concretas actuaciones derivadas de su desarrollo, ya se realicen dichas actuaciones directamente por las Instituciones firmantes o por terceros colaboradores. Específicamente la USAL se obliga a mencionar al Ayuntamiento de Salamanca como entidad financiadora de las investigaciones cuyos resultados se publiquen en revistas o congresos científicos.

Cada parte firmante tendrá derecho a designar a los representantes que considere más idóneos para participar en las ruedas de prensa u otros actos que se realicen con ocasión de la divulgación y promoción de las actividades incluidas en el presente Convenio.

DUODÉCIMA. REGULACIÓN JURÍDICA

En lo no previsto en este Convenio, el mismo se regirá e interpretará en todos sus aspectos por el Derecho Administrativo español, y en particular por:

- Ley Reguladora de las Bases de Régimen local, Texto Refundido de las disposiciones legales vigentes en materia de régimen local y sus reglamentos.
- Texto refundido de la ley reguladora de las Haciendas Locales
- Ley 38/2003, de 17 de noviembre, General de Subvenciones y su Reglamento aprobado por Real Decreto 887/2006.



**Ayuntamiento
de Salamanca**



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



DECIMOTERCERA. Extinción.

Será causa de extinción del presente Convenio cualquier incumplimiento de las obligaciones asumidas por cada una de las partes firmantes.

Y, en prueba de conformidad firman el presente convenio en el lugar y fecha antes señalados,

Fdo.- Carlos Manuel García Carbayo



Fdo.- M^a Susana Pérez Santos

ANEXO: Descripción del Proyecto de Investigación

TÍTULO DEL PROYECTO:

CÉLULAS MESENQUIMALES EN EL PACIENTE TRAUMATIZADO. ESTUDIO COMPARATIVO.

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO

RESUMEN DEL PROYECTO

Introducción

Las "células madre mesenquimales" (MSC), han demostrado una importante actividad inmunomoduladora. Por otro lado, sabemos que la evolución de los pacientes que sufren un trauma severo se puede ver condicionada por la aparición del "Síndrome de respuesta inflamatoria inadecuada" que puede conllevar el desarrollo de diversas complicaciones como la sepsis o el fallo multiorgánico. El presente proyecto trata de explorar la posible implicación de las poblaciones celulares de MSC en el desarrollo de ese síndrome.

Hipótesis

Si las MSC de los pacientes ingresados por un trauma severo presentan características diferentes a las MSC de los pacientes ingresados para cirugía programada.

Objetivos

Analizar las MSC de los dos grupos y compararlas.

Material y Métodos

Para ello se pretende analizar las MSC de 10 pacientes, mayores de edad, hombres y mujeres, que ingresen por un traumatismo grave (ISS>16) y otros 10 que ingresan de forma programada. Se analizará la evolución clínica y marcadores inflamatorios (IL1, PCR)

Se extraerá un aspirado de la médula ósea del iliaco de entre 5cc a 7cc que se remitirá al laboratorio de Terapia Celular para su análisis de proliferación y ciclo celular, caracterización fenotípica, capacidad de diferenciación.



El análisis de los datos obtenidos puede suponer una herramienta para la valoración y el pronóstico de los pacientes.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Los pacientes que sufren un trauma grave pueden desarrollar lo que conocemos como Síndrome de respuesta Inflamatoria Sistémica Inadecuada y el denominado Síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora que sitúa a los pacientes en un estado de inmunodefensión que con frecuencia termina en un cuadro séptico que en estos pacientes puede ser muy grave y comprometer su vida.

Las células estromales mesenquimales, que abreviaremos como MSC por su acrónimo en inglés (de "mesenchymal stromal cells") son células madre que se describieron inicialmente en la médula ósea², donde se encuentran en una proporción muy baja dentro de las células mononucleadas (entre 0.1 y 0.01%)³. Posteriormente, se han identificado MSC prácticamente en todos los tejidos de origen mesenquimal. De hecho, se están empleando en ensayos clínicos (además de las procedentes de médula ósea) las obtenidas de tejido adiposo, gelatina de Wharton del cordón umbilical, placenta, líquido sinovial o pulpa dentaria, entre otros⁴.

