



Universidad de Valparaíso  
Facultad de Medicina  
Escuela de Obstetricia y Puericultura  
Casa Central

“Obtención, procesamiento y aplicaciones de las Células  
Madres extraídas de la Gelatina de Wharton del Cordón  
Umbilical Humano en la Medicina Regenerativa”

Tesis para obtener el Grado de Licenciado/a en Obstetricia y  
Puericultura

Profesor Guía: Mario Párraga San Román

Estudiantes: Johana Acevedo Cortés

Gabriela Arriagada Salazar

Natali Baeza Aranda

Catalina Fuentes Gamé

Valentina Solís Álvarez

Camila Villa Figueroa

Valparaíso, 26 de Junio 2015

Valparaíso, 2015

# Agradecimientos

“El fracaso es una gran oportunidad para empezar otra vez con más  
inteligencia”

(Henry Ford)

Primero que todo, comenzamos con esta frase porque representa lo que nos ha llevado todo este proceso de realización de esta tesis, que en simples palabras significa obstáculos, que hemos podido enfrentar gracias a las personas más importantes de nuestras vidas, nuestros padres. Queremos agradecer a primero a ellos, por su comprensión y apoyo, por entregarnos las herramientas necesarias para poder llevar a término esta tesis, por enseñarnos que la perseverancia es el único camino para poder alcanzar nuestras metas y por enseñarnos que los obstáculos son una forma de hacernos más fuertes y más sabias.

También a nuestros amigos y seres queridos, por entregarnos las palabras de ánimo, hacernos reír en momentos de estrés, entendernos cuando nuestra actitud no era la mejor.

Para finalizar, esta instancia única de expresar nuestra gratitud de quienes nos apoyaron, queremos dejar impresa y latente la siguiente frase:

“Cuando quieres algo, todo el universo conspira para que realices tu deseo”

(Paulo Coelho)

# Índice

Abreviaturas .....	- 5 -
Glosario.....	- 7 -
Introducción.....	- 11 -
Objetivos .....	- 13 -
Marco teórico .....	- 14 -
Método .....	- 22 -
Obtención de células madre mesenquimáticas.....	- 25 -
Aprobación de Comité de Ética o Junta de Revisión institucional.....	- 25 -
Consentimiento informado.....	- 26 -
Tipo de gestación y vía de parto.....	- 28 -
Utilización de técnica estéril en la recolección del cordón umbilical .....	- 29 -
Procesamiento del cordón umbilical y las células madre mesenquimáticas .....	- 32 -
I. Transporte del cordón umbilical de la zona de obtención al laboratorio .....	- 33 -
II. Lavado del cordón umbilical y/o CMM del cordón umbilical .....	- 34 -
a) Lavado del cordón umbilical y/o CMM con PBS .....	- 34 -
b) Lavado del cordón umbilical con solución salina equilibrada de Hanks.....	- 38 -
c) Lavado del cordón umbilical y/o CMM con solución salina estéril.....	- 39 -
III. Extirpación de los vasos sanguíneos del cordón umbilical.....	- 39 -
IV. Disección del cordón umbilical .....	- 41 -
a) Cortes cúbicos del cordón umbilical según tamaño: .....	- 41 -
b) Cortes longitudinales del cordón umbilical según tamaño:.....	- 42 -
c) Raspado de la Gelatina de Wharton .....	- 44 -
V. Acción enzimática en el tejido mesenquimático para su disgregación.....	- 44 -
a) Utilización de la colagenasa en la acción enzimática.....	- 46 -
b) Utilización de la tripsina en la acción enzimática .....	- 47 -
c) Uso en conjunto de la tripsina y la colagenasa en la acción enzimática.....	- 49 -
d) Otras variantes encontradas en relación al empleo de acción enzimática .	- 50 -
VI. Centrifugación de CMM.....	- 51 -
VII. Incubación de las CMM .....	- 54 -

VIII.	Tinción de las CMM con Azul de Tripán .....	- 55 -
IX.	Recuento celular de CMM.....	- 55 -
X.	Citometría de flujo para el análisis de marcadores de superficie celular de las células madre mesenquimáticas.....	- 56 -
XI.	CMM expuestas a rayos UV (Ultravioleta) .....	- 57 -
XII.	Utilización de PCR para la búsqueda de expresión de genes específicos dependiendo de la investigación.....	- 58 -
	Aplicaciones clínicas de las células madre mesenquimáticas .....	- 63 -
❖	Diferenciación a Condrocitos, Adipocitos y/o Osteocitos.....	- 63 -
❖	Diferenciación en tejido perteneciente al sistema músculo-esquelético .....	- 64 -
❖	Diferenciación a tejido perteneciente al sistema nervioso .....	- 65 -
❖	Diferenciación en tejido epitelial.....	- 68 -
❖	Células madre en el tratamiento del cáncer de próstata.....	- 69 -
❖	Células madre en la oftalmología .....	- 69 -
❖	Células madre en la urología.....	- 70 -
❖	Células madre en el tratamiento de la Diabetes Mellitus .....	- 71 -
	Tabla resumen de las aplicaciones encontradas en las investigaciones .....	- 72 -
	Anexos .....	- 73 -
	Anexo 1: Estrategia de revisión bibliográfica .....	- 73 -
	Anexo 2: Flujograma.....	- 74 -
	Anexo 3: Manuscritos utilizados en la revisión bibliográfica.....	- 75 -
	Conclusión.....	- 79 -
	Bibliografía.....	- 81 -

# Abreviaturas

- ❑ **6-OHDA:** 6-hidroxidopamina.
- ❑ **ALL:** (Siglas en inglés) Leucemia linfoblástica aguda.
- ❑ **AML:** (Siglas en inglés) Leucemia mielógena aguda.
- ❑ **CMM:** Células madre mesenquimáticas.
- ❑ **CML:** (Siglas en inglés) Leucemia mielógena crónica.
- ❑ **CMV:** Citomegalovirus.
- ❑ **CLL:** (Siglas en inglés) Leucemia linfocítica crónica.
- ❑ **CU:** Cordón umbilical.
- ❑ **DM:** Diabetes Mellitus.
- ❑ **DMEM:** (En inglés; Dulbecco's Modified Eagle's medium).
- ❑ **DPBS:** (En inglés; Dulbecco's Phosphate Buffered Saline).
- ❑ **EBV:** Virus de Epstein-Barr.
- ❑ **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- ❑ **FITC:** Isotiocianato de fluoresceína.
- ❑ **HBSS:** Solución salina equilibrada de Hanks.
- ❑ **HPV:** Virus Papiloma Humano.
- ❑ **HUMSC:** Células madre mesenquimáticas del cordón umbilical humano.  
(En inglés; Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells).
- ❑ **ISCT:** Sociedad Internacional de Terapia Celular. (En inglés; International Society Cellular Therapy).
- ❑ **JCML:** (Siglas en inglés) Leucemia mielógena crónica juvenil.
- ❑ **MDS:** (Siglas en inglés) Síndromes mielodisplásicos.
- ❑ **NCM:** Medio condicionado neuronal.
- ❑ **PBS:** Tampón fosfato salino. (En inglés; Phosphate-Buffered Saline).
- ❑ **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- ❑ **RPM:** Rotaciones por minuto.
- ❑ **SCID:** (Siglas en inglés) Inmunodeficiencia combinada severa.
- ❑ **SFB:** Suero bovino fetal.

- ❑ **SNC:** Sistema Nervioso Central.
- ❑ **STZ:** Estreptozotocina.
- ❑ **VHB:** Virus Hepatitis B.
- ❑ **VHC:** Virus Hepatitis C.
- ❑ **VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana.

# Glosario

- **Amnios:** Es una fina membrana que envuelve y protege al embrión, está lleno de líquido amniótico, permite los movimientos fetales, ofrece protección contra eventuales golpes, ya que feto flota en el líquido amniótico. Además permite que las sustancias de desechos ingresen a la circulación materna para su eliminación.
- **Axonotmesis:** Rotura anatómica del axón con poca rotura de tejidos conectores.
- **Células de Schwann:** Se define como células gliales que se encuentran en el sistema nervioso periférico que acompañan a las neuronas en su crecimiento y desarrollo de su función. Recubren a los axones de las neuronas formándose una vaina aislante de mielina.
- **Citometría de flujo:** Corresponde a una técnica biofísica basada en la utilización de luz láser, se emplea en el recuento y clasificación de las células según sus características morfológicas, presencia de biomarcadores y en la ingeniería de proteínas.
- **Colágeno:** Es una sustancia proteínica que se encuentra en el tejido conectivo, óseo y cartilaginoso, por la acción del calor se convierte en gelatina.
- **Corion:** Es la membrana fetal que está en contacto directo con el endometrio del útero, recubre el saco coriónico. Se encuentra formado por el sincitiotrofoblasto, el citotrofoblasto y el mesodermo extraembrionario. En su superficie se forman las vellosidades coriónicas para el intercambio de sangre materna y del embrión/feto.

- **Embrioblasto:** Se considera parte del blastocisto embrionario que desarrolla tres capas germinativas constituyentes del embrión.
- **Gelatina de Wharton:** Tejido conectivo, laxo y mucoso que está compuesto por células mesenquimatosas y cumple la función de rodear y dar soporte a los vasos sanguíneos del cordón umbilical.
- **Glioma:** Es un tipo de neoplasia que se produce en el cerebro o médula espinal. Se llama glioma, ya que surge a partir de las células gliales.
- **Histocompatibilidad:** Semejanza entre dos o más tejidos a nivel de sus características genéticas e inmunológicas. La histocompatibilidad es imprescindible para el éxito de un trasplante de órganos o sangre entre un donante y un receptor. En caso que no se presente esta característica, se produce el rechazo.
- **PBS:** (*phosphate buffered saline*) Es una solución tampón empleada en la investigación biológica, bioquímica y de inmunología diagnóstica. Es acuosa y salina, contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio.
- **Pellet:** Denominación genérica utilizada para referirse a pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido.
- **Péptido C de insulina:** Producto de degradación que se crea cuando se produce y secreta la hormona de insulina. Cuando el páncreas produce insulina, comienza como una molécula grande que se divide en dos partes: Insulina y péptido C. La función de este último no se conoce. El análisis péptido, permite establecer si el cuerpo está produciendo insulina.

- **Placenta:** Órgano intermediario durante la gestación entre la madre y el feto, se adhiere a la superficie interior del útero y del que nace el cordón umbilical. Consiste en una masa esponjosa, adherida al útero, a través de esta se establece el intercambio de oxígeno y sustancias nutritivas entre la madre y el embrión.
- **Rotor:** Es el componente que gira (rota) en una máquina eléctrica, sea ésta un motor o un generador eléctrico. Junto con su contraparte fija, el estátor, forma el conjunto fundamental para la transmisión de potencia en motores y máquinas eléctricas en general.
- **Sarcoma de Kaposi:** Tumor maligno del endotelio linfático causado por el Virus del sarcoma de Kaposi. Sus signos son lesiones de color rojo azulado, planas o elevadas y con una forma irregular, sangrado por las lesiones gastrointestinales, dificultad para respirar por las lesiones pulmonares y esputo con sangre también por las lesiones pulmonares.
- **Sitagliptina:** Es un inhibidor de la enzima dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-4) para el tratamiento de la diabetes de tipo 2, activo por vía oral. Los inhibidores de la DPP-4 son una clase de agentes que actúan por un aumento de los niveles de las hormonas incretinas activas. Al inhibir la enzima DPP-4, la sitagliptina aumenta los niveles de 2 hormonas incretinas activas conocidas, el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP). Las hormonas incretinas regulan fisiológicamente los niveles de glucosa en la sangre al aumentar la respuesta insulínica de las células pancreáticas beta y al inhibir la secreción de glucagón de las células pancreáticas alfa cuando los niveles de la glucosa sanguínea están normales o elevados. Estos efectos no se observan cuando la glicemia está baja. La sitagliptina difiere en estructura química y acción farmacológica de los análogos del GLP-1, la insulina, las sulfonilureas, o las meglitinidas, las biguanidas, los

agonistas del receptor gamma del peroxisoma activado por proliferador (PPAR), los inhibidores de la alfa-glucosidasa y los análogos de la amilina. Es un medicamento indicado como un complemento de la dieta y el ejercicio para mejorar el control de la glicemia en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

- **Sobrenadante:** La Real Academia Española lo define como “*Mantenerse encima del agua o de otro líquido sin hundirse.*”(1) Es decir, el sobrenadante es la fase líquida superior que aparece cuando se centrifuga una muestra, de modo que al centrifugar uno obtiene el sobrenadante arriba y el precipitado o pellet abajo.
- **Telomerasa:** Es una enzima formado por un complejo proteína-ácido ribonucleico con actividad polimerasa, está presente en las células de la línea germinal, en tejidos fetales y en ciertas células madre poco diferenciadas. Permite el alargamiento de los telómeros, se encuentra presente en organismos eucariotas unicelulares. La telomerasa es reprimida en las células somáticas maduras después del nacimiento, produciéndose un acortamiento del telómero después de cada división celular.
- **Tripsina:** Enzima peptidasa, rompe los enlaces peptídicos mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos.
- **Trofoblasto:** Se define como envoltura externa que recubre el embrión humano, colabora en la formación de la placenta. Es una membrana concéntrica al amnios, que lo envuelve, tal como a las demás membranas fetales.

# Introducción

El cordón umbilical humano es una fuente prometedora de células madre mesenquimales (HUCMSCs). A diferencia de las células madre de la médula ósea, HUCMSCs tienen un procedimiento de recolección indoloro y propiedades de auto-renovación más rápidos. Diferentes protocolos de derivación pueden proporcionar diferentes cantidades y poblaciones de células madre. Estas poblaciones de células madre también se ha informado en otros compartimentos del cordón umbilical, tales como el revestimiento espinal, el tejido perivascular, y la gelatina de Wharton. HUCMSCs son fuentes no controversiales en comparación con las células madre embrionarias. Ellos pueden diferenciarse en las tres capas germinales que promueven la reparación de tejidos y modular las respuestas inmunes y las propiedades anti-cáncer. Por lo tanto, son agentes autólogas o alogénicas atractivos para el tratamiento de cánceres sólidos y blandos malignas y no malignas. HUCMCs también puede ser la capa alimentadora para que las células madre embrionarias u otras células madre pluripotentes.

La medicina regenerativa es un campo emergente e interdisciplinario que utiliza las células madre para la reparación de tejidos u órganos dañados estructural y/o funcionalmente. Aborda en su generalidad tres áreas de trabajo: terapia celular, ingeniería genética y la de tejidos; todas tienen como fin común la regeneración de tejidos dañados, la creación de órganos para trasplante, entregar solución a problemas genéticos y la curación de enfermedades que no tienen tratamiento.

En la actualidad, el uso de células madre en terapias y tratamientos se encuentra en la etapa de implementación. Es por lo que en Chile aún no existe una regulación en relación a esta temática, sólo se define lo que es autólogo.

Sin embargo, las limitaciones constitucionales respecto de la vida que está por nacer, implica la prohibición de experimentar con embriones sólo con fines de investigación o tratamiento terapéutico que luego implique su destrucción, por lo que se generan implicaciones éticas derivadas de la posibilidad de ser utilizadas en generación de clones o producción de embriones in vitro sólo para rescatar células y ocuparlas en el área de la medicina. Sin embargo, esto ha favorecido que no existan limitaciones en relación al uso de investigaciones con las células madre adultas.

Las células madre constituyen en el presente una promesa de cambios y progresos en diversas patologías para las cuales todavía no se ofrecen soluciones. Desde esta perspectiva, los avances se establecen en función de un solo parámetro: su aplicación en el campo terapéutico; ya sea perfeccionando u ofreciendo nuevas alternativas al tratamiento de enfermedades o condiciones de salud que ya se están tratando con células madre, o bien, abriendo nuevos campos de aplicación de esta clase de terapia. Es importante que la población forme parte de estas nuevas áreas de investigación y cuenten con el conocimiento para decidir posibles usos y tratamiento en un futuro.

La siguiente tesis bibliográfica tiene como objeto recopilar información en relación a la obtención, procesamiento y aplicaciones terapéuticas de las células madre mesenquimáticas derivadas de cordón umbilical. La información utilizada es obtenida de diferentes estudios y documentos de estudio de la temática, la que con previa revisión específica de cada uno, se desarrollan de acuerdo a lo mencionado anteriormente. Todo con el fin de responder de la siguiente pregunta investiga: ¿De qué manera se ha trabajado con las células madre mesenquimáticas de la Gelatina de Wharton del cordón umbilical humano en la medicina regenerativa hasta el año 2014?

# Objetivos

## ❖ Objetivo General:

Recopilar información en relación a la obtención, procesamiento y aplicaciones clínicas de las células madre mesenquimáticas de la Gelatina de Wharton del cordón umbilical.

## ❖ Objetivos Específicos:

- Encontrar bibliografía atinente en relación a la obtención, procesamiento y aplicaciones clínicas de las células madre mesenquimáticas de la Gelatina de Wharton del cordón umbilical.
- Seleccionar información sobre la obtención y procesamiento de las células madre mesenquimáticas de la Gelatina de Wharton del cordón umbilical.
- Hallar en la revisión bibliográfica aplicaciones clínicas de las células madre mesenquimáticas de la Gelatina de Wharton del cordón umbilical.

# Marco teórico

La fecundación es el proceso donde se fusionan los gametos femenino y masculino con el fin de dar origen a una nueva vida. En humanos, treinta horas después de la fecundación, el cigoto sufre su primera división mitótica, dando origen a dos blastómeras, las que continúan su división celular hasta tener entre doce y dieciséis blastómeras (mórula). En ese momento se produce la compactación. Esta consiste en una serie de divisiones celulares en una zona interior de la mórula (embrioblasto) y una zona exterior de esta misma (trofoblasto). El embrioblasto (ver glosario) se encarga de formar el embrión y el trofoblasto (Ver glosario) se encuentra determinado a la formación de anexos embrionarios.

La zona del trofoblasto que está sobre el embrioblasto forma la parte fetal de la placenta (ver glosario) y el resto que queda rodeando la gran cavidad celómica origina dos membranas: el corion (ver glosario) y el amnios (ver glosario), éstas rodean al embrión en desarrollo. En el momento que todo el líquido ingresado se ubica en una cavidad única, la estructura se denomina blastocisto. Consiguiente a esto, se pierde la zona pelúcida y el blastocisto se adhiere a la mucosa uterina al sexto día para así, poder fijarse completamente el día catorce, lo que se define como implantación.

El orden del embrioblasto en dos estratos se define como pregastrulación. El estrato se diferencia en hipoblasto y epiblasto, este corresponde a células cilíndricas y altas que son ubicadas por dorsal, son capaces de formar las tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo). El hipoblasto corresponde a células cúbicas o planas, ubicadas ventralmente.

El ectodermo, mesodermo y endodermo se definen como capas germinativas ya que partir de ellas se generan todos los tejidos del organismo. El ectodermo origina el sistema nervioso central, nervios periféricos, la epidermis y sus derivados. Del mesodermo se forma tejido muscular, óseo, dermis, cartilaginosa, sistema circulatorio, renal y reproductor. Y por último, el endodermo se encarga de la formación de los pulmones y aparato digestivo, incluidas sus glándulas anexas (hígado y páncreas).

Durante la formación del embrión se encuentran distintos tipos de células que dan origen a otras nuevas con mayor grado de diferenciación, dentro de las cuales se menciona a las células madre, esto se conoce como especialización celular.

Las células madre son aquellas que están dotadas simultáneamente de la capacidad de autorrenovación y de originar células hijas comprometidas en determinadas rutas de desarrollo. Este tipo celular se convertirá en linajes especializados debido al proceso de diferenciación facilitado por su plasticidad celular. Cabe destacar que mientras más se diferencian estas células, su potencialidad va en disminución y llegan a ser un tipo celular que sólo puede formar una línea. Las células madre se clasifican en totipotente, pluripotente, multipotente y unipotente, las que además se pueden clasificar según su potencial de diferenciación correspondiente.

- Células madre totipotentes: Son un tipo celular capaz de generar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios, como los extraembrionarios (placenta). Si se implanta una de estas células en el útero se puede originar un feto y por consiguiente un nuevo individuo.
- Células madre pluripotentes: Pueden producir la mayor parte de los tejidos de un organismo; aunque estas células pueden producir cualquier tipo celular, pueden llegar a formar un organismo completo, pero no los tejidos extraembrionarios.

- Células madre multipotentes: Son aquellas que pueden formar su propia capa embrionaria o las células madre órgano específica. Originan un órgano específico en el embrión y también en el adulto.
- Células madre unipotentes: Son aquellas capaces de diferenciarse en un solo tipo celular.

El primer tipo de células madre que se detectan son las totipotentes en el cigoto. En segundo lugar se encuentran las células madre pluripotentes, que se establecen en el epiblasto, luego las multipotentes y por último en la reproducción celular se encuentran células madre unipotentes.

Existen cuatro tipos de células madre según donde se originen: embrionarias, germinales, fetales y adultas.

- a. Las células madre embrionarias son obtenidas a través del blastocisto, éste se encuentra conformado por una capa externa llamada trofoblasto y tiene aproximadamente setenta células. Su capa interna es definida como masa celular interna o embrioblasto y consta de treinta células, siendo las células madre embrionarias que dan origen a tejidos y órganos.
- b. Las células madre germinativas se obtienen de los esbozos gonadales del embrión que se encuentran en la cresta gonadal, los que darán origen a los óvulos y espermatozoides.
- c. Las células madre fetales provienen de tejidos y órganos fetales, como por ejemplo: sangre, pulmón o hígado, aunque en la actualidad su origen no está esclarecida en su totalidad.
- d. Por último, las células madre adultas provenientes de tejidos y órganos adultos encargadas de reparar tejidos dañados o en desgaste tales como el hígado, piel o sangre, por ejemplo, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea y las células madre mesenquimáticas encontradas en sangre periférica, médula ósea, grasa corporal y cordón umbilical.

Las células madre mesenquimáticas (CMM) en especial las células obtenidas del cordón umbilical, son las que serán abordadas en esta tesis bibliográfica.

### Cordón Umbilical

El cordón umbilical es un conducto tubular de aproximadamente cincuenta centímetros que cumple la función de conectar la placenta con el feto, está formado por una vena umbilical encargada de llevar la sangre arterial, y dos arterias umbilicales que tienen la función de transportar la sangre venosa. Estos tres vasos sanguíneos están unidos por la Gelatina de Wharton (Ver glosario), este constituye un tejido conectivo y mucoso embrionario que se extiende desde el epitelio amniótico y los vasos umbilicales. Se compone de células del estroma similares a miofibroblastos, fibras de colágeno y proteoglicanos. Las fibras de colágeno, entrelazadas y pequeñas hacen tejidos dispuestos para formar un esqueleto suave y continuo que recubre los vasos umbilicales. La gelatina tiene muy poco colágeno, indicando un estado primitivo de este tejido. Al interior se encuentra el ácido hialurónico, que forma un gel hidratado alrededor de los fibroblastos y fibrillas de colágeno manteniendo arquitectura del tejido del cordón umbilical y protegiéndolo de la presión. Las células del cordón umbilical tienen la capacidad de proliferación y diferenciación, correspondiendo así a características de una célula madre.

Además de los conductos venosos, arteriales y su tejido conectivo, la estructura del cordón umbilical incluye también un conducto que posee restos del saco vitelino o alantoides, tejido fibroblástico de revestimiento de los vasos sanguíneos y epitelio amniótico.

Se han identificado cuatro fuentes de células madre en el cordón umbilical:

- a. Amnioblastos: Células que proceden de la membrana amniótica y recubren el tejido conectivo del cordón umbilical formando un epitelio.

- b. Células progenitoras hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical: Pueden diferenciarse en cualquier tipo de células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas).
- c. Células vasculares de la vena umbilical: Se encuentran las células subendoteliales y endoteliales de la vena.
- d. Células madre de la Gelatina de Wharton del Cordón umbilical: Se distinguen tres poblaciones celulares: perivasculares, zona intervascular y de la región subamniótica. Estos tipos celulares poseen diversos grados de diferenciación celular, potencial de diferenciación y capacidad proliferativa.

Las CMM son células madre adultas pluripotentes, se definen capaces de diferenciación en múltiples linajes celulares de origen mesodérmico, como por ejemplo tejido adiposo, condrocitos, entre otros. Para ser clasificadas como tal, deben cumplir condiciones o parámetros básicos definidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT o Internacional Society Cellular Therapy). Estos son: ser células adherentes, no presentar marcadores hematopoyéticos, monocitos, macrófagos y linfocitos B y expresar marcadores tales como CD73, CD90 y CD105, entre varios.

Se distinguen diversas ventajas de este tipo celular, las más destacadas son su elevada actividad de telomerasa (Ver glosario), la que permite una incrementada capacidad de proliferación y mayor rapidez de expansión en los cultivos celulares; baja expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad (Ver glosario) mayor clase I y ausencia de expresión del complejo de histocompatibilidad mayor de clase II, es a consecuencia de esto que el huésped no debería desencadenar una respuesta inmune de rechazo contra el injerto.

Las características mencionadas postulan a este tipo celular como un excelente candidato para la medicina regenerativa y el tratamiento de enfermedades como enfermedad de Crohn, reparación y regeneración de huesos y cartílago, lesiones medulares causadas por traumatismos, cirugía reconstructiva (piel, tráquea, mamas, entre otros, intervenciones de corazón (infartos y creación de válvulas cardíacas), el uso en malformaciones y/o desórdenes genéticos. Todas las aplicaciones se están actualmente investigando y buscando implementarse de la manera más anticipada.

Existen diversas limitaciones en lo que respecta a la obtención de las CMM derivadas de gelatina de Wharton, considerando que en la actualidad los hospitales no cuentan con tratamientos consolidados con células madre mesenquimáticas.

La obtención de CMM en otras fuentes como la médula ósea, pulpa dental y tejido adiposo se vuelve complejo ya que se debe recurrir a procedimientos invasivos y sólo se tiene el momento del parto para obtener las derivadas de cordón umbilical.

Estas células tienen la capacidad de reparar tejidos lesionados, modular reacciones inmunes, y posee habilidad inmunosupresora. Se han utilizado para tratar distintos tipos de enfermedades y desórdenes ya que cumplen con diversas aplicaciones clínicas previamente estudiadas e investigadas en animales y humanos. Se involucra en esto defectos craneofaciales, reparación del miocardio, inhibición de la expresión de las moléculas involucradas en la presentación de antígenos, diabetes tipo I, enfermedad de Chron, enfermedades degenerativas, entre otras. De acuerdo a lo anterior, investigadores de la Universidad de Toronto y el Hospital Princess Margaret, en el año 2012 descubrieron que las células mesenquimáticas de cordón umbilical tienen una eficacia superior que el tratamiento habitual (células de la médula ósea) para reparar el daño provocado en el músculo cardíaco tras un infarto, cuando son inyectadas directamente en el área afectada.

El Dr. Kearting señala *"Confiamos en que este descubrimiento provoque que cada vez menos pacientes desarrollen complicaciones o fallos cardíacos provocados por la disfunción de su músculo cardíaco tras un infarto"*.

En el centro Beike biotechnology asociado con el Better Being Hospital en Bangkok han estado trabajando con células madre mesenquimáticas del cordón umbilical en el tratamiento del Autismo y señalan lo siguiente: *"Nuestro centro de tratamiento en Bangkok, dirigido por el Dr. Torsak Tip-pairote, está actualmente ofreciendo tratamiento especializado complementario para pacientes con Autismo y Desordenes del Espectro Autista. Nuestro tratamiento avanzado con células madre es ahora estimulado por la Medicina Funcional, donde los síntomas autistas son vistos como una consecuencia de algunos desequilibrios funcionales, como por ejemplo: desregulación inmune, acumulación de metales tóxicos en el cuerpo, metabolismo energético básico, deficiencia nutricional y desequilibrios hormonales. Estos desequilibrios se derivan principalmente de factores ambientales y del estilo de vida del paciente y de la interacción con la predisposición genética de cada individuo"*.

*La mayoría de los pacientes con autismo que Beike ha tratado, ha sido utilizando una combinación de células madre obtenidas de la sangre del cordón umbilical, células madre mesenquimales del cordón umbilical, rehabilitación y medicina funcional. Las mejoras fueron ostensibles en cuanto a su "interacción social, mejora en la comunicación verbal y no verbal, el lenguaje y la mejora de la capacidad de aprendizaje, redujeron su comportamiento repetitivo, tuvieron un mejor desarrollo mental y mejora en el tono muscular". (2)*

Según "The leukemia & Lymphoma Society", Agosto 2007: *"El primer trasplante exitoso de células madre de la sangre del cordón umbilical se realizó en París, Francia, en 1988. El paciente era un niño con anemia de Fanconi, un tipo de anemia genética que es potencialmente mortal."*

*Actualmente ya se han realizado trasplantes de células madre de la sangre del cordón umbilical con éxito a pacientes (en su mayoría niños) con 70 tipos de enfermedades, entre las que se incluyen la leucemia linfocítica aguda (también denominada “leucemia linfoblástica aguda” o ALL por sus siglas en inglés), leucemia mielógena aguda (AML por sus siglas en inglés), síndromes mielodisplásicos (MDS por sus siglas en inglés), leucemia mielógena crónica (CML por sus siglas en inglés), leucemia mielógena crónica juvenil (JCML por sus siglas en inglés), leucemia linfocítica crónica (CLL por sus siglas en inglés), linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, neuroblastoma, talasemia, inmunodeficiencia combinada severa (SCID por sus siglas en inglés), síndrome de Wiskott-Aldrich, y enfermedades metabólicas como la adrenoleucodistrofia y el síndrome de Hurler, y anemia aplásica grave. Hasta el momento, en todo el mundo, se han llevado a cabo más de 5,500 trasplantes de células madre de sangre del cordón umbilical de donantes no emparentados y varios cientos de donantes hermanos”.*

Actualmente no está esclarecido el tiempo exacto en que se pueden mantener congeladas y almacenadas las células madre mesenquimáticas, pero sí se sabe que se han conservado por diez años, luego han sido trasplantadas, sin perder su efectividad, por lo que las intervenciones que se han realizado con ellas han sido un éxito.

En el siglo XXI, el negocio de las célula madre va en ascenso, ya que la población cada vez está más interesada en el tema de mantener su “salud” y la de sus hijos mediante la conservación de células madre derivadas de tejidos como músculo, grasa, médula ósea, placenta y hasta sangre de cordón umbilical, para así tener la oportunidad y asegurar un posible tratamiento para enfermedades degenerativas como: Leucemia, Alzheimer y Cáncer.

# Método

## Resumen que indique que pregunta se intentó resolver con la búsqueda:

La búsqueda tuvo como objeto hallar diversos estudios que introdujera en su temática a las células madre mesenquimáticas obtenidas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical. Se incluye obtención, caracterización y/o utilización dentro de la medicina regenerativa, de esta manera se realiza un análisis en lo que respecta el área investigativa en la actualidad de esta área. Los criterios utilizados para realizar esta búsqueda fueron los siguientes:

- Revisión bibliográfica sólo en idioma inglés.
- Desde el año 2004 a 2014.
- No se emplearon límites de hojas de escritura.
- Criterio de elegibilidad con título de investigación que hiciera referencia a las células madre mesenquimáticas del cordón umbilical o gelatina de Wharton.
- Al seleccionar archivos, se revisó cada uno de ellos.

## Estrategias utilizadas para el estudio:

- Tipo de diseño: Revisión bibliográfica.
- Límites de importancia: Se realizó una selección de documentos que tuviesen como objetivo principal el estudio y utilización con células madre provenientes de la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Importante que en los documentos deben haberse descritos o nombrados la obtención, procesamiento y aplicaciones en medicina regenerativa. Para la selección de los archivos se leyeron los abstract con el fin de reducir la búsqueda a los que realmente hablaran del tema que se estudia en esta tesis.

Idiomas en que se hizo la búsqueda:

La búsqueda bibliográfica se realizó en idioma inglés.

Cantidad y listado de publicaciones utilizadas para estudio:

Con las palabras claves utilizadas, resultaron 313 publicaciones.

Se determinaron como atingentes con la tesis bibliográfica 59 de ellas.

(Ver Anexo 1 y 2)

Definición de número de publicaciones:

El número de publicaciones revisadas y utilizadas es de 59.

Definir estrategia de búsqueda bibliográfica:

Se utilizó el buscador PUBMED con las palabras claves. Definiendo determinar cuál utilizar de acuerdo a cada resultado y su utilidad en el estudio.

Análisis de variabilidad, fiabilidad, validez de artículos incluido:

Los artículos utilizados fueron descargados de una base de datos que archiva artículos médicos, estos son publicados en revistas científicas y son reconocidos por la comunidad profesional del área.