Los criterios definitorios mínimos de las MSC fueron establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) en 2006⁵ y se basan en la capacidad de estas células de adherirse al plástico (lo que facilita su expansión en cultivo), en la expresión de determinadas moléculas de superficie (CD73, CD90, CD105) junto a la negatividad para moléculas de clase 2 del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-DR) y de antígenos hematopoyéticos (CD45, CD34, CD19 y CD14), y la demostración de su capacidad de diferenciación multilineal in vitro hacia células de estirpe osteocítica, adipocítica o condrocítica tras cultivo con medios específicos de diferenciación.

Como se ha mencionado, el interés terapéutico de las MSC excede el campo de la regeneración osteoarticular por las propiedades adicionales que estas células han mostrado no solo in vitro sino también en modelos pre-clínicos y en ensayos clínicos. Estas propiedades se resumen en la capacidad de secreción de citocinas y proteínas tróficas, factores anti-inflamatorios y antiapoptóticos (p. ej. SDF-1, HGF, VEGF, IGF-1, TSG-6, IL1RA, etc.) y de forma muy relevante factores con una notable capacidad inmunomoduladora (p. ej.IDO, TGF-beta1, LIF, CCL2, etc.)⁶⁻⁸. En este sentido, las MSC son capaces de inhibir a la mayor parte de las células clave en la respuesta inmune/inflamatoria. Así, las MSC inhiben la activación y la proliferación de las células T, suprimen la diferenciación de las células Th17, inhiben la proliferación de linfocitos B, la activación de células NK, la activación de los macrófagos y la maduración de células dendríticas. Las MSC reducen la infiltración neutrofílica en los tejidos. Además, favorecen la expansión de células T reguladoras, que aumentan esta acción inmunomoduladora⁹.

Una cuestión muy relevante para la aplicación de las MSC como agente anti-inflamatorio e inmunomodulador es el hecho que estas células son mucho más eficaces cuando se administran en un modelo preclínico de enfermedad inflamatoria/inmune establecida en comparación con su administración preventiva si el proceso inflamatorio aún no se ha desarrollado aún¹⁰. Este hecho plantea la pregunta científica de si las MSC pre-activadas con citocinas pro-inflamatorias (p. ej. IFN- α y TNF- α) serían más eficaces que las administradas basalmente. Sobre este hecho no hay información suficiente pero algunos trabajos publicados orientan en este sentido ^{11, 12}.

Las posibles implicaciones de las MSCs en el politrauma o en pacientes lesionados han sido ya señaladas en trabajo previos^{18,19,20,21,22,23}. En conjunto se ha demostrado la existencia de una movilización de esas poblaciones celulares que además de su posible papel como "reparadoras tisulares" ejercerían un importante papel en la respuesta inflamatoria. Además de los señalados se dispone de información sobre alguno de los mecanismos implicados en esas acciones celulares en el paciente con trauma^{24,25}.

De esta manera podemos establecer una posible vía de explicación y quizás de aplicación terapéutica de los casos de pacientes con trauma grave y en cuya evolución se desarrolle un síndrome de respuesta inflamatoria inadecuada. En nuestro país el grupo del Hospital General Gregorio Marañón y el antes mencionado del Hospital del Niño Jesús has abordado en parte esta perspectiva. Ortiz Espada y col²⁶ analizaron en un grupo de pacientes con politraumatismos los niveles de citocinas y otros factores. Nosotros mismos analizamos y caracterizamos las poblaciones celulares de pacientes con fractura de cadera y objetivamos su estado proliferativo, así como algunos aspectos de su actividad.