Cantidad de artículos seleccionados, obtenidos y descartados:

- Artículos seleccionados: 313
- Artículos obtenidos: 59 (originales 82)
- Páginas no abrieron
- Errores en publicaciones
- No se acercaba a los contenidos de interés de para esta revisión.

(Artículos descartados: 131 por necesidad de compra y por falta de atinencia con tema).

Título de la base de datos utilizados:

El título en buscador fue "Human Wharton's Jelly Mesenchymal stem cells"

Fecha de la búsqueda:

La búsqueda bibliográfica se realizó con fecha de 08/03/2015, la revisión completa de textos se realizó por las dos semanas consecutivas a la fecha (desde 09/03/2015 hasta 22/03/2015).

Años que se consideraron de búsqueda:

El parámetro cronológico utilizado fue desde año 2000 hasta año 2015.

Términos que se utilizaron para buscar: palabras claves:

Las palabras claves utilizadas en buscador fueron "Human Wharton's Jelly Mesenchymal stem cells", se utilizó buscador PUBMED.

# Obtención de células madre mesenquimáticas

En relación a la obtención de células madre mesenquimáticas derivadas de cordón umbilical, se esclarece con la lectura de los estudios que hay distintas maneras de realizarlo.

## **Aprobación de Comité de Ética o Junta de Revisión institucional**

Hay publicaciones que dejan explícitamente definida la necesidad de aprobación previa por parte de una junta de revisión o un comité de investigación específico para poder llevar a cabo su investigación. (3-7) En el estudio Derivation efficiency cell proliferation, freeze thaw survival stem cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells, hace referencia a lo siguiente: "Consentimiento informado a gestantes de embarazos individuales o dobles, aprobado previamente por la Junta de Revisión Institucional". (8) También podemos encontrar investigaciones que para la aprobación del estudio, este debido pasar por el escrutinio de un Comité de Ética (9-13), como en el siguiente enunciado: "Los cordones umbilicales se recogieron con la aprobación del Comité de Ética en Investigación local e informado por escrito el consentimiento de las madres, en el NHS-Sangre y Centro de Trasplantes, Hospital John Radcliffe, Oxford y el Banco de Sangre en Londres." (14)

## **Consentimiento informado**

Un requerimiento fundamental, muchas veces exigidos por los Comité de Ética o Revisión Institucional, es la realización de un consentimiento informado ya sea al donante mismo o a un tutor legal de éste, en cual se señale los aspectos relevantes de la investigación como, los fines que apunta y los riesgos que conlleva participar de ella.

Por ello, en su mayoría se solicitó autorización a madre o ambos padres mediante un documento legal denominado consentimiento informado, siendo este aplicado antes o después del nacimiento. En el estudio *Islet like cluster derived from mesenchymal stem cells in Wharton's jelly of the human umbilical cord for transplation to control type 1 diabetes*, se manifiesta lo siguiente "Se realizó consentimiento informado a los padres previo a la recolección post parto de los cordones". (15) De igual manera en el estudio *Transplation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton jelly after complete transection of the rat spinal cord*, refiere que "Previo al nacimiento se realiza consentimiento informado a los padres". (4, 5, 7, 10, 13, 16, 17) Sin embargo, en diferentes estudios dicho consentimiento solamente se le pidió a la madre su aceptación. (8, 12, 14, 18-23) Exceptuando a lo anterior, se halló aquellos que refieren la aplicación de un consentimiento informado, pero no especificando a quien se le realizó, si a la madre, padre o ambos. (9, 11, 24-27)

Dentro de un determinado número de investigaciones donde se firmaron consentimientos informados, se declara seguir los principios de la Declaración de Helsinki, la cual declara una propuesta de principios éticos para investigación médica, incluyendo la investigación del material humano y de información identificables.

Es importante señalar que los principios generales de esta declaración son con respecto al vinculamiento con la salud de los pacientes, considerando lo mejor para ellos, siendo la investigación con humanos la última opción; si fuese el caso que correspondiere a estudios con personas, el propósito principal es comprender causas, efectos, evolución de enfermedades y mejorar intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas. En general se busca señalar los grupos de personas, los requisitos científicos, comités de ética de investigación, privacidad, confidencialidad, consentimiento informado, uso de placebos, estipulaciones post ensayos, publicaciones, intervenciones no probadas, entre otras. (12, 24).

En término de los aspectos de inclusión, sólo en algunas investigaciones se menciona que se realizaron análisis para descartar la presencia de ciertas patologías en la gestante donante antes de la recolección del cordón umbilical, se llevaron a cabo mediante exámenes de laboratorio: VIH, VHB, VHC, HPV y para Sífilis. Ejemplo de esto es el estudio Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cells derived from placental decidua basalis, señalando “Se realizó consentimiento informado a las madres de parto o cesárea, descartando patologías infecciosas a través de pruebas de VIH, VHC y HPV, a través del departamento de obstetricia afiliada Universidad de las Ciencias Médicas en Shiraz”(20), algo similar refiere otro estudio: “El cordón umbilical se obtuvo, con previo consentimiento informado a los participantes, de la primera parturienta sana, con embarazo de término, y sólo cuando las pruebas para la hepatitis B, sífilis o VIH fueron negativos”. (22) Otra publicación incluyó pruebas mucho más específicas donde se analizaron en el donante, además de las pruebas ya mencionadas, se incluyó pruebas para el citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein-Barr (EBV). (12)

## **Tipo de gestación y vía de parto**

Al término de la revisión queda claro que no hay criterios en común, cada estudio determina el tipo de parto y condiciones obstétricas que aceptará para el estudio respectivo. Se aprecia que entre los diferentes estudios difieren unos de otros, siendo que estos requisitos pueden ser un factor incidente al momento de obtener células madre mesenquimáticas del cordón umbilical. Se encontraron estudios donde se aceptaban gestaciones únicas o gemelares,

“Consentimiento informado a gestantes de embarazos individuales o dobles...” (3, 8); “Los cordones umbilicales humanos de ambos sexos se obtuvieron de los nacimientos a término (dos pares de gemelos fraternales) con el consentimiento informado de la madre después de que cualquiera cesárea (11 de 14) o un parto vaginal normal y asépticamente almacenadas a 4 ° C en estéril salina hasta su procesamiento”. (23, 28) En ciertos estudios, sólo pueden ser cordones umbilicales obtenidos de partos (29), otros incluyen sólo cesárea (3, 9, 11, 13, 30-37) y otros pueden incluir ambas vías (20, 21, 23, 27), tal cual como lo menciona en la investigación Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia, en donde “...cordones umbilical de recién nacidos de término (RNT) producto de parto normal o cesárea.” (25)

Pocas publicaciones no determinan la vía del parto. (4, 5, 26, 38) En uno de estos casos, no se determina, porque la obtención de cordón umbilical se realizó a través de un Banco de Células Madre, pero se puede presumir que dicho banco proporcionó algunos aspectos relevantes a los investigadores, expresando lo siguiente: “El cordón umbilical se obtuvo de una madre sana, de la edad 26 años, nacido término sano y sin historia familiar genética, sin antecedentes de cáncer, no hepatitis B (VHB), hepatitis Virus C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV) y la sífilis en suero.” (12)

Como lo señalado en último enunciado, la gran mayoría de las investigaciones tenían como preferencia utilizar cordones de recién nacidos de término, es decir igual o mayor a 37 semanas de gestación. (3-5, 9, 11-13, 22, 23, 25, 27, 29-31, 33-36, 38-40)

Cabe destacar que un estudio incluyó en sus condiciones, cordones umbilicales que corresponden a recién nacidos de pretérmino de entre 27 a 36 semanas a través de cesárea. (3)

Además se encontró investigaciones como por ejemplo: Mesenchymal stem cell from Wharton jelly of umbilical cord segments provide stromal support for maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long term ex vivo culture, que dentro de su criterio de inclusión establecía como requisito a los recién nacidos sanos, sin dar una explicación o definición específica de que es considerado “sano” para el estudio, pudiendo ser un factor limitante si se considerara replicar dicho estudio. (6, 10) Situación similar se da en otros estudios, pero aportaron mayor información, señalando que eran término, es decir la duración que habían tenido en el período gestacional. (12, 30, 35, 39)

Solo uno de los estudios revisados no presentó mayor información en comparación a los anteriores, no se señala ni el tipo de donante, características de inclusión, tipo de gestación, tipo de parto, ni realización de un consentimiento informado, sólo expresando: “Donantes aprobados por comités correspondientes.” (41)

### **Utilización de técnica estéril en la recolección del cordón umbilical**

En los estudios revisados en la recolección, algunos hacen mención a la utilización de técnica estéril durante la obtención. En los siguientes enunciados se hace referencia a la técnica utilizada: “Cordones umbilicales humanas se obtuvieron a partir de recién nacidos de término por cesárea después se

manejaron en condiciones estériles en banco de tejidos.”(36); “Muestras de cordón umbilical humano se recogieron asépticamente de RNT productos de partos normales.” (29); “...los cordones recogidos asépticamente de embarazos de término sanos...” (39); “...asépticamente almacenada en solución salina estéril...”. (4, 5, 23) Entre los que utilizaron técnica aséptica, se halló una publicación, en la cual además indicó el uso de solución salina exactamente Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Ver glosario), en español tampón fosfato salino, junto con 1% de penicilina y estreptomicina. (42)

Algunos artículos señalan que posterior a la recolección, se utilizaron soluciones salinas específicas para mantener en óptimas condiciones la muestra de cordón umbilical recolectada. Como por ejemplo “...los cordones umbilicales humanos frescos se obtuvieron después del nacimiento y se almacenaron en solución salina equilibrada de Hanks durante 1-24 horas antes de la elaboración de tejidos para obtener células mesenquimales” (7); “...cordones umbilicales humanos frescos obtenidos...Se recogen en solución salina equilibrada de Hanks”. (4, 5, 14, 36)

De forma excepcional no se utilizó cordones umbilicales en algunos estudios. Para obtener las células objetivo se contactó con una empresa llamada Promocell, está comercializa amplias gamas de células primarias, cultivos celulares, entre otras, por lo que se obtuvieron células madre mesenquimáticas del cordón umbilical directamente. En el estudio Use of hybrid chitosan membranes and human mesenchymal stem cells from the Wharton jelly of umbilical cord for promoting nerve regeneration in an axonotmesis (Ver glosario) rat model, en la investigación Promoting nerve regeneration in a neurotmesis rat model using poly (DL-LACTIDE- e- CAPROLACTONE) membrane and mesenchymal stem cells from the Wharton’s jelly: In vitro and in vivo analysis y

Effects of human mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of the umbilical cord and conditioned media on skeletal muscle regeneration using a myectomy model, refirieron que "MSC Humanos de la gelatina Wharton del cordón umbilical (HUMSC) fueron adquiridos de PromoCell GmbH". (43-45)

En otro estudio, sucede un hecho similar, este, no sólo manifiesta la utilización de células madre de la misma empresa nombrada, sino que también especifica claramente el lote que se utilizó y el código del producto, "MSC de la gelatina de Wharton del CU fueron adquiridos de PromoCell GmbH (C-12971, lote número: 8.082.606,7)" (46), lo que hace más factible una posible replicación del estudio, ya que las células serían obtenidas de la misma manera, sin posible afecciones como puede ocurrir en obtención experimental de un cordón umbilical directo.

Ciertos estudios hacen mención a los Hospitales o Instituciones donde se obtuvieron las muestras, como son los estudios realizados en el Hospital Shanghai Oriental Afiliado a la Universidad de TongJi, en China (35) o Departamento de Obstetricia y Ginecología en Sunnybrook, Centro de Ciencias de la Salud, el cual es un Hospital afiliado a la Universidad de Toronto (37) o en el Hospital Dr. I. Cantacuzino de Rumania (38), entre otros. (3, 9-11, 13, 28, 36) En otro, sólo menciona la afiliación del centro de investigación con el departamento de obstetricia de sin nombrar a qué hospital pertenece dicho departamento. (20)

Se revisó solo un único estudio ubicado geográficamente en un Hospital chileno, dicha investigación titulada como Endothelium Trans Differentiated from Wharton's Jelly Mesenchymal Cells Promote Tissue Regeneration: Potential Role of Soluble Pro-Angiogenic Factors, sucedió en el Hospital Guillermo Benavente de Concepción. Demostrando que es viable llevar un estudio investigativo de este tipo en el país, es decir con células madre y además pudiendo ser implementado en un hospital público. (39)

El resto de las investigaciones fueron realizadas en distintos países, tales como: Portugal, Canadá, Brasil, China, Inglaterra, Rumania, Italia, Suiza, Irán, entre otros.

# Procesamiento del cordón umbilical y las células madre mesenquimáticas

Una de las etapas fundamentales de las investigaciones es el procesamiento debido a que es en donde se utilizan y manipulan las células madre. Los resultados que se obtengan en esta fase, influyen directamente en el objetivo final de la investigación.

El procesamiento es donde se prepara la materia prima, se cultivan las células y un gran listado de acciones. Cabe destacar que en la actualidad y ratificado a partir de esta revisión bibliográfica, no existe un protocolo estandarizado para el procesamiento, de hecho, cada investigación se realiza a través de conclusiones obtenidas de otros estudios o pilotajes previos realizados, es por lo que al momento de realizar una investigación con células madre es realmente trascendental alcanzar ciertos resultados que están claramente definidos por *Internacional Society Cellular Therapy (ISCT)*. Esta sociedad definió tres criterios mínimos a considerar para cuando se trabaja con células madre mesenquimáticas (CMM), los cuales son:

- Células Madre deben ser adherentes en cultivo.
- Deben expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B.
- Las CMM deben ser capaces de diferenciarse in vitro
- en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo
- condiciones estándar de cultivo.

En resumen, luego de haber logrado comprobar estos tres criterios, se puede corroborar que se está trabajando con células madre mesenquimáticas, es por ello, que la gran mayoría de los estudios bibliográficos revisados verifican dentro de su investigación el haber obtenido los criterios mínimos mencionados anteriormente, siendo la fuente de obtención lo único que cambia.

Posterior a la comprobación de los criterios, se comienza con el objetivo primordial que posee cada investigación, pudiendo ser sólo comprobar la obtención de CMM de cordón umbilical, provocar algún efecto terapéutico o una posible aplicación en la medicina regenerativa.

Como ya se ha señalado, no hay forma específica de trabajar con este linaje celular, es por ello que a continuación se irá definiendo las distintas formas utilizadas por los diversos investigadores, obtenidas por medio de la búsqueda bibliográfica de 59 estudios con sus respectivos análisis.

#### **I. Transporte del cordón umbilical de la zona de obtención al laboratorio**

Dentro la revisión bibliográfica de los 59 estudios, se encontraron sólo dos estudios en donde se enuncia bajo qué condiciones se realizó el transporte del CU del lugar de obtención al laboratorio, se cita: "*Cordones se almacenan a 4°C en 0,9% de solución salina estéril (Suero fisiológico) o salina equilibrada de Hanks para transporte a laboratorio.*"(35); "*Se lavó bien en medio de transporte (PBS) para eliminar la sangre y luego proceder a cortar el cordón.*" (8)

## **II. Lavado del cordón umbilical y/o CMM del cordón umbilical**

Mediante la lectura de los documentos, post recolección, el siguiente paso que se menciona es el lavado de cordón umbilical, en el cual se menciona la utilización de soluciones, que pueden ser solución salina estéril, solución equilibrada de Hanks, o tampón fosfato salino más conocido como PBS.

### **a) Lavado del cordón umbilical y/o CMM con PBS**

El PBS (Ver Figura nº1), es una solución salina equilibrada compuesta de: Cloruro de Sodio, Cloruro de Potasio, Fosfato disódico y Fosfato monopotásico. Se utiliza para una variedad de aplicaciones de cultivo de células, como por ejemplo, células de lavado antes de la disociación, medio de transporte para células, diluir las células para el recuento y para la preparación de los reactivos. PBS se formula sin calcio y magnesio para el enjuague quelantes a partir del cultivo antes de la disociación celular. (47)

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) es muy semejante al líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio y, en algunas formulaciones, con Fosfato de Potasio. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos.



**Figura N°1 “PBS”**

Usos del PBS:

- El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal por lo que es comúnmente usada para lavar células a través de centrifugación.
- El PBS puede ser empleado como diluyente para métodos de desecación de biomoléculas, ya que las moléculas de agua presentes en el PBS se adhieren alrededor de la biomolécula permitiendo inmovilizarla a una superficie sólida. Esta monocapa de agua evita que la biomolécula sea desnaturalizada (o sufra modificaciones conformacionales) en el proceso de desecación. Los amortiguadores a base de carbonatos también son empleados para este procedimiento, aunque con menor éxito.
- También es empleado como referencia espectral para procedimientos de elipsometría por absorción proteica. Esta solución puede ser complementado con aditivos para procedimientos específicos. La adición de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), por ejemplo, permite disgregar células cuando estas forman agregados. La incorporación de Zinc, no obstante, no es recomendada ya que provoca la precipitación de otras sales constituyentes. (48)

En las investigaciones en que los lavados fueron realizados con PBS, expresaron lo siguiente:

En algunos se lavó el cordón umbilical completo, como por ejemplo: *“Todo el cordón se lavó en fosfato estéril solución salina tamponada (PBS)”* (9, 28, 40) e incluso podemos encontrar artículos donde se especifica que dicha acción se realizó dos o más veces: *“El cordón umbilical se lavó con tampón fosfato solución salina (PBS) dos veces.”* (12)

Además hubo un caso particular donde se utilizó PBS pero suplementado con calcio y magnesio llamado Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Ver Figura n°2). El DPBS se puede utilizar para proporcionar un sistema tampón para mantener los medios de cultivo celular en el intervalo de pH fisiológico, para el riego, el transporte, o diluir el fluido mientras se mantiene la tonicidad y la viabilidad celular. Incluyendo el calcio y el magnesio versiones libres para el lavado células antes de la tripsinización. (26, 49)



**Figura N°2 “DBPS”**

También el PBS puede ser utilizado en combinación con antibióticos, como penicilina, estreptomina, etc. *“Se enjuagó en PBS estéril suplementado con 4 mg/ml de anfotericina B, 20 mg/ml de gentamicina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina, se coloca en placa Petri estéril.”* (35)

En algunos el proceso de lavado, fue ulteriormente de haber obtenido las células separadas de todo el tejido excedente.

*“Las células se lavaron dos veces con PBS y se sembraron en placas de cultivo regulares en medio de cultivo fresco, las células no adherentes se descartaron en el día siguiente.” (24) “Las células se enjuagaron una vez en tampón fosfato salino (PBS)” (5, 11, 50) “Después de 48 horas de incubación, las células fueron lavadas con PBS.” (34)*

Solo en uno de los estudios, lo señalado queda a la interpretación del lector, ya que no especifica si dicho lavado es realizado en el cordón o a las células u otra cosa. *“Los sustratos se sumergen en PBS.” (51)*

En algunos estudios se explica que la finalidad de lavado del cordón, tenía como objeto eliminar todo resto de sangre. *“Los vasos sanguíneos se lavaron exhaustivamente con solución de PBS. Los tejidos restantes fueron cortado en pequeños fragmentos (1x1x2mm<sup>3</sup>), que se lavaron por la solución de PBS.” (32); Después de la obtención de los 27 CU, se procesan dentro de las 24 primeras horas, se deben lavar con PBS, previo al retiro de los vasos sanguíneos.” (46); “Las piezas se lavaron 2 o 3 veces usando PBS estéril, para eliminar la sangre. La vena umbilical se lavó con PBS estéril usando una jeringa estéril de 10 ml para eliminar la sangre y coágulos de sangre.” (10)*

El lavado con PBS también podía ser utilizado para diluir, aumentar las concentraciones volumétricas para trabajar con las células o disminuir su viscosidad. *“Las células se lavaron 3 veces mediante dilución con PBS para dar un volumen final de 50 ml por tubo.” (6) “El sobrenadante (Ver Glosario), después se diluyó con PBS para reducir la viscosidad de la suspensión.” (13, 14); “Y se lavó en PBS para obtener suspensiones de células” (52)*

En algunos casos el lavado con PBS ocurrió después de otros procedimientos que se describirán más adelante, como por ejemplo luego de la citometría de flujo (ver glosario), tinciones o centrifugación, entre otros.

*“Las células se lavaron 3 veces en PBS luego de la citometría de flujo.” (18); “Las células teñidas con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) anticuerpo secundario se lavaron 3 veces con PBS.” (18); “Las células teñidas se re-suspendieron en PBS.” (44)*

Además se puede determinar en un caso particular, la empresa que le proveyó el PBS, como Sigma-Aldrich. *“Las células en cultivo se tripsinizaron, se lavaron y se re-suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Sigma-Aldrich; Louis, MO, EE.UU.)” (17)*

#### **b) Lavado del cordón umbilical con solución salina equilibrada de Hanks**

La solución salina de Hanks, es un preparado para usos de laboratorio, análisis, investigaciones y químicas finas. Compuesto por cloruro de sodio, cloruro de potasio, glucosa, sulfato de magnesio heptahidratado, cloruro de calcio dihidrato, fosfato de sodio hidrógeno, fosfato monopotásico y carbonato ácido de sodio.

Esta solución se empleó fundamentalmente post recolección de los cordones, para mantener la viabilidad celular (14, 25, 35) y para evitar el proceso de desecación al momento de manipular el cordón durante la extracción de vasos sanguíneos, como en los siguientes casos: *“Se recogen en solución salina equilibrada de Hanks. Vasos del CU se retiraron cuando aún estaban en solución salina equilibrada de Hanks” (36); “Los cordones umbilicales humanos se recogieron en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) a 4 ° C. Después de la desinfección en etanol al 75% durante 30 segundos, los vasos del cordón umbilical se despejaron fuera cuando aún estaba en HBSS.” (42).* También hubieron casos en donde se utilizó esta solución como medio para transportar los cordones *“Cordones se almacenan a 4°C en 0,9% de solución salina estéril*

*o salina equilibrada de Hanks para transporte a laboratorio” (35) incluso en una investigación le agregaron antibióticos a la solución “Los cordones umbilicales fueron transportados al laboratorio en solución salina equilibrada de Hanks que contiene 1% de penicilina/estreptomicina”. (52)*

### **c) Lavado del cordón umbilical y/o CMM con solución salina estéril**

Tanto como el PBS y la solución de Hanks, son soluciones salinas, por ellos es importante determinar que la solución salina estéril que se hace alusión en este acápite es al suero fisiológico o también conocido como cloruro de sodio al 0,9%.

En comparación con las otras soluciones, esta es la menos empleada, de hecho solo se dividió en 6 investigaciones, siendo ocupada de manera similar que las anteriores soluciones. *“Posterior desinfección con etanol al 75% durante 30 segundos. Cordones se almacenan a 4°C en 0,9% de solución salina estéril... para transporte a laboratorio” (35); “El cordón se enjuagó varias veces con solución salina estéril.” (23, 53); “La sangre del cordón se lavó con solución salina fisiológica, la vena y las arterias umbilical se eliminaron” “Después de la filtración, las suspensiones de células se centrifugaron con un tubo de centrífuga de 50 ml durante 3 min a 728 xg, descargando el sobrenadante y lavar con solución salina normal 4°C. El procedimiento se repitió.” (22); “[...] asépticamente almacenado en solución salina estéril y procesada dentro de 6 horas de parto.” (4, 5)*

### **III. Extirpación de los vasos sanguíneos del cordón umbilical**

A continuación algunos investigadores, procuraron sacar los vasos sanguíneos, ya que como se explicó anteriormente, las células madre mesenquimáticas no producen factores hematopoyéticos, por ende si se mantienen los vasos sanguíneos, puede alterar el resultado, debido a que en la citometría de flujo,

procedimiento que explicaremos más adelante, se expresarán dicho marcadores no correspondientes a CMM. De hecho, en dos estudios deja en manifiesto dicho fin, expresando “*Posteriormente, los vasos sanguíneos fueron eliminados para evitar la contaminación de las células endoteliales.*” (10); “[...] *evitar contaminación de glóbulos rojos [...]*”. (54)

Este proceso, podemos verlo reflejado de 3 maneras, las investigaciones que solo mencionan que retiraron los vasos, las que explican cómo lo hicieron y las que no enuncian nada al respecto. Con respecto a último, existe cierta cantidad de investigación donde no se hace alusión a este procedimiento, lo que deja la interrogante si este se realizó y se omitió o realmente no se hizo.

Los estudios que explican cómo se prosiguió con esta acción, se encuentran a continuación: “*Se elimina arterias y vena, mediante disección en roma, tejido de cordón umbilical restante (incluye Gelatina de Wharton) fue cortado en cubos de 0,5 cm<sup>3</sup>.*” (35); “*Los vasos sanguíneos se eliminaron manualmente*” (23, 39, 46, 53); “*Arterias y venas fueron quirúrgicamente eliminadas para evitar contaminación de glóbulos rojos, se obtuvieron explantes de gelatina de Wharton, estos fueron diferidos en colagenasa tipo I y tripsina (Ver glosario).*” (54); “*El cordón se cortó a lo largo del eje horizontal y se retiraron los vasos sanguíneos.*” (33); “*Aproximadamente 6 cm del cordón fue disecado para obtener arterias, vena, gelatina de Wharton y cordón de revestimiento.*” (28) Es importante recordar que como se vio en el título anterior de soluciones, algunos vasos fueron retirados aun cuando permanecían en dichas soluciones. (36, 42) El resto de los estudios únicamente comentaron su realización. “*Arterias y vena umbilicales se retiraron.*”(4-7, 15-18, 22, 34, 44, 50, 52)

Cabe señalar que hay estudios donde al mismo tiempo que se retiraron los vasos sanguíneos se eliminó o despojó de la membrana o epitelio amniótico por el cual está envuelto el cordón umbilical. “*La membrana fue despojada del cordón umbilical, y los vasos sanguíneos del cordón umbilical (dos arterias y*

*una vena) se eliminaron para retener la gelatina de Wharton.” (22); “La gelatina de Wharton fue aislada de los cordones umbilicales después de disección y la eliminación de las arterias umbilicales, vena y epitelio amniótico.” (38)*

#### **IV. Disección del cordón umbilical**

Ya habiendo limpiado todo el cordón umbilical, se prosigue con el corte de este, o en ciertos casos particulares, el raspado de este, todo esto no solo con el fin de aminorar el tamaño del cordón umbilical, el cual el tamaño de la muestra puede ser bastante variado y en ningún de los documentos ha sido señalado el tamaño real que se obtuvo de la muestra inicial, sino también para exponer la gelatina de Wharton a los diversos medios o procesos y también facilitar la acción enzimática que se realiza posteriormente.

Si clasificamos los estudios, podemos dividirlos en 3 secciones, la primera según tipo de corte pudiendo ser longitudinal o cúbico, según tamaño del corte y según instrumental ya que están las disecciones realizadas con tijeras y bisturí, la cual no se utilizará para explicar los datos obtenidos de esta revisión, debido a que solamente un estudio señala haber usado tijeras para cortar el cordón umbilical y porque no todas las investigaciones comentan que instrumental se utilizó. También podemos agregar una cuarta clasificación considerando como se ha dicho en el párrafo anterior como disección al raspado del tejido.

##### **a) Cortes cúbicos del cordón umbilical según tamaño:**

Según lo revisado en los estudios tenemos cortes cúbicos, de  $1-2\text{mm}^3$ ,  $2-3\text{mm}^3$ ,  $0,5\text{cm}^3$  a  $1\text{cm}^3$ .

- **Cortes cúbicos del cordón umbilical de 1 a 2 mm<sup>3</sup>**

*“Se corta en trozos de 1 a 2 mm<sup>3</sup>.” (26, 52); “Sus compartimentos se pica manualmente en fragmentos pequeños 1 - 2 mm<sup>3</sup> sembrado en placas de cultivo de tejidos tratados.” (50); “Otras porciones de las muestras del cordón umbilical se cortaron en pequeños fragmentos (1x1x2 mm<sup>3</sup>).” (32); “La gelatina de Wharton fue procesada dentro de las 24 horas de recogida y se corta en trozos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup> para el cultivo.” (17, 22)*

- **Cortes cúbicos del cordón umbilical de 2 a 3 mm<sup>3</sup>**

*“Los cultivos fueron obtenida de cada región que se pesó, cortados en trozos pequeños (~2mm<sup>3</sup>) con un bisturí estéril.” (28); “[...] los cordones se cortaron en 2 a 3 mm<sup>3</sup>.” (39)*

- **Cortes cúbicos del cordón umbilical de 0,5 a 1 cm<sup>3</sup>**

*“El tejido mesenquimal fue cortado en cubos de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup>.”(15, 16, 35, 42); “Tejido mesenquimal en gelatina de Wharton fue cortado en cubos de 0,5 a 1 cm<sup>3</sup> [...]” (36); “[...]luego con unas tijeras en diseccionado en piezas de aproximadamente 1cm<sup>3</sup> en el volumen.” (12)*

**b) Cortes longitudinales del cordón umbilical según tamaño:**

- **Cortes longitudinales del cordón umbilical de 1,5 cm**

*“Luego se corta en piezas más pequeñas de longitud de 1,5 cm.” (8); “Cortado en trozos pequeños (aproximadamente 1,5 cm de longitud), que se seccionaron longitudinalmente finalmente para exponer la gelatina de Wharton por debajo de la membrana amniótica.” (40)*

- **Cortes longitudinales del cordón umbilical de 2 a 3 cm**

*“Luego se corta en 2-3 cm de longitud [...]”* (34)

*“Una porción del cordón umbilical se corta en segmentos de aproximadamente 3 cm de largo.”* (6)

- **Cortes longitudinales del cordón umbilical > o igual 4cm**

*“Piezas de cordón, de 4 a 5 cm de largo, estaban diseccionado retirando primero el epitelio de la CU sección a lo largo de su longitud para exponer el Gelatina de Wharton subyacente.”* (13)

*“Se cortó en secciones de aproximadamente 5 cm.”* (10, 33)

- **Otras circunstancias encontradas en relación al corte del cordón umbilical**

*“Se cortaron longitudinales de 2 a 4 cm [...]”* (23) En este mismo estudio además pasó por otro proceso de disección luego de la acción enzimática, en el cual el tejido se trituró con una pinza para liberar las células individuales de CMM de cordón umbilical y se eliminaron grandes piezas de tejido.

Otras sólo se menciona que el cordón umbilical se diseccionó sin especificar medida exacta, o solo haciendo alusión que fue realizado con suavidad, o en pequeños trozos. (9, 37, 38, 46)

En uno de los estudios, no explica cuál fue el eje de corte de cordón, o que instrumento fue el que utilizó, sólo que se diseccionó el cordón en tamaños pequeños *“[...] el tejido mesenquimal expuesto se corta en trozos muy pequeños o explantes, aprox. 1-2 mm, antes de colocarlos en una placa de cultivo de tejidos.”* (53)

### **c) Raspado de la Gelatina de Wharton**

*“[...] el tejido mesenquimal se raspó de la gelatina de Wharton con un bisturí [...]” (7)*

*“Cordones fueron diseccionados por el corte en el epitelio de la sección de cordón umbilical para exponer la gelatina de Wharton subyacente. Cada recipiente, con su matriz gelatina de Wharton circundante, se diseccionó a cabo utilizando bisturís y los extremos de cada recipiente diseccionado atados juntos con una sutura para formar un corte helicoidal, de la que se recogieron las células perivasculares. Las células en la gelatina de Wharton que rodea se rasparon del tejido y se recogen en un tubo separado y se denominan células de la gelatina de Wharton.” (14)*

### **V. Acción enzimática en el tejido mesenquimático para su disgregación**

Un paso importante para la obtención de células y posterior cultivo celular es aislar células de un mismo tipo a partir de un tejido conformado generalmente por células de diversos tipos. Este paso consiste en separar la matriz extracelular, la cual está compuesta por diferentes tipos de moléculas, entre las cuales se pueden encontrar los proteoglicanos, polisacáridos como el ácido hialurónico, y proteínas como el colágeno, laminina, fibronectina, fibrina y elastina, que mantiene unidas a las células. Para lograrlo, la muestra de tejido es tratada con diversas enzimas proteolíticas como tripsina y colagenasas que degradan las proteínas de la matriz. También se utilizan agentes como EDTA que secuestran al ión calcio, del cual depende la adherencia celular.

De esta manera y con ayuda de una suave agitación, se logra obtener una suspensión celular que contiene a todas las células existentes en el tejido tratado enzimáticamente. (55)

Cuando se habla de acción enzimática en esta revisión, se hace referencia al uso principalmente de dos enzimas, colagenasa y tripsina, ambas utilizadas en las distintas investigaciones con la finalidad de disociar las células madre mesenquimáticas de todo el excedente, ya sea de su matriz extracelular, epitelio amniótico y/o algún resto de células endoteliales de los vasos sanguíneos propios del cordón y desadherir a las células adherentes de los matraces. Cabe destacar que también hubo casos donde dichas enzimas fueron complementadas con otra enzima llamada hialuronidasa, siendo sólo unos pocos casos u otro complemento EDTA, con el objeto de potenciar el efecto disociativo.