De una manera general podemos plantear que el presente proyecto trata de aclarar la posible relación puesta de manifiesto en los trabajos anteriores mediante un estudio comparativo con pacientes que ingresan en el ambiente hospitalario, pero sin el traumatismo. La finalidad del proyecto es la de tratar de establecer una relación entre la caracterización de las poblaciones celulares de MSC de pacientes con traumatismo grave y la evolución clínica de esos pacientes. Comparando a su vez con los datos de las poblaciones celulares de MSC de pacientes sin trauma. Secundariamente podremos establecer diferencias en el estado y caracterización fenotípica y funcional de las MSC de los dos grupos de pacientes. De esta manera y de una manera preliminar se podrían sentar las bases para establecer un estudio de valoración del empleo de las MSC para el tratamiento de pacientes con trauma grave. Conocemos algunos trabajos que se han orientado en esta línea como alguno de nuestro propio grupo que demuestra la utilidad de las MSC en la enfermedad del injerto contra el huésped u algún otro en casos de lesión pulmonar.

REFERENCIAS INCLUIDAS EN EL APARTADO ANTERIOR



1. Jackson WM, Lozito TP, Djouad F, Kuhn NZ, Nesti LJ, Tuan RS. Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue. *Journal of cellular and molecular medicine* 2011; 15(11): 2377-88.
2. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6(2): 230-47.
3. Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem cell research & therapy* 2012; 3(2): 9.
4. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem cell research & therapy* 2014; 5(2): 53.
5. 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; 8(4): 315-7.
6. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell death and differentiation* 2014; 21(2): 216-25.
7. Tabera S, Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Sanchez-Abarca LI, Blanco B, Lopez A et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* 2008; 93(9): 1301-9.
8. B Blanco MH-S, C Rodríguez-Serrano, ML García-Martínez, JF Blanco, S Muntión, M García-Arranz, F Sánchez-Guijo, MC Cañizo. Immunomodulatory effects of bone marrow versus adipose tissue derived mesenchymal stromal cells on NK cells: implications in the transplantation setting. *European Journal of Haematology* 2016.
9. Hao L, Sun H, Wang J, Wang T, Wang M, Zou Z. Mesenchymal stromal cells for cell therapy: besides supporting hematopoiesis. *International journal of hematology* 2012; 95(1): 34-46.
10. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in immunology* 2012; 33(3): 136-43.
11. Duijvestein M, Wildenberg ME, Welling MM, Hennink S, Molendijk I, van Zuylen VL et al. Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells* 2011; 29(10): 1549-58.
12. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European journal of immunology* 2008; 38(6): 1745-55.
13. Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PloS one* 2010; 5(7): e11803.
14. Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Communicative & integrative biology* 2010; 3(5): 478-81.
15. Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood* 2012; 119(3): 646-8.
16. Zomer A, Vendrig T, Hopmans ES, van Eijndhoven M, Middeldorp JM, Pegtel DM. Exosomes: Fit to deliver small RNA. *Communicative & integrative biology* 2010; 3(5): 447-50.
17. Fierabracci A, Del Fattore A, Luciano R, Muraca M, Teti A. Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: the role of microvesicles. *Cell transplantation* 2015; 24(2): 133-49.