Las condiciones y forma de utilización, es variada entre las publicaciones, siendo lo más similar entre ellas la temperatura en la cual actuó la digestión enzimática, siendo de 37°C.

Además una de las investigaciones hace entrever la diversas de formas que es empleada la digestión enzimática, muy similar a lo que podemos observar en la revisión de los diversos artículos. *“Las enzimas utilizadas para la digestión varían desde la simple colagenasa a una combinación de colagenasa e hialuronidasa con o sin tripsina o colagenasa, dispasa II e hialuronidasa. El tiempo de digestión y las concentraciones variaron según investigadores.”* (50)

También se hace alusión al uso de suero bovino fetal (SFB) post la digestión enzimática con el motivo de inactivar acción producida por las enzimas y así evitar un exceso de disociación que puede llevar a la muerte celular de las células. Un ejemplo de esto es: *“Después del tratamiento enzimático, las células se suspendieron en 10% de SFB.”* (17)

### a) Utilización de la colagenasa en la acción enzimática

En las investigaciones se encontró la utilización de tres tipos de colagenasa: colagenasa I, colagenasa II y colagenasa IV. Pero cabe la excepción de algunas publicaciones donde no queda detallado el tipo de colagenasa usada. “*“Loops fueron tratados con solución de colagenasa 1mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en HBSS a 37 ° C durante 4 horas.”* (6, 13, 14, 16, 24, 39, 41)

También se expresa las marcas comerciales en variadas de las investigaciones, Sigma y también la utilización de la marca Gilbo (14), un ejemplo de esto podemos observar en siguiente enunciado: “*Cada corte helicoidal, con su matriz gelatina de Wharton circundante, ... y se incubaron en un 0,5 a 0,75 mg/ml de colagenasa (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) con PBS (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.) solución durante 18 horas.”* (4, 5, 9, 13, 14, 26)

Se puede ver la diferencia horaria en que se dejó actuar dicha enzima, en relación a la cantidad de colagenasa administrada, el uso complementario de otra enzima, como en los siguientes enunciados: “*Gelatina de Wharton se dirigió con colagenasa 10 mg/ml (37°C durante 4 horas)”*. (39); “*Después se incubaron con una mezcla de 0,26% de colagenasa tipo I y 0,07% de hialuronidasa durante 2 horas.”* (52) Pudiendo concluir que a mayor cantidad de colagenasa utilizada, los tiempos de acción se reducen ampliamente, de igual manera ocurre al combinar con otras enzimas.

#### ○ **Colagenasa I**

“*La gelatina de Wharton se cortó en trozos pequeños con tijeras, luego se trató con colagenasa tipo 1.”* (18)

“*[...] se incubaron en 0,1% colagenasa tipo I [...].”* (19)

*“El tejido picado se lavó dos veces DPBS y se sometió a digestión secuencial con colagenasa I. Dicho tejido se incubó con 12,5 U/ml colagenasa I durante 12 horas a 37°C en baño de agua agitando.” (G2)*

*“Las muestras se digirieron enzimáticamente durante 1 hora a 37 ° C con 3 mg/ml de colagenasa tipo I.” (26)*

- **Colagenasa II**

*“Se digirió con 0,9 mg de colagenasa tipo II /gramo tejido (Sigma, C6885) a 37 ° C durante una hora”. (9)*

- **Colagenasa I y IV**

*“La gelatina de Wharton se coloca boca abajo en una placa de Petri que contiene una solución enzimática 1,5 ml de colagenasa tipo I y colagenasa tipo IV.” (8)*

### **b) Utilización de la tripsina en la acción enzimática**

A diferencia de la colagenasa, la tripsina no solo se usa para disociar sino también para desadherir las células madre mesenquimáticas de la placa Petri o matraces, ya que estas células son altamente adherentes al plástico.

Con el objeto de poder separar y traspasar las células a otros matraces para aumentar cultivo celular, es decir poder expandirlas para alcanzar mayor número de células, se utiliza tripsina ya que por lo general, al emplear esta enzima, se espera alcanzar una gran confluencia de las células.

*“Al final del segundo semanas el matraz confluyente se sometió a pases por 0,05% de tripsina.” (33, 53)*

*“Se separaron las células adherentes (paso 0) con 0,125% de tripsina y se pasaron en el cultivo celular.” (12, 52)*

*“Se dirigieron células madre mesenquimales humana umbilical con 0,25% de tripsina y luego se sembraron en frascos de cultivo a una concentración de  $2 \times 10^5$  /  $cm^2$  en medio neurobasal, suplementado con 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico.” (36)*

*“Las células se trataron con tripsina a 37 ° C durante 5 minutos con tripsina al 0,25% (15090-046, Gibco), y las células disociadas se resuspendieron en PBS.” (25)*

*“Se digiere adicionalmente con 2,5% de tripsina (Gibco 15090-046) en 37°C durante 30 min.” (15, 16)*

*“Las células adherentes y fragmentación de tejido se enjuagan una vez con PBS y se separan mediante una solución de tripsina, seguido de lavado con el medio.” (50)*

*“Cultivos celulares se tripsinizaron usando tripsina a 37°C durante 8 minutos.” (54)*

- **Tripsina y EDTA**

*“Células adherentes se separaron usando una solución de tripsina/ EDTA.” (39)*

*“Después de alcanzar 70% a 80% de confluencia, las células adherentes se recogieron con tripsina por 0,05% de tripsina-EDTA (Gibco, Alemania); una suspensión de células se utilizó para experimentos posteriores.” (44)*

*“Cuando las células adheridas alcanzaron el 80% y el 90% de confluencia, / se añadió tripsina EDTA de digerir y el paso de las células. Para terminar la digestión, seguido por 2,5 g/l de tripsina, y 5 min de centrifugación a 840 xg*

*durante 5 minutos y lavar dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). ” (22)*

*“Las células fueron disociadas de solución de tripsina-EDTA, cuando llegaron a 80% -90% de confluencia. Las células adherentes se eliminaron mediante tratamiento con tripsina al 0,25% durante 3 a 5 minutos, después se centrifugó.” (17)*

*“Al 90% de confluencia, las células fueron cosechadas con 0,25% de tripsina con EDTA (Gibco) y se pasa a un nuevo matraz de expansión.” (29, 43, 45, 56)*

*“Las células se separaron usando tripsina (0,25% w/v) y EDTA (0,02% w/v) en PBS (1:1 v/v).” (22, 46)*

*“En 90% confluencia, las células se cosecharon con tripsina al 0,25% con EDTA (Gibco) y una suspensión de 1000 células/l se preparó en jeringas de insulina para facilitar el procedimiento quirúrgico.” (29)*

*“Para el subcultivo, las células fueron separadas y se disociaron usando tripsina (500 mg/ml) EDTA (200 mg/ml) solución.” (10)*

### **c) Uso en conjunto de la tripsina y la colagenasa en la acción enzimática**

A pesar de que los estudios mencionan la utilización de ambas enzimas, es decir tripsina y colagenasa, de por sí no actúan en conjunto, siendo el uso de una primero y luego de otra.

*“[...] se obtuvieron explantes de gelatina de Wharton, estos fueron diferidos en colagenasa tipo I y tripsina.” (54)*

*“Tejidos gelatina de Wharton se aislaron del cordón umbilical y luego se digirieron con colagenasa y tripsina” (24)*

*“La matriz extracelular de WJ se raspó, tratados con 2 mg/ml de colagenasa IV (Sigma) durante 16 horas a 37 ° C y luego con 2,5% de tripsina durante 30 minutos a 37 ° C, bajo agitación.” (4, 5)*

*“Después se trataron con colagenasa (2 mg/ml) durante 16 horas a 37 ° C, se lavaron, y se trataron con 2,5% de tripsina durante 30 minutos a 37 ° C con agitación.” (7)*

*“Después de la aspiración de la fracción sobrenadante, el precipitado (tejido mesenquimal) se trató con colagenasa a 37 ° C durante 18 horas, se lavó, y se digiere adicionalmente con 2,5% de tripsina a 37 ° C durante 30 minutos”. (42)*

#### **d) Otras variantes encontradas en relación al empleo de acción enzimática**

- Hialuronidasa, Tripsina y Colagenasa: *“El tejido se sumergió en un cóctel de enzimas (hialuronidasa, tripsina, y colagenasa) durante 45 a 60 minutos a 37 ° C.” (23)*
- Hialuronidasa y Colagenasa: *“Aislamiento MSC de WJ era alcanzado ya sea por disociación mecánica de generación de explantes de tejido de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup> disociación enzimática con colagenasa I y hyaluronidase para la generación de sedimentos celulares Gelatina de Wharton.” (38, 52)*
- Colagenasa, Tripsina y Ácido etilendiaminotetraacético: *“El precipitado fue disociado enzimáticamente durante 30 minutos a 37 ° C usando 0,075% de colagenasa tipo II, seguido por digestión con 0,123% de tripsina/ácido etilendiaminotetraacético a 37°C durante 30 minutos.” (36)*
- Colagenasa, Tripsina y EDTA: *“Aislamiento de células HUMSCs se realizó mediante el uso de colagenasa tipo I y una solución de 0,5 g/l de tripsina y 0,2 g/l EDTA” (40); “Fragmentos se*

*seccionaron longitudinalmente y se trataron enzimáticamente con colagenasa, tripsina y EDTA.” (41)*

- *Tripsina y Ácido etilendiaminotetraacético: “Células alcanzan 80-90% confluencia se separan por incubación con 0,1% de tripsina + 1,0 mmol/L ácido etilendiaminotetraacético en PBS durante 3 minutos.” (35); “Alcanzó el 70% de confluencia, por lo general dentro de 1 semana, eran tripsinizaron con 0,05% de tripsina / 0,025% ácido etilendiaminotetraacético en preparación para el subcultivo.” (37)*

## **VI. Centrifugación de CMM**

La centrifugación es una técnica de separación que se utiliza para aislar o concentrar partículas suspendidas en un líquido haciendo uso de la diferencia de velocidad de desplazamiento según su forma, tamaño o peso al ser sometidas a una fuerza centrífuga.

La fuerza centrífuga es la que se ejerce sobre un cuerpo cuando éste gira alrededor de un eje. Esta fuerza, cuya magnitud es directamente proporcional a la masa del cuerpo, el radio de giro y la velocidad de giro (angular), es perpendicular al eje y tiende a alejar el cuerpo del mismo. La fuerza centrífuga puede acelerar el proceso de sedimentación de partículas que tienen tendencia a hacerlo espontáneamente (densidad superior a la del líquido), o en aquellas que tienden a flotar (densidad inferior a la del líquido). En este sentido, la tecnología actual permite llegar a fuerzas de centenares de miles de veces la fuerza de la gravedad ‘1g’ es aproximadamente la fuerza centrífuga generada por un rotor (Ver glosario) de 25 cm de radio girando a una revolución por segundo). (57)

La centrifugación se puede llevar a cabo a escala preparativa o escala analítica. La primera se utiliza para aislar partículas para utilización posterior y la segunda permite determinar propiedades físicas como la velocidad de sedimentación o el peso molecular.

La centrifugación preparativa se utiliza para separar partículas según la velocidad de sedimentación (centrifugación diferencial), la masa (centrifugación zonal) o la densidad (centrifugación isopícnica). En el primer caso se obtiene un líquido sobrenadante y un material sedimentado. En los otros dos casos las partículas se distribuyen en fracciones de diferentes densidades de un fluido líquido (centrifugación mediante un gradiente de densidades).

Las partículas se pueden separar en función de la velocidad de sedimentación (centrifugación diferencial), la masa (centrifugación zonal) o la densidad (centrifugación isopícnica). La centrifugación zonal y la centrifugación isopícnica constituyen ejemplos de centrifugación mediante un gradiente de densidades. (58) También podemos clasificar a la centrifugación según el rango de velocidades.

Para realizar este proceso es necesario tener una centrífuga (Ver Figura nº3), la cual consta de un motor, un rotor adaptado especialmente para poner tubos de muestra y un compartimento donde está alojado el motor para aislarlo del exterior. Cuando la velocidad de giro es muy elevada, este compartimento es totalmente estanco y se refrigera para poder trabajar al vacío y evitar el calentamiento del rotor. Por otro lado, este recinto suele estar blindado para evitar accidentes en caso de rotura del rotor. (59)



**Figura N°3 “Centrífuga”**

Debido a su aplicación, en este caso separar las células, en las investigaciones revisadas se realiza una centrifugación del material obtenido, con el fin separar las células viables de las no viables, dejando adheridas al plástico el pellet (Ver glosario) con las CMM vivas de aquellas que por los distintos procedimientos han perdido su vitalidad o no son CMM en el sobrenadante. Usando una centrifugación de tipo escala preparativa.

Las investigaciones que hacen mención a este proceso, particularmente lo realizan para separar la mayor cantidad de células madre mesenquimáticas del sobrenadante, generalmente post acción enzimática. *“Fragmentos se seccionaron longitudinalmente y se trataron enzimáticamente con colagenasa, tripsina y EDTA. Se recogieron por centrifugación y se expandieron en medio de cultivo”* (41)

La velocidad de centrifugación empleada al igual que en todos los demás aspectos del procesamiento, tampoco existe un criterio en común entre los investigadores ya que se utilizan distintas rotaciones por minuto (rpm), por ende diversos tiempos de acción. *“Después de dilución en PBS suspensiones celulares se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos.”* (35). *“Células mesenquimales se recuperaron, se centrifugó a 1000 g durante 30 minutos.”* (39). *“Se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos.”* (25). *“Los sobrenadantes se recogieron y se centrifugaron a 2000 g durante 20 min para eliminar los desechos.”* (60). *“Las células lavadas se centrifugaron a 700 g durante siete minutos y se sembraron en Matracas T25.”* (13). *“El WJSC se recogieron a*

*continuación, en recipientes estériles de 15 ml, se centrifugaron los tubos para 300 g durante 10 min” (8).*

## **VII. Incubación de las CMM**

La parte más esencial durante el procesamiento es la incubación, ya que el crecimiento celular depende de las condiciones en las que se realice, siendo fundamental proporcionar un ambiente óptimo para las células. Puesto que, el mantenimiento y crecimiento de las células vivas en los laboratorios requiere recrear dicho ambiente de soporte vital y evitar las influencias dañinas, como contaminación de microbios y estrés mecánico. Las células crecen normalmente en un medio de crecimiento, manteniéndolas en incubadoras para cultivo celular con temperatura constante, humedad y mezcla de gases.

Dicho ambiente dentro de las investigaciones empleadas en esta revisión, está conformado una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. (4, 5, 8, 10, 12, 16, 18, 22, 23, 26, 28, 32-35, 37, 38, 43-45, 51, 54, 56, 61)

Además como se explicó es necesario incubarlas en un medio cultivo que entregue los nutrientes que favorezcan su crecimiento y multiplicación. Este medio de cultivo se cambia con cierta frecuencia, según los requerimientos del cultivo celular. Uno de los medios más utilizados es el DMEM, que contiene 1000mg/l de glucosa, además componentes adicionales como aminoácidos y vitaminas. En ciertas oportunidades este medio es complementado con suero bovino fetal al 10%.

Un método para comprobar la vitalidad de las células, es a través de la microscopía óptica, pero este a su vez puede influir en la etapa de incubación, ya que producto de la necesidad de sacar el cultivo de la incubadora para su

observación, puede ocurrir efectos adversos como cambios drásticos de temperatura o pH, que deben tratar de evitarse. (62)

### **VIII. Tinción de las CMM con Azul de Tripán**

En ocasiones los investigadores utilizan la tinción con azul de tripán para realizar el conteo celular a través de la microscopía óptica. (4, 5, 9, 12, 46, 52) Dicho colorante también llamado azul diamina, azul niágara o azul vital, es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir tejidos y células muertas. Por ende este colorante es uno de los más empleados para evaluar la vitalidad celular por exclusión de captación, ya que las células que se encuentran vivas no puede ser teñidas con colorante, debido a que éste no puede penetrar en la membrana celular de las células por encontrarse íntegras, permitiendo así en el conteo diferenciar las células vivas de las muertas.

Para llevar a cabo lo anterior, es imprescindible realizar una mezcla de la suspensión celular con la solución de azul de tripán al 0,4%.

Como dato anecdótico su nombre se deriva de su capacidad para matar a los tripanosomas, parásitos causales de la Enfermedad de Chagas.

### **IX. Recuento celular de CMM**

Para el conteo de las células es de utilidad como se dijo en el ítem anterior la tinción con azul de tripán, pero para ello también es indispensable otro elemento llamado hemocitómetro de Neubauer (Ver Figura nº4), el cual es un portaobjetos especializado que cuenta con una retícula conformada por múltiples divisiones de cuadrados de tres distintos tamaños. Primero se encuentra seccionada por 9 cuadrados de  $1 \text{ mm}^2$ , dentro de estos se hayan 16

cuadrados de  $0,0625 \text{ mm}^2$  y al interior de estos últimos 16 se encuentra 25 cuadrados más de  $0,04 \text{ mm}^2$ , que están grabados con láser, es importante señalar que el cuadrado del centro que conforma a los primeros 9 cuadrados, se halla más aún dividido que el resto, puesto que tiene cuadrados más pequeños de solo  $0,0025 \text{ mm}^2$ . Estas divisiones permiten contar según cuadrante. (63)

Actualmente existen otros métodos más tecnológicos que facilitan el recuento, como software diseñado para ello, como ejemplo el software Cell-P de la empresa Olympus.



**Figura N°4 “Hemocitómetro de Neubauer”**

**X. Citometría de flujo para el análisis de marcadores de superficie celular de las células madre mesenquimáticas**

La citometría de flujo representa un método rápido objetivo y cuantitativo de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz.

Para su análisis por citometría de flujo, las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido. Las células sanguíneas pueden analizarse prácticamente de manera directa, las células de tejidos sólidos deben primero dispersarse. (64)

Las aplicaciones de la citometría de flujo son numerosas, lo cual ha permitido el empleo de estos instrumentos de manera amplia en los campos, tanto de la investigación biológica como médica.

Esta revisión brinda un panorama general de los principios básicos de la citometría de flujo y la muestra como una herramienta reproducible y aplicable a una gran variedad de campos médicos, así como su empleo en el campo de las enfermedades pulmonares.

En gran parte de los estudios se realizó citometría de flujo, en donde se citarán a continuación sólo algunos de ellos.

*“Un millón de células de cada población estaba utilizado para citometría de flujo. Las células se tiñeron directamente con (ficoeritrina) anticuerpos conjugados contra CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD90, HLA-DR, CD105 y CD73”.* (28)

*“Por el análisis de citometría de flujo y la tinción doble con yoduro de propidio y Calcein-AM antes y después de la criopreservación”.* (65) *“Análisis de citometría de flujo de marcadores de superficie celular MSC”.* (3) *“Se caracteriza célula mediante citometría de flujo, las células mesenquimáticas en cultivo se trataron con tripsina, se lavaron y resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato”.* (35). *“Identificación de células madre mesenquimales umbilicales humanas por análisis de inmunofluorescencia y citometría de flujo de tinción se describe en nuestros estudios anteriores”.* (36)

## **XI. CMM expuestas a rayos UV (Ultravioleta)**

Se denomina radiación ultravioleta o radiación UV a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 400 nm ( $4 \times 10^{-7}$  m) y los 15 nm ( $1,5 \times 10^{-8}$  m). Su nombre proviene de que su rango de radiación, que empieza desde longitudes de ondas más cortas

que los humanos identificamos como el color violeta. Esta radiación es parte integrante de los rayos solares y produce varios efectos en la salud.

De los estudios revisados, tan sólo 3 de los documentos señalan la exposición de las células madre derivadas del cordón umbilical a los rayos ultravioleta, en donde se utilizó rayos UV para fijar la lámina de poliacrilamida para que ésta después pueda ser incubada según protocolo. A continuación se cita lo siguiente:

- *“Después de la exposición a la luz UV durante 10 minutos dos veces seguidas, la lámina de poliacrilamida se lavó dos veces y se incubó con una solución de colágeno tipo I (0,2 mg / ml) durante la noche a 4 ° C”.* (51)

También se utilizó para la exposición de cultivos tratados con nitrato de plata al 1%. Se cita lo siguiente:

- *“Los cultivos se trataron a continuación con solución de nitrato de plata al 1% y se expusieron a luz UV durante 45 min”.* (46)

Por otro lado, la luz UV se utilizó como medio de fotografía:

- *“El DNA amplificado se separó por electroforesis a través de un gel de agarosa al 1%, se tiñeron, y se fotografió bajo luz ultravioleta”.* (7)

## **XII. Utilización de PCR para la búsqueda de expresión de genes específicos dependiendo de la investigación**

PCR es una sigla que en inglés significa *“polymerase chain reaction”* y su traducción su significado es *reacción en cadena de polimerasa*. Es una técnica desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número

de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

La PCR en tiempo real (RT-PCR o qPCR) es una variante de la PCR, utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN), dicho en otras palabras, es empleado para verificar la presencia de algunos genes según el interés de la investigación. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, que permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos.

Los resultados de la PCR en tiempo real se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADNc en estudio. Para obtener estos resultados, los valores umbral de ciclo (Ct) deben ser obtenidos. Anteriormente, un umbral adecuado debe ser fijado de forma automática (por el software) o manualmente (por el operador). Los valores Ct son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido. Es importante considerar que un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos. En la actualidad hay software que puede determinar valores Ct mediante un análisis

matemático de la curva de crecimiento pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en las pruebas de PCR a tiempo real. (66)

De todos los estudios revisados, la gran mayoría presenta utilización de PCR con diferentes sistemas y tecnologías de máquinas para PCR.

A continuación se puede observar las citas de diversos estudios que trabajan con células madre mesenquimáticas derivadas del cordón umbilical y que utilizan sistema PCR:

- *“La expresión de Runx2, osteocalcina y colágeno tipo I después de 14 días de cultivo en tres diferentes sustratos se determinó posteriormente por el tiempo real PCR (Ensayos de IDs: Hs00231692\_m1, Hs01587814\_g1, Hs00164004\_m1, Applied Biosystems) utilizando un 7500Fast Tiempo real PCR System (Applied Biosystems)” (51)*
- *“PCR se realizó usando la enzima Selección PCR Kit - alta especificidad siguiendo del fabricante instrucciones: 2 l de ADN molde, 0,5 l de los cebadores mezclar (200 nM concentración final) y 22,5 l de la Platinum Super Mix se mezclaron” (11)*
- *“Para validar la resultados de microarrays, se realizó en el análisis QRT-PCR tres regulada hacia abajo (p53, HSPE1 y HIST1H3C) y tres genes regulados arriba (IL1B, CREBBP y LYN) como evidenciado por los experimentos de microarrays, utilizando el servicio de limpieza GAPDH gen como control interno para normalizar las expresiones relativas de genes diana”.(4)*
- *“La detección de los productos de amplificación de PCR se realizó mediante el fraccionamiento por tamaño el 2% electroforesis en gel de agarosa. Para verificar la presencia de las células fetales en estos cultivos, RT-PCR se realizó para identificar Sry (región determinante del*

sexo gen Y) mRNA. El ARNm total fue extraído a partir CD105 (+) / CD31 (-) / KDR (-) células derivadas de CU de hijos varones” (46)

- *“Expresiones transcripcional de GATA-4, c-TNT,  $\alpha$ -actina, y Cx43 genes se determinaron mediante PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Transcripción niveles se normalizaron al nivel GAPDH humano correspondiente. Después de la diferenciación miocárdica, PCR en tiempo real mostró que los genes de miocardio GATA-4, c-TnT,  $\alpha$ -actina, y Cx43 se detectan tanto en AFSCs y células diferenciadas WJ-MSc” (17)*
- *“Análisis Q-PCR mostró que la expresión Nurr1 se incrementó alrededor de 40 veces en HUMSCs transducidas con Nurr1 después de 24 horas de modificación. Para caracterizar adicionalmente la inducción Nurr1 mediada por células dopaminérgicas, PCR en tiempo real se utilizó para evaluar las expresiones de genes específicos implicados en la síntesis de dopamina y el transporte”. (25)*
- *“Para confirmar el perfil de expresión génica obtenido por TLDA, un número seleccionado de genes fueron sometidos a análisis cuantitativo y semi-cuantitativos de RT-PCR. Amplificaciones cuantitativas se llevaron a cabo por duplicado utilizando SYBR mezcla maestra verde. Las reacciones de PCR se realizaron en un ABI Prism 7500HT y el software SDS v2.1 se utilizó para analizar los resultados. Todas las mediciones se normalizaron por 18S rRNA. Productos semi-cuantitativos RT-PCR se resolvieron en 1,5 a 2% en gel de agarosa y las densidades de bandas se cuantificaron utilizando el software GeneTools”. (31)*
- *“El tiempo real, análisis de PCR de la muestra se llevó a cabo con la ayuda de F-410 Dynamo HS SYBR mezcla maestra verde utilizando*

*QuantStudio 12 K sistema flex-PCR en tiempo real. Beta actina se utilizó para la normalización de los niveles de expresión génica”.(33)*

Sólo en cuatro documentos de toda la literatura revisada, se menciona sólo que se utilizó PCR en tiempo real. Se permite citar las siguientes citas:

- “Se utilizó PCR en tiempo real”(60)
  
- “Se utilizó PCR” (10, 32, 52, 53)

# Aplicaciones clínicas de las células madre mesenquimáticas

Las células madre han sido estudiadas por su gran capacidad en la utilización a nivel de la medicina regenerativa. Muchas de sus aplicaciones aún se encuentran en investigación, pero se les considera con un futuro prometedor, ya que a partir de la revisión realizada se aprecia como en la mayoría de las publicaciones se sugiere como satisfactorio el estudio experimental realizado en animales.

Hay estudios que señalan una amplia gama de aplicaciones clínicas potenciales, tales como: tejido óseo, cartílago, músculo esquelético y de regeneración nerviosa, se adiciona también el tratamiento de fibrosis hepática, diabetes el tipo 1, válvula del corazón y la reconstrucción de las cuerdas vocales. (38) Se observó también que las CMM del cordón umbilical mostraron citotoxicidad contra glioma (ver glosario) y Sarcoma Kaposi (Ver glosario). Las células madre mesenquimales de cordón umbilical suprimen el crecimiento de células cancerígenas de la mama. (26) Además que las propiedades inmunes que posee, permiten ampliamente el trasplante alogénico. (61)

## ❖ Diferenciación a Condrocitos, Adipocitos y/o Osteocitos

Está demostrado que las CMM de cordón umbilical tienen la capacidad de diferenciación en osteocitos, condrocitos y adipocitos, volviéndose una característica inherente en ellas. La mayoría de los estudios comprueban las células obtenidas, no sólo por la caracterización sino también diferenciándolas en estos tipos celulares.

❖ Diferenciación en tejido perteneciente al sistema músculo-esquelético

Las células son capaces de diferenciarse in vivo hacia el linaje miogénico y contribuir al proceso de regeneración muscular. Se ha demostrado que tienen potencial para la miogénesis en la terapia regenerativa del músculo cardíaco. (29) En contradicción con lo expresado en otro estudio, el cual deja en manifiesto que las células madres derivadas de la gelatina de Wharton no son candidatas ideales para reparación de tejido dañado en corazón por infarto al miocardio, el motivo es que la dificultad de la generación de cardiomiocitos in vitro, tenido así un bajo potencial terapéutico. (14)

En un estudio se comprobó que a las dos semanas de la inyección de células en el músculo tibial anterior, dañado previamente con bupivacaína, el músculo esquelético parecía completamente reparado y células trasplantadas estaban presentes en el músculo. Demostrando que las células son capaces no sólo para diferenciar in vivo hacia linaje miogénico, sino también para contribuir al proceso de regeneración muscular. (21)

La regeneración osteocondral es otra de las aplicaciones estudiadas, puede ser facilitada por las células mesenquimáticas del cordón umbilical, pudiendo ser una fuente de células adecuadas para dicha regeneración. Se utiliza como estrategia poner células intercaladas entre dos capas, actuando como andamio y facilitando la integración de dicho tejido. (56)

❖ Diferenciación a tejido perteneciente al sistema nervioso

Las aplicaciones de las CMM en el sistema nervioso son variadas y trascendentales. De hecho se han propuesto CMM aisladas a partir de diversas fuentes para aplicaciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central (SNC). El trasplante de estas células ha demostrado efectos terapéuticos en isquemia en modelos animales, lesión en médula espinal y Parkinson. El planteamiento de diferenciación en linajes neuronales es para contribuir en la regeneración de células del SNC en modelo de enfermedades neurodegenerativas en animales. La secreción de CMM aislada de gelatina de Wharton del cordón umbilical, también dispone de propiedades para la regeneración del SNC, por ejemplo un incremento en la viabilidad celular y densidades neuronales, las cuales podrían relacionarse con resultados beneficiosos en accidente cerebrovascular. (50)

Se plantea la utilización de este tipo celular para la reparación de lesiones traumáticas en el nervio ciático del tipo de axonotmesis. En un estudio experimental en ratas, se demostró que se puede producir factores de crecimiento o moléculas de matriz extracelular y modular el proceso inflamatorio para mejorar la regeneración del nervio o incluso sustituir el material neural dañado y células de Schwann (Ver glosario), señalando que puede tener efectos positivos en la recuperación funcional de los tejidos, sin la necesidad de inmunosupresores en los animales experimentados. (43)

Hay variadas investigaciones que tienen como propósito comprobar la utilización de células madre del cordón umbilical para el tratamiento del Parkinson, éste corresponde a un desorden crónico y degenerativo de una de las partes del cerebro que controla el sistema motor, se manifiesta con una pérdida progresiva de la capacidad de coordinar los

movimientos, afecta al 1% de la población mayor de 65 años y al 0,4% de la población mayor a 40 años de la población mundial. El trabajo investigativo titulado como *Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells: Preliminary Characterization and Effect of Transplantation in a Rodent Model of Parkinson's Disease*, tuvo como objeto evaluar potencial terapéutico de las células madre del cordón umbilical al trasplantarlas en un modelo de ratas hemiparkinsonianas, es decir, ratas que artificialmente a través de sustancias químicas se le provocó que tuvieran Parkinson. No se considera un estudio estrictamente concluyente, pero si se demuestra que el grupo que recibió dicho trasplante, mejoraron notoriamente su comportamiento rotacional, infiriendo que las células madres mesenquimáticas del cordón umbilical pueden ser terapéuticamente útiles en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central. (23)

En otro estudio, las CMM derivadas de cordón umbilical se aislaron y se transforman en neuronas dopaminérgicas in vitro. Estas fueron trasplantadas en el cuerpo estriado de ratas por lesión estriatal unilateral con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Los resultados indicaron que el trasplante de HUMSCs in vitro diferenciadas, mejora la rotación de la amfetamina-evocado inducida por la lesión en las ratas parkinsonianas, demostrando posibles resultados terapéuticos. (42)

Las células estudiadas expresan marcadores específicos neurogliales, tienen la capacidad de liberar factores tróficos y neuroreguladores que permiten la mejora en la viabilidad metabólica en cultivos de hipocampo, es capaz de promover la supervivencia neuronal y diferenciación en ausencia de suplementos exógenos. (13)

Estudio demostró que la combinación de ciertos factores tiene la capacidad de inducir diferenciación del linaje estudiado en células con características morfológicas de los marcadores de superficie celular de

oligodendrocitos y fenotipo de oligodendrocitos en medio de cultivo celular. Las células madre mesenquimales fetales humanas podrían también diferenciarse en células con un fenotipo de oligodendrocitos tanto in vitro e in vivo mediante la exposición de células madre mesenquimales fetales humanos a medio condicionado con factores que inducen o, también por la introducción de genes pro oligodendrocitos.