18. Seebach C, D. Henrich, R. Tewksbury, K. Wilhelm, I. Marzi . Number and Proliferative Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells Are Modulated Positively in Multiple Trauma Patients and Negatively in Atrophic Nonunions. *Calcif Tissue* 2007; 80:294-300.
19. Guntra Krumina, Dmitry Babarykin, MD, PhD, Zaiga Krumina, MD, Irina Paegle, MD, Oleg Suhorukov, MD, Dmitry Vanags, Galina Makarenkova, Sergey Nikulshin, MD, PhD, and Inese Folkmane. Effects of systemically transplanted allogeneic bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells on rats' recovery after experimental polytrauma. *J Traum Acute Care Surg*, 2012, 74:785-791.
20. Nina-Emily Hengartner, Jörg Fiedler, Hubert Schrezenmeier, Markus Huber-Lang, Rolf E. Brenner. Crucial Role of IL1beta and C3a in the In Vitro-Response of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Inflammatory Mediators of Polytrauma. *Plos One* 2015.
21. Ramírez M, Lucia A, Gómez-Gallego F, Esteve-Lanao J, Pérez-Martínez A, et al. (2006) Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury. *Br J Sports Med* 40: 719–722. doi:10.1136/bjism.2006.028639 PMID: 16807304.
22. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Herault O, Bonnet P, et al. (2006) Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 24: 2202–2208. doi: 10.1634/stemcells.2006-0164 PMID: 16778152
23. Alm JJ, Koivu HMA, Heino TJ, Hentunen TA, Laitinen S, et al. (2010) Circulating plastic adherent mesenchymal stem cells in aged hip fracture patients. *J Orthop Res* 28: 1634–1642. doi: 10.1002/jor.21167 PMID: 20540091
24. Li D, Wang C et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit Lipopolysaccharide- Induced Inflammatory Reactions in Macrophages and Endothelial Cells. *Mediators Inflamm*. 2016: 2631439.
25. Gore AV, Bible LE, Song K et al. Mesenchymal stem cells increase T-regulatory cells and improve healing following trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015; 79:48-52.
26. Ortiz Espada A, Chana Rodríguez F, Tisner Madrid M L, Vaquero Martín J, Guisasola Zulueta M C. Estudio de citoquinas y proteínas de choque térmico en pacientes polifracturados. *Traum* 2009, 20: 201-210.
27. Sánchez-Gujo F, Caballero-Velázquez T et al. Sequential Third-Party Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014, 20:1580-85.
28. Guoping Zheng, Lanfang Huang, Haijiang Tong, Qiang Shu, Yaoqin Hu, Menghua Ge, Keqin Deng, Liuya Zhang, Bin Zou, Baoli Cheng and Jianguo Xu. Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a randomized, placebo-controlled pilot study. *Respiratory Research* 2014, 15:39

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo general: comparar las características fenotípicas y funcionales de las MSC de los pacientes ingresados por un trauma grave con los ingresados para una cirugía programada.



Objetivo: describir las características de las poblaciones de MSC de pacientes con trauma grave, en cuanto a:

- Capacidad de Proliferación
- Caracterización inmunofenotípica
- Ciclo celular
- Capacidad inmunomoduladora

Objetivo: Correlacionar las características funcionales de las MSC con la evolución o situación clínica de los pacientes con trauma grave.

PACIENTES/MATERIALES/MÉTODOS

Se trata de un estudio comparativo prospectivo entre dos grupos de pacientes elegidos en función de los criterios más adelante señalados y de su deseo de participar en el estudio.

1) Se incluirán en este estudio 10 pacientes que ingresen por un trauma grave (ISS>16, Injury Severity score) y a 10 pacientes que vayan a ser sometidos a tratamiento quirúrgico por coxartrosis mediante prótesis total de cadera, todos ellos con el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca. En ambos casos se establecen los siguientes criterios de inclusión:

- Edad entre 18 y 75 años.
- Ausencia de enfermedad tumoral, proceso hematológico o patología inflamatoria o autoinmune.
- Ausencia de enfermedades infecto-contagiosas (VIH, VHC, VHB)

2) Se registrarán los datos habituales de la historia clínica en ambos grupos, así como los registros de los indicadores clínicos habituales.

3) Obtención de las muestras de aspirado en cresta ilíaca

El aspirado de cresta iliaca procederá de pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos se procederá durante las primeras 24 horas de su ingreso a la punción del iliaco con una aguja InterV® de 15gx4in, obteniéndose una muestra de 5 a 10 ml de contenido medular que se depositará en un tubo estéril con heparina sin aditivos. Las muestras se enviarán en un contenedor al laboratorio de Terapia Celular, para comenzar el aislamiento y expansión de las MSC a partir de ambas fuentes celulares.

4) AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE LAS MSC

4-a) A partir del aspirado en cresta ilíaca:

Las células mononucleadas se diluirán en Hanks y se separarán en gradiente de densidad (Ficoll), con posterior contaje en la cámara de Neubauer.

Las células serán plantadas en placas de cultivo a una densidad inicial de 106 células/cm², en atmósfera con 5% CO₂ y ambiente hipóxico (5% O₂), dado que dicho ambiente mejora su crecimiento. El medio de cultivo en el que se plantarán

en cultivo consistirá en DMEM con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina-estreptomicina. Cada 3-4 días dicho medio será recambiado (con lo que se eliminarán también las células hematopoyéticas no adherentes), y cuando la confluencia de la placa de cultivo supere el 80%, las células adherentes serán separadas mediante tripsinización, y posteriormente re-plantadas en nuevas placas de cultivo a una concentración determinada. Este proceso de recolección y siembra se denomina "pase" del cultivo, y las CSM se expandirán hasta el 3º pase, siendo posteriormente analizadas de la siguiente forma, de acuerdo con los objetivos del proyecto.

5) EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA CELULAR:

Se analizará el número total de MSC obtenidas a partir de la cabeza femoral y del aspirado de cresta ilíaca mediante conteo con cámara de Neubauer, con respecto a las células mononucleares totales obtenidas tras la separación en gradiente de densidad a partir de ambas fuentes celulares, teniendo en cuenta que se utilizarán 750.000 células mononucleadas para la cuantificación de CFU-F (ver a continuación).

6) ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN UNIDADES FORMADORAS DE FIBROBLASTOS (CFU-F):

Tras el aislamiento de las células mononucleadas mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll), se plantarán 750.000 células en una placa de cultivo de 25 cm² con 5 mL de medio de cultivo consistente en IMDM con 12.5% de FBS, en ambiente con 5% de CO₂ recambiando el medio cada 4-5 días. Tras 14 días en cultivo, se retirará el medio y tras lavar con PBS, se fija la placa con metanol puro durante 5 minutos, tras los cuales se decanta el metanol y se espera a que se evapore. Después se teñirá con May-Grünwald durante 10 minutos, con lavado con agua destilada, y posteriormente con Giemsa durante 3 minutos, procediéndose a contar el número de colonias CFU-F.

7) ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN y CICLO CELULAR:

El estudio de proliferación se realizará con el cálculo del "Population Doubling" y el "Cumulative Population Doubling", conociendo el número de células plantadas y recogidas en cada uno de los pases de cultivo, hasta el pase 6. Para este apartado será importante establecer unas condiciones de cultivo constantes para cada muestra a analizar, como es el tiempo de cultivo hasta el siguiente pase (7 días) o la densidad celular plantada.

Se analizará el ciclo celular mediante la determinación del contenido en DNA celular de una población de MSC en pase 3. Este análisis se realizará por medio del kit MUSE Cell Cycle Reagent (Sigma-Aldrich) en el MUSE Cell Analyser (Sigma-Aldrich). Con ello se determinará el porcentaje de células en fase G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo celular.

8) ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO:

Para analizar comparativamente las características inmunofenotípicas de las MSC de ambas fuentes celulares, se emplearán las siguientes combinaciones



cuádruples de anticuerpos monoclonales, siguiendo las recomendaciones de la International Society for Cellular Therapy (Cytotherapy 2006; 4. 315-317):

- CD90-FITC/CD73-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD34-APC
- CD105-FITC/CD166-PE/HLA-DR PerCP/CD19-APC
- CD14-FITC/CD106-PE/CD45-PerCP-Cy5.5

Se emplearán un mínimo de 1×10^5 células por cada uno de los 3 tubos anteriores. Tras 20 minutos de incubación con los anticuerpos monoclonales y posterior lavado, las muestras serán adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson-BD) empleando el software CellQuest (BD). Para el análisis inmunofenotípico se empleará el programa informático Infinicyt (Cytognos, Salamanca), analizándose comparativamente tanto el porcentaje de células positivas para cada uno de los marcadores como la intensidad media de fluorescencia (MFI).

9) ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN IN VITRO:

9-a) Diferenciación hacia adipocito:

Para la diferenciación hacia adipocito, las MSC serán cultivadas en una placa de cultivo sobre porta (SlideFlask), a una concentración aproximada de 2×10^4 células/cm², con 3 mL con medio de cultivo NH AdipoDiff® de Miltenyi Biotech. Dicho medio se recambiará cada 3-4 días. Tras 21 días en cultivo, se analizará la diferenciación a adipocitos mediante tinción inmunocitoquímica con Oil-Red-O.

9-b) Diferenciación hacia osteoblasto:

Para la diferenciación hacia osteoblasto, las MSC serán cultivadas en una placa de cultivo sobre porta (SlideFlask), a una concentración aproximada de 5×10^3 células/cm², con 3 mL con medio de cultivo NH OsteoDiff® de Miltenyi Biotech. Dicho medio se recambiará cada 3-4 días. Tras 10 días en cultivo, se analizará la diferenciación a osteoblastos mediante tinción inmunocitoquímica con fosfatasa alcalina.

9-c) Diferenciación hacia condrocito:

Para la diferenciación hacia condrocito, las MSC serán cultivadas en un pocillo de una concentración aproximada de 5×10^3 células por pocillo, con 1 mL de medio de cultivo NH CondroDiff® de Miltenyi Biotech. Dicho medio se recambiará cada 3-4 días. Tras 21 días en cultivo, se analizará por PCR los niveles de expresión de genes determinados.

Se comparará la capacidad de diferenciación hacia las 3 líneas mesodérmicas (adipocito, osteocito y condrocito) de las MSC obtenidas a partir de aspirado de médula ósea

10) ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INMUNOMODULADORA

Con el fin de evaluar las propiedades inmunomoduladoras de las MSC, las PBMC (células monoculares de sangre periférica) de donantes se cocultivan con MSC de ambos pacientes del estudio. En este ensayo, las PBMC se teñirán previamente con CFSE, se activarán con PHA (5 µg/ml) e IL-2 (50 U/ml) y se agregarán sobre las MSC, en una relación 10: 1 (PBMC: MSC). Después de 5 días en cultivo a



37°C y 5% de CO₂, la capacidad de las MSC para inhibir la proliferación, principalmente de la población de células T, será determinada por citometría de flujo usando el FACS-Cantoll y el índice de proliferación calculado usando el software ModFit LT (Verity Software House).

11) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Al final del estudio una vez obtenido los datos de los dos grupos de pacientes se procederá al análisis estadístico de los datos mediante un estudio descriptivo y otros de análisis de regresión variable mediante el programa SSPS 23.0.

La principal limitación del estudio es el número de pacientes reducido en función de que se trata de un estudio preliminar exploratorio. Así mismo es posible y debido a ello que ninguno de los pacientes presente una evolución clínica desfavorable hacia un síndrome de respuesta inflamatoria inadecuada lo que ocasionaría una pérdida de información.

UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN RELACIÓN CON LA SALUD Y RELEVANCIA

1) Los hallazgos podrían indicar la posible implicación de las MSC en la respuesta orgánica al trauma. Aunque ya sabemos que de alguna manera se produce una migración de estas células ante una lesión, el presente estudio, al ser comparativo, nos permitiría comprender mejor los fenómenos que ocurren.

2) Los hallazgos podrían mostrar la posible utilidad de las MSC como herramienta terapéutica en el manejo de pacientes con trauma grave, y como se ha demostrado para otras entidades podría ayudar a mejorar o corregir el síndrome de respuesta inflamatoria inadecuada que es causa de mortalidad en estos pacientes.

3) Los resultados podrán ser publicados en revistas dentro del JCR como el J of Trauma, JBJS, Stem Cells etc.