Se encuentra demostrado que células estromales derivadas de sangre de CU humano también pueden diferenciarse en células con un fenotipo de oligodendrocitos. CMM pueden ser diferenciadas en oligodendrocitos y células precursoras de estas mismas, pudiendo proporcionar una opción para el tratamiento de la lesión de la médula espinal. Las células precursoras fueron capaces de apoyar la regeneración axonal y la remielinización después de haber sido injertado en médula espinal lesionada. (36)

Cosa similar ocurrió en otro estudio donde se examinaron los efectos del trasplante de CMM del cordón umbilical después de la sección completa de la médula espinal en ratas. Donde la investigación experimental se realizó en cuatro grupos de CMM de cordón umbilical: el primer grupo, no tratadas con ningún medio condicionado; el segundo, tratadas con medio condicionado neuronal (NCM) para tres días NCM-3; el tercero, con NCM-6 y último el grupo de control que no recibió CMM del cordón umbilical. Tres semanas post trasplante, se observó que todos los grupos con HUMSCs tuvieron mejoras en la locomoción. Además esta recuperación fue acompañada por un aumento del número de axones regenerados en el tracto cortico espinal y fibras de neurofilamentos positivo alrededor del sitio de la lesión. Hubo menos microglías y astrocitos en la médula espinal del grupo control. Las HUMSCs trasplantadas sobrevivieron 16 semanas y produjo grandes cantidades de neutrófilos activación de la proteína-2 humana, neurotrofina-3, factor básico de crecimiento de fibroblastos, receptor del factor de necrosis

tumoral inducida por glucocorticoides, y receptor del factor de crecimiento vascular endotelial en el huésped de la médula espinal, que puede ayudar a la reparación de la médula espinal. (16)

En otro estudio, se indujo células madre mesenquimáticas del cordón umbilical en células similares a neuronas in vitro que son capaces de secretar dopamina. Además, se trasplantaron esas células en el cerebro de los monos. Estas células similares a neuronas podrían realizar las funciones fisiológicas de las neuronas dopaminérgicas y pueden desempeñar un papel terapéutico para mejorar los síntomas de la enfermedad del Parkinson. Se cree que los resultados de este estudio podrían servir de base para el desarrollo de la terapia celular en el futuro. (34)

#### ❖ Diferenciación en tejido epitelial

El artículo *Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling*, busca comprobar la posibilidad de re-epitelización de la piel, gracias a los factores paracrinos que expresa el cordón umbilical, para el tratamiento de heridas y pérdida de tejido. (37)

El linaje celular estudiado tienen el potencial de diferenciarse a la mucosa oral y tejido epitelial de la piel a partir de células in vivo, por consecuencia puede considerarse una nueva fuente de células apropiada para el desarrollo de mucosa oral humana y de piel en los protocolos de ingeniería de tejidos. (40)

#### ❖ Células madre en el tratamiento del cáncer de próstata

Las CMM derivadas de CU son capaces de inhibir el crecimiento tumoral y tienen el potencial antitumoral para PC-3, el cual es una línea celular derivada de un tumor de próstata, comercializado por la empresa ATCC. El uso de esta línea celular permitió comprobar la utilidad de las células madre mesenquimáticas de la gelatina de Wharton en el tratamiento del cáncer de próstata. (26)

#### ❖ Células madre en la oftalmología

Un estudio demostró la posible inducción en células progenitoras de la retina pueden ser por las células mesenquimáticas de la gelatina de Wharton. En dicha investigación se utilizó medio acondicionado células madre neural. Se usó el telencéfalo de ratas fetales para inducir diferenciación neural de células madre mesenquimales de gelatina de Wharton. Los resultados muestran que células madre mesenquimales de Jalea de Wharton inducidas y diferenciadas en células bulbosas con numerosos procesos y expresan los marcadores de células progenitoras de la retina. También pueden ser inducidas a diferenciarse en células progenitoras de retina y se pueden usar como células de semillas para el tratamiento clínico de las enfermedades visuales. (35)

La córnea humana se compone de 3 capas principales: epitelio estratificado, estroma subyacente y endotelio corneal monocapa. La homeostasis de epitelial y estromal es esencial para integridad de superficie ocular, transparencia corneal y función visual. La autorenovación de epitelio corneal se da por células madre en región lumbar.

El injerto lumbar de células madre puede ser utilizado para tratar deficiencias del epitelio corneal, esto puede implicar el trasplante directo de tejido lumbar o trasplante indirecto en células en diferentes materiales biológicos o portador sintético vitro expandido. Este enfoque ha demostrado ser sin éxito a largo plazo en comparación con el trasplante autólogo. Se requieren células madre con baja inmunogenicidad tales como: células madre embrionarias, mesenquimales de médula ósea, del folículo piloso, estroma de la córnea, pulpa dental inmadura, mucosa oral célula epitelial, han sido probados experimentales para reemplazo de epitelio corneal. Se demostró que CMM del CU de la gelatina de Wharton pueden ser inducidas a transdiferenciarse en células epiteliales como piel y mucosa oral, el epitelio corneal no se ha explorado hasta la fecha. A pesar de ello, se apoya firmemente que CMM del cordón umbilical, tiene potenciales aplicaciones en oftalmología traslacional y puede aplicarse para reconstrucción de superficie ocular. (41)

❖ Células madre en la urología

El estudio *Renoprotective effect of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in immunodeficient ice suffering from acute kidney injury*, tenía como fin verificar la capacidad de las células madre mesenquimáticas como tratamiento en lesión renal aguda, el cual no logró ser concluyente, dejando en manifiesto que todavía no existe real certeza de que la aplicación de CMM del cordón umbilical pueda mejorar la función renal en los pacientes que sufren de alguna lesión renal aguda, más conocido por nuestro medio como insuficiencia renal aguda. (18)

## ❖ Células madre en el tratamiento de la Diabetes Mellitus

Las CMM de la gelatina de Wharton cuentan con la capacidad y potencialidad de convertirse en células productoras de insulina in vivo e in vitro. La capacidad de este tipo celular ha sido estudiada en una investigación donde las CMM del cordón umbilical fueron diferenciadas con éxito en racimos celulares similares a islotes de Langerhans maduros, que producían insulina. Una de las principales características que las hace competente para esta función, es la rápida disponibilidad y el bajo riesgo de rechazo, convirtiéndolas en células preferentes en convertirse en un linaje productor de insulina. (15) Se ha estudiado la terapia combinada de CMM de gelatina de Wharton y sitagliptina (Ver glosario) puede mejorar efectivamente la hiperglicemia, promoción de la regeneración celular tipo beta de los islotes y suprimir la generación de los islotes alfa en células de ratas diabéticas. Esta última aplicación puede ser considerada como un nuevo tratamiento para la Diabetes Mellitus (DM). (67) Otro estudio de índole similar demuestra que el co-cultivo de CMM derivadas de cordón umbilical con células pancreáticas de rata puede disminuir los niveles de glucosa en sangre en ratas con diabetes mellitus. (46)

En modelos de ratas donde se indujo la diabetes mellitus con estreptozocina (STZ), se observó los efectos de la glucosa en sangres de dichas ratas, luego de trasplantes de racimos celulares, similares a los islotes de Langerhans inducidos en la cápsula renal, en dos grupos, el primero sólo de CMM del cordón umbilical y el otro grupo conformado por un co-cultivo de CMM de cordón más células pancreáticas de ratas. Apreciándose en estas últimas, que las concentraciones péptido C de insulina (Ver

glosario) se incrementó significativamente en comparación con el grupo de cultivo puro. Por lo tanto, el cultivo con CMM del cordón umbilical con células pancreáticas de rata puede disminuir los niveles de glucosa en sangre en ratas con diabetes mellitus. (22)

Tabla resumen de las aplicaciones encontradas en las investigaciones revisadas.

<b>Tema</b>	<b>Número</b>
Ocular	2
SNC	8
Piel y mucosa	2
Cáncer de próstata	1
Muscular	4
Renal	1
Diabetes	4

# Anexos

## Anexo 1: Estrategia de revisión bibliográfica

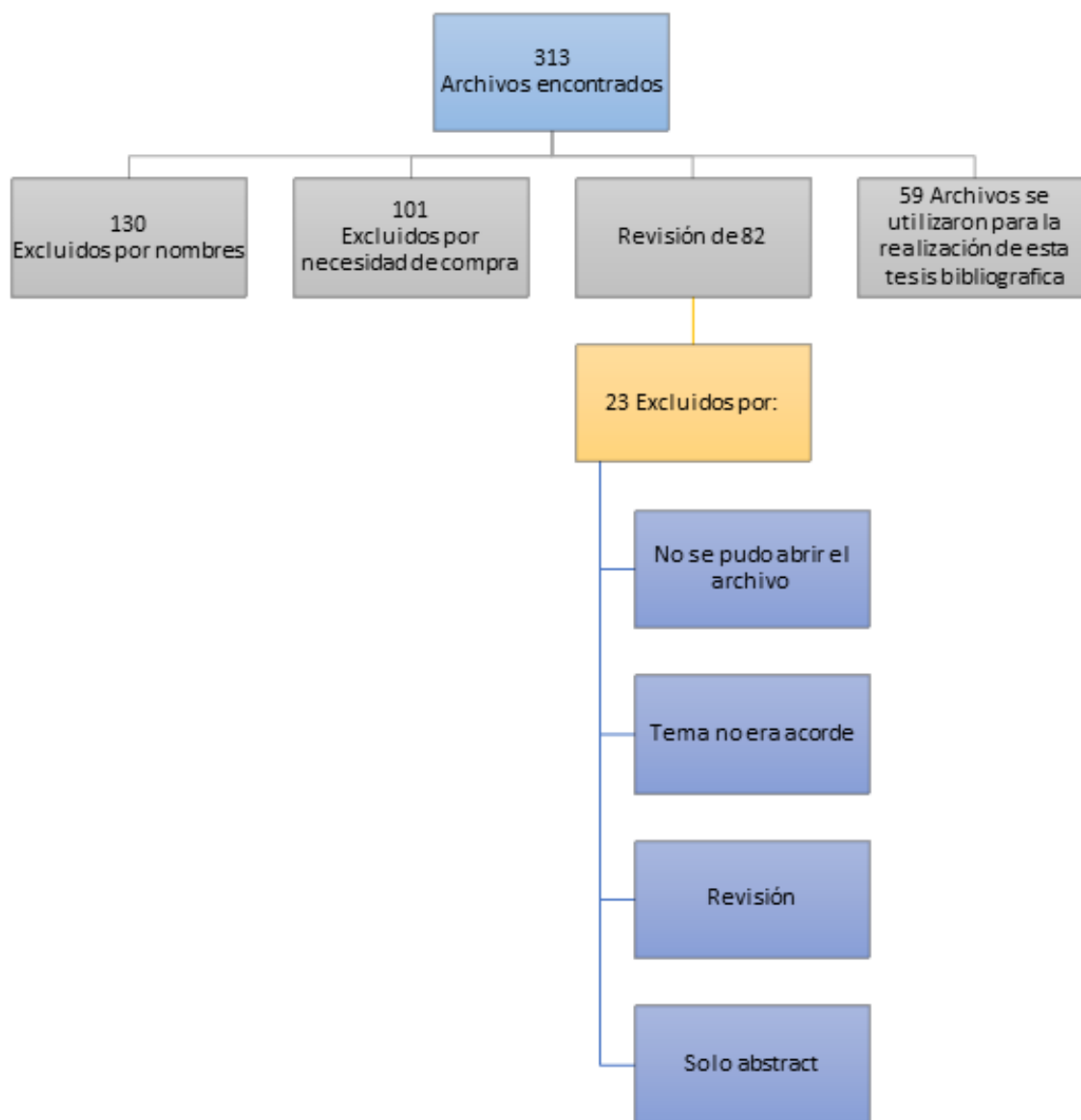
Realizar una tesis bibliográfica requiere de una planificación previa para una revisión exitosa de los documentos y publicaciones atinentes con la temática elegida.

En coordinación grupal se decide comenzar la búsqueda vía web, mediante un buscador que permite el filtro de documentación (PubMed) con las palabras claves *“human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells”* que permitan la obtención de investigaciones sobre las células madre mesenquimáticas de gelatina de Wharton derivadas de cordón umbilical humano.

Se utilizaron publicaciones que sólo estaban disponibles de manera gratuitas.

Tras la lectura de los abstract se realizó la aceptación o descarte según el enfoque de análisis y la explicación de las distintas etapas de obtención, procesamiento y aplicaciones; se seleccionaron los documentos relacionados con el tema anteriormente señalado y se descargaron para su posterior análisis, es aquí donde se descartaron algunos debido a que no se relacionaban con el tema de base. Se tradujeron cada uno y se resumió subdividiendo cada artículo en tres áreas: obtención, procesamiento y aplicación, método que permitió de manera más expedita citar de acuerdo a cada investigación.

## Anexo 2: Flujograma



### **Anexo 3: Manuscritos utilizados en la revisión bibliográfica**

1. MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. (24)
2. Effect of substrate stiffness on differentiation of umbilical cord stem cells. (51)
3. Human umbilical cord expresses several vasoactive peptides involved in the local regulation of vascular tone: protein and gene expression of Orphanin, Oxytocin, ANP, eNOS and iNOS. (11)
4. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. (28)
5. Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord: Biological properties and emerging clinical applications. (68)
6. Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. (65)
7. Stem cells from umbilical cord Wharton's jelly from preterm birth have neuroglial differentiation potential. (3)
8. Gene expression modifications in Wharton's Jelly mesenchymal stem cells promoted by prolonged *in vitro* culturing. (4)
9. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. (12)
10. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during *in vitro* expansion. (5)
11. Use of hybrid chitosan membranes and human mesenchymal stem cells from the Wharton jelly of umbilical cord for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model. (43)
12. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes *in vitro* at high frequencies. (14)
13. Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells: Preliminary Characterization and Effect of Transplantation in a Rodent Model of Parkinson's Disease. (23)
14. Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons *In Vitro*: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism. (42)
15. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. (7)

16. Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. (61)
17. The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. (13)
18. Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. (38)
19. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. (37)
20. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. (9)
21. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells induce apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through activation of JNK and downregulation of PI3K/AKT signaling. (26)
22. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. (40)
23. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. (8)
24. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. (15)
25. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cells derived from placental decidua basalis, umbilical cord Wharton's Jelly and amniotic membrane. (20)
26. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. (16)
27. Renoprotective effect of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells immunodeficient mice suffering from acute kidney injury. (18)
28. Mesenchymal stem cells derived from Wharton jelly of the human umbilical cord ameliorate damage to human endometrial stromal cells. (19)
29. Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical cord mesenchymal stromal cells. (69)
30. Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. (6)
31. Effect of combined therapy of human Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells from umbilical cord with sitagliptin in type 2 diabetic rats. (67)

32. Wharton's jelly mesenchymal stem cells differentiate into retinal progenitor cells. (35)
33. Endothelium Trans Differentiated from Wharton's Jelly Mesenchymal Cells Promote Tissue Regeneration: Potential Role of Soluble Pro-Angiogenic Factors. (39)
34. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. (41)
35. Conditioned medium as a strategy for human stem cells chondrogenic differentiation. (70)
36. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived oligodendrocyte precursor-like cells for axon and myelin sheath regeneration. (36)
37. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. (56)
38. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. (54)
39. The secretome of bone marrow and Wharton jelly derived mesenchymal stem cells induces differentiation and neurite outgrow in SH- sY%y. (50)
40. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering. (71)
41. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. (21)
42. Cells therapy with human MSCs isolated from the umbilical cord Wharton jelly associated to a PVA membrane in the treatment of chronic skin wounds. (46)
43. Comparison of human amniotic fluid-derived and umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells: Characterization and myocardial differentiation capacity. (29)
44. A high efficiency induction of dopaminergic cells from human umbilical mesenchymal stem cells for the treatment of hemiparkinsonian rats. (17)
45. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: A new era for stem cell therapy. (72)
46. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. (25)
47. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord Wharton's jelly amniotic membrane. (30)
48. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. (31)

49. Promoting nerve regeneration in a neurotmesis rat model using poly(DL-lactide- $\epsilon$ -caprolactone) membranes and mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly: in vitro and in vivo analysis. (44)
50. Roles of the co-culture of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells with rat pancreatic cells in the treatment of rats with diabetes mellitus. (22)
51. Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopamine neurons mediated by the Lmx1a and Neurturin in Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinson's Disease in a Rhesus Monkey Model. (34)
52. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments Scar-Free skin wound healing with hair growth. (33)
53. Microvesicles derived from Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells promote human renal cancer cells growth and aggressiveness growth factor. (60)
54. Umbilical Cord Wharton's Jelly repeated culture system: A new device and method for obtaining abundant mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. (32)
55. Differentiation of human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells into neural-like progenitor cells and maturation into an oligodendroglial-like lineage. (10)
56. Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. (53)
57. Endothelial progenitor cells derived from Wharton's jelly of umbilical cord reduces ischemia-induced hind limb injury in diabetic mice by inducing HIF-1a / IL-8 expression. (27)
58. Comparative evaluation of human Mesenchymal stem cells of Fetal (Wharton's Jelly) and adult (Adipose Tissue) origin during prolonged in Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy. (52)
59. Effects of Human Mesenchymal Stem Cells isolated from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord and conditioned media on Skeletal Muscle regeneration using a myectomy model. (45)

# Conclusión

Es una gran ventaja que en la actualidad se pueda contar con avances tecnológicos para utilizarlos en estudios e investigaciones. Se permite con esto una mayor rapidez, eficacia y detallismo en el descubrimiento de nuevas problemáticas investigativas en áreas previamente no estudiadas como lo son las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical.

Las células madre mesenquimáticas derivadas de cordón umbilical son una arista relativamente nueva. Mediante la revisión bibliográfica efectuada, se pudo reunir en un documento estandarizado lo general y específico de la obtención, el procesamiento y las variadas aplicaciones que se han ido desarrollando entre los años 2004 a 2014.

Queda evidenciado que aún a la fecha no hay un método estandarizado para trabajar con las células madre mesenquimáticas del cordón umbilical, cada investigador de los archivos revisados usó su propia forma de trabajo, incluso ya desde la obtención esto se hace patente, puesto que los criterios de inclusión difieren entre ellos. Además el procesamiento, el cual involucra diversas acciones tales como: Lavado; Corte; Acción enzimática; Centrifugación; Incubación; Tinción de azul de tripán; Recuento celular; Citometría de flujo; Exposición a rayos ultravioleta; PCR, no son todos incluidos, de hecho algunos pueden no ser requeridos e incluso imprescindibles en la investigación, esto varía según la finalidad real que tenga ésta más allá de la utilización de las células madre del cordón umbilical.

Un procedimiento del cual no se ahondado en mucho detalles en esta tesis es la diferenciación adipocitos, condrocitos y osteocitos, que permiten verificar que las células resultantes del procesamiento, realmente son células madre, por los

criterios de la ISCT, pero si se menciona en la aplicación, ya que está más que demostrado ampliamente que su posible uso.

De igual manera se puede apreciar en esta tesis, las células madre mesenquimáticas derivadas de la gelatina de Wharton ofrecen un futuro prometedor en la medicina regenerativa, las aplicaciones que se han buscado demostrar en las distintas investigaciones que se han llevado a cabo en su gran mayoría con éxito gracias a sus propiedades como por ejemplo no desencadenar una respuesta inmune en el receptor de las células y su gran capacidad de proliferación y diferenciación. Cabe destacar que su empleo sobre todo en el sistema nervioso central, llega a ser impresionante, pudiendo ser una solución para Parkinson, enfermedad que afecta considerablemente a la población mundial. También enfermedades crónicas, como diabetes mellitus tipo 1 y 2, entre otras. Por lo anterior, es fundamental que se sigan abordando este tipo temática, esperamos que para eventualidad próxima, las aplicaciones que solo se han demostrado in vivo, in vitro o en pruebas con animales, puedan llegar a ser una realidad más cercana y posible.

Además dado a la diversidad de las investigaciones realizadas y resultados obtenidos en dichos estudios sería beneficioso la realización un protocolo universal para el trabajo con las células madre provenientes del cordón umbilical, como temática en próximas investigaciones y que esta revisión sea de utilidad para ello.

Se espera que con el trabajo efectuado, se pueda colaborar en otros procesos de investigación que requieran de orientación y base para comenzar sus estudios, complementándose con la revisión realizada.

# Bibliografía

1. Real Academia Española [Internet]. Sobrenadante.1. Disponible en: [http://lema.rae.es/drae/srv/search?id=x7Fub4T7I2x5qrcXK4I#0\\_1](http://lema.rae.es/drae/srv/search?id=x7Fub4T7I2x5qrcXK4I#0_1)
2. Beike Biotechnology [Internet]. 2014:1. Disponible en: <http://miterapiacelulasmadre.com/>
3. Messerli M, Wagner A, Sager R, Mueller M, Baumann M, Surbek DV, et al. Stem cells from umbilical cord Wharton's jelly from preterm birth have neuroglial differentiation potential. *Reproductive sciences*. 2013;20(12):1455-64.
4. Gatta V, D'Aurora M, Lanuti P, Pierdomenico L, Sperduti S, Palka G, et al. Gene expression modifications in Wharton's Jelly mesenchymal stem cells promoted by prolonged in vitro culturing. *BMC genomics*. 2013;14:635.
5. Angelucci S, Marchisio M, Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Sulpizio M, Eleuterio E, et al. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion. *Proteome science*. 2010;8:18.
6. Bakhshi T, Zabriskie RC, Bodie S, Kidd S, Ramin S, Paganessi LA, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion*. 2008;48(12):2638-44.
7. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330-7.
8. Fong CY, Subramanian A, Biswas A, Gauthaman K, Srikanth P, Hande MP, et al. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. *Reproductive biomedicine online*. 2010;21(3):391-401.
9. 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.

10. Leite C, Silva NT, Mendes S, Ribeiro A, de Faria JP, Lourenco T, et al. Differentiation of human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells into neural-like progenitor cells and maturation into an oligodendroglial-like lineage. *PloS one*. 2014;9(10):e1111059.
11. Mauro A, Buscemi M, Provenzano S, Gerbino A. Human umbilical cord expresses several vasoactive peptides involved in the local regulation of vascular tone: protein and gene expression of Orphanin, Oxytocin, ANP, eNOS and iNOS. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2011;49(2):211-8.
12. Hu J, Yu X, Wang Z, Wang F, Wang L, Gao H, et al. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocrine journal*. 2013;60(3):347-57.
13. Ribeiro CA, Fraga JS, Graos M, Neves NM, Reis RL, Gimble JM, et al. The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. *Stem cell research & therapy*. 2012;3(3):18.
14. Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sanguinis*. 2008;95(2):137-48.
15. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PloS one*. 2008;3(1):e1451.
16. Yang CC, Shih YH, Ko MH, Hsu SY, Cheng H, Fu YS. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PloS one*. 2008;3(10):e3336.
17. Ko TL, Fu YY, Shih YH, Lin YH, Ko MH, Fu TW, et al. A High Efficiency Induction of Dopaminergic Cells from Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Hemiparkinsonian Rats. *Cell transplantation*. 2014.

18. Fang TC, Pang CY, Chiu SC, Ding DC, Tsai RK. Renoprotective effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in immunodeficient mice suffering from acute kidney injury. *PloS one*. 2012;7(9):e46504.
19. Yang X, Zhang M, Zhang Y, Li W, Yang B. Mesenchymal stem cells derived from Wharton jelly of the human umbilical cord ameliorate damage to human endometrial stromal cells. *Fertility and sterility*. 2011;96(4):1029-36.
20. Shaer A, Azarpira N, Aghdaie MH, Esfandiari E. Isolation and characterization of Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Placental Decidua Basalis; Umbilical cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane. *Pakistan journal of medical sciences*. 2014;30(5):1022-6.
21. Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *International journal of molecular medicine*. 2006;18(6):1089-96.
22. Wang G, Li Y, Wang Y, Dong Y, Wang FS, Ding Y, et al. Roles of the co-culture of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells with rat pancreatic cells in the treatment of rats with diabetes mellitus. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;8(5):1389-96.
23. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, et al. Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells: Preliminary Characterization and Effect of Transplantation in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *STEM CELLS*. 2006;24(3):781-92.
24. Chang SJ, Weng SL, Hsieh JY, Wang TY, Chang MD, Wang HW. MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *BMC medical genomics*. 2011;4:65.
25. Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *International journal of biological sciences*. 2010;6(5):499-512.

26. Han I, Yun M, Kim EO, Kim B, Jung MH, Kim SH. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells induce apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through activation of JNK and downregulation of PI3K/AKT signaling. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(2):54.
27. Shen WC, Liang CJ, Wu VC, Wang SH, Young GH, Lai IR, et al. Endothelial progenitor cells derived from Wharton's jelly of the umbilical cord reduces ischemia-induced hind limb injury in diabetic mice by inducing HIF-1 $\alpha$ /IL-8 expression. *Stem cells and development*. 2013;22(9):1408-18.
28. Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *BioMed research international*. 2013;2013:916136.
29. Bai J, Hu Y, Wang YR, Liu LF, Chen J, Su SP, et al. Comparison of human amniotic fluid-derived and umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells: Characterization and myocardial differentiation capacity. *Journal of geriatric cardiology : JGC*. 2012;9(2):166-71.
30. Pirjali T, Azarpira N, Ayatollahi M, Aghdaie MH, Geramizadeh B, Talai T. Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane. *International journal of organ transplantation medicine*. 2013;4(3):111-6.
31. Zhou C, Yang B, Tian Y, Jiao H, Zheng W, Wang J, et al. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cellular immunology*. 2011;272(1):33-8.
32. Chang Z, Hou T, Xing J, Wu X, Jin H, Li Z, et al. Umbilical cord Wharton's jelly repeated culture system: a new device and method for obtaining abundant mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *PloS one*. 2014;9(10):e110764.
33. Sabapathy V, Sundaram B, V MS, Mankuzhy P, Kumar S. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PloS one*. 2014;9(4):e93726.

34. Yan M, Sun M, Zhou Y, Wang W, He Z, Tang D, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PloS one*. 2013;8(5):e64000.
35. Hu Y, Liang J, Cui H, Wang X, Rong H, Shao B, et al. Wharton's jelly mesenchymal stem cells differentiate into retinal progenitor cells. *Neural regeneration research*. 2013;8(19):1783-92.
36. Chen H, Zhang Y, Yang Z, Zhang H. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived oligodendrocyte precursor-like cells for axon and myelin sheath regeneration. *Neural regeneration research*. 2013;8(10):890-9.
37. Arno AI, Amini-Nik S, Blit PH, Al-Shehab M, Belo C, Herer E, et al. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(1):28.
38. Corotchi MC, Popa MA, Remes A, Sima LE, Gussi I, Lupu Plesu M. Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(4):81.
39. Aguilera V, Briceno L, Contreras H, Lamperti L, Sepulveda E, Diaz-Perez F, et al. Endothelium trans differentiated from Wharton's jelly mesenchymal cells promote tissue regeneration: potential role of soluble pro-angiogenic factors. *PloS one*. 2014;9(11):e1111025.
40. Garzon I, Miyake J, Gonzalez-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sanchez-Quevedo Mdel C, et al. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem cells translational medicine*. 2013;2(8):625-32.
41. Garzon I, Martin-Piedra MA, Alfonso-Rodriguez C, Gonzalez-Andrades M, Carriel V, Martinez-Gomez C, et al. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(7):4073-83.

42. Fu Y-S, Cheng Y-C, Lin M-YA, Cheng H, Chu P-M, Chou S-C, et al. Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons In Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism. *STEM CELLS*. 2006;24(1):115-24.
43. Gartner A, Pereira T, Simoes MJ, Armada-da-Silva PA, Franca ML, Sousa R, et al. Use of hybrid chitosan membranes and human mesenchymal stem cells from the Wharton jelly of umbilical cord for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model. *Neural regeneration research*. 2012;7(29):2247-58.
44. Pereira T, Gartner A, Amorim I, Almeida A, Caseiro AR, Armada-da-Silva PA, et al. Promoting nerve regeneration in a neurotmesis rat model using poly(DL-lactide-epsilon-caprolactone) membranes and mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly: in vitro and in vivo analysis. *BioMed research international*. 2014;2014:302659.
45. Pereira T, Armada-da Silva PA, Amorim I, Rema A, Caseiro AR, Gartner A, et al. Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord and Conditioned Media on Skeletal Muscle Regeneration Using a Myectomy Model. *Stem cells international*. 2014;2014:376918.
46. Ribeiro J, Pereira T, Amorim I, Caseiro AR, Lopes MA, Lima J, et al. Cell therapy with human MSCs isolated from the umbilical cord Wharton jelly associated to a PVA membrane in the treatment of chronic skin wounds. *International journal of medical sciences*. 2014;11(10):979-87.
47. Life Technologies [Internet]. PBS. 2015:1. Disponible en: <http://lifetechnologies.com/order/catalog/product/70011044>
48. Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina UASLP [Internet]. Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). 2008. Disponible en: [http://genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_Buffer\\_PBS.pdf](http://genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf)
49. Life Technologies [Internet]. DPBS - Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline. 2015:1. Disponible en: <https://www.lifetechnologies.com/cl/es/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/balanced-salt-solutions/dpbs-dulbeccos.html>

50. Pires AO, Neves-Carvalho A, Sousa N, Salgado AJ. The Secretome of Bone Marrow and Wharton Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells Induces Differentiation and Neurite Outgrowth in SH-SY5Y Cells. *Stem cells international*. 2014;2014:438352.
51. Witkowska-Zimny M, Walenko K, Walkiewicz AE, Pojda Z, Przybylski J, Lewandowska-Szumiel M. Effect of substrate stiffness on differentiation of umbilical cord stem cells. *Acta biochimica Polonica*. 2012;59(2):261-4.
52. Christodoulou I, Kolisis FN, Papaevangeliou D, Zoumpourlis V. Comparative Evaluation of Human Mesenchymal Stem Cells of Fetal (Wharton's Jelly) and Adult (Adipose Tissue) Origin during Prolonged In Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy. *Stem cells international*. 2013;2013:246134.
53. Venugopal P, Balasubramanian S, Majumdar AS, Ta M. Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. *Stem cells and cloning : advances and applications*. 2011;4:39-50.
54. Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World journal of stem cells*. 2014;6(2):195-202.
55. Segretín M. Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (Cultivos de células animales).6. Disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>
56. Garzon I, Perez-Kohler B, Garrido-Gomez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martin-Piedra MA, et al. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2012;18(6):408-19.
57. Universidad de Barcelona [Internet]. Centrifugación: Fundamentos de la técnica. 2015:1. Disponible en: [http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/centrifugacio\\_fonament.html](http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/centrifugacio_fonament.html)
58. Universidad de Barcelona [Internet]. Centrifugación: Tipos de centrifugación. 2015:1. Disponible en: [http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/centrifugacio\\_tipus.html](http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/centrifugacio_tipus.html)

59. Universidad de Barcelona [Internet]. Centrifugación: Utillaje/Material. 2015:1. Disponible en: [http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/centrifugacio\\_material.html](http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/centrifugacio_material.html)
60. Du T, Ju G, Wu S, Cheng Z, Cheng J, Zou X, et al. Microvesicles derived from human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote human renal cancer cell growth and aggressiveness through induction of hepatocyte growth factor. *PLoS one*. 2014;9(5):e96836.
61. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, et al. Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. *STEM CELLS*. 2008;26(11):2865-74.
62. MICROSCOPYU [Internet]. Crecimiento y mantención de células vivas en el laboratorio. Disponible en: [http://tecnicenlaboratorios.com/Nikon/Info\\_cultivo\\_celular.htm](http://tecnicenlaboratorios.com/Nikon/Info_cultivo_celular.htm)
63. Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina UASLP [Internet]. Conteo y Evaluación de la Viabilidad de Células Mononucleares. 2011:4. Disponible en: [http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_counts\\_SPA.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf)
64. BARRERA RAMÍREZ LM, DRAGO SERRANO ME, PÉREZ RAMOS J, SAINZ ESPUÑES TDR, ZAMORA AC, GÓMEZ ARROYO F, et al. CITOMETRÍA DE FLUJO: VÍNCULO ENTRE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y LA APLICACIÓN CLÍNICA. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2004;17:42-55.
65. Penolazzi L, Vecchiatini R, Bignardi S, Lambertini E, Torreggiani E, Canella A, et al. Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2009;7:106.
66. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas [Internet]. PCR en tiempo real.10. Disponible en: [http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/6445/mod\\_resource/content/1/TP\\_qPCR\\_Bioinf\\_Bioq\\_2012.pdf](http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/6445/mod_resource/content/1/TP_qPCR_Bioinf_Bioq_2012.pdf)

67. Hu J, Wang F, Sun R, Wang Z, Yu X, Wang L, et al. Effect of combined therapy of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from umbilical cord with sitagliptin in type 2 diabetic rats. *Endocrine*. 2014;45(2):279-87.
68. Batsali AK, Kastrinaki MC, Papadaki HA, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Current stem cell research & therapy*. 2013;8(2):144-55.
69. Wang L, Ott L, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Regenerative medicine*. 2011;6(1):95-109.
70. Alves da Silva ML, Costa-Pinto AR, Martins A, Correlo VM, Sol P, Bhattacharya M, et al. Conditioned medium as a strategy for human stem cells chondrogenic differentiation. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2013.
71. Wang L, Zhao L, Detamore MS. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2011;5(9):712-21.
72. Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell transplantation*. 2015;24(3):339-47.