

**Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Departamento de Zoología**



Caracterización y Potencialidad de Diferenciación Neurogénica de Células Madre Mesenquimales del Cordón Umbilical Humano Criopreservadas por Vitrificación

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller **Anna Karinha Sánchez**, como requisito para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. Elizabeth Merentes Díaz

Caracas, Febrero 2018

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO TITULADO

Caracterización y Potencialidad de Diferenciación Neurogénica de Células Madre Mesenquimales del Cordón Umbilical Humano Criopreservadas por Vitrificación

Presentado por la Br. Anna Karinha Sánchez

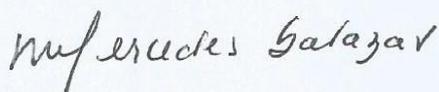
Ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de
Licenciada en Biología

Defendido públicamente al día 15 de Febrero de 2018 y aprobado por los miembros del jurado designados por el Consejo de Escuela de Biología, quienes consideraron que dicho trabajo cumplió con los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos



Dra. Elizabeth Merentes

(Tutor)



Dra. Mercedes Salazar

(Jurado)



Dr. Lisandro Romero

(Jurado)

Resumen

Una de las fuentes de obtención de células madre mesenquimales, son provenientes de la gelatina de Wharton (GW) del cordón umbilical humano (CUH). Éstas presentan una serie de ventajas con respecto a las CMMs de otros tejidos; debido a su naturaleza más primitiva, son consideradas como células madre pluripotentes, lográndose diferenciar a linajes no mesenquimales como: células pulmonares, cardiomiocitos, neuronas, entre otros, con una baja incompatibilidad inmunológica. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de las CMMs derivadas del CUH antes y después de un proceso de criopreservación por vitrificación, evaluando, además, su proliferación y potencialidad de diferenciación neurogénica *in vitro*. Los cultivos primarios se establecieron con una eficacia de 71,43% (n=7), mediante el método de disgregación enzimática de la GW y con una viabilidad celular de 95,77%. Los cultivos primarios y los subcultivos se caracterizaron morfológicamente, observándose principalmente dos fenotipos: células de tipo fibroblasto y células de amplio volumen citoplasmático. Estos se demostraron con la coloración de rutina May-Grunwald-Giemsa e inmunocitoquímicamente, utilizando como marcador molecular el anticuerpo monoclonal contra la proteína Vimentina, en donde, las del tipo fibroblasto presentaron una mayor intensidad en el marcaje. Las células amplificadas entre el 2^{do} y 5^{to} pasaje se criopreservaron por vitrificación, siendo descongelados entre 4-16 semanas, evidenciándose que estas mantuvieron sus características morfológicas, capacidad de adherencia, de proliferación, así como también su potencialidad de diferenciación neurogénica *in vitro*, en donde se apreciaron células similares a neuronas

bipolares, multipolares y células gliales, los cuales se confirmaron por medio de la caracterización histoquímica con la tinción Violeta de Cresilo y Bielschowsky e inmunocitoquímica usando un anticuerpo en contra de neurofibrillas. Por lo tanto, se concluye que la criopreservación por vitrificación es un método eficaz, ya que permite que las células mesenquimales del cordón umbilical humano conserven su identidad morfológica y su potencialidad de diferenciación neurogénica después de la congelación.

Palabras claves: células madre mesenquimales, gelatina de Wharton, cordón umbilical humano, diferenciación neural, vitrificación.

INDICE DE CONTENIDO	Pág.
INTRODUCCIÓN	
Células madre y su clasificación	1
Células madre mesenquimales	4
Cordón umbilical humano	6
Gelatina de Wharton	8
Neurogénesis <i>in vivo</i>	10
Criopreservación de células madre	13
ANTECEDENTES	
Célula madre del cordón umbilical humano	16
Regiones de la gelatina de Wharton y epitelio del CUH	18
Obtención de células madre mesenquimales	19
Criopreservación de células mesenquimales	20
Diferenciación de células madre	22
OBJETIVOS	
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	25
MATERIALES Y METODOS	
Material biológico	26
Aislamiento de células derivadas del cordón umbilical humano y establecimiento de los cultivos primarios	26

Subcultivos celulares	29
Caracterización de las células madre mesenquimales	29
Caracterización de la células madre mesenquimales con la coloración de rutina May-Grunwald-Giemsa	30
Caracterización inmunocitoquímica de las células derivadas del CUH	30
Criopreservación y descongelación celular	31
Determinación de la proliferación celular por el método de MTT	32
Diferenciación neural de las células derivadas del CUH	34
Caracterización histoquímica de células diferenciadas al linaje neural	35
Caracterización inmunocitoquímica de la diferenciación neurogénica	37

RESULTADOS

Aislamiento de las células derivadas a partir del CUH	38
Establecimiento del cultivo primario de las células derivadas a partir del CUH	38
Establecimiento de los subcultivos de las células derivadas a partir del cordón umbilical humano	40
Caracterización de células madre mesenquimales	42
Caracterización morfológica de las células del cordón umbilical humano	42
Evaluación inmunocitoquímica de las células mesenquimales	44
Criopreservación y descongelación de células mesenquimales del CUH	45
Determinación de la viabilidad celular	45

Determinación de la proliferación celular por el método MTT	46
Diferenciación neurogénica de las células derivadas del CUH	48
Evaluación histoquímica de las células diferencias hacia el linaje neural	51
Caracterización inmunocitoquímica de la diferenciación neurogénica	54
DISCUSIÓN	
Aislamiento y obtención celular a partir del CUH	56
Establecimiento del cultivo primario de las células del CUH	57
Establecimiento de los subcultivos celulares	58
Caracterización morfológica de las células derivadas del CUH	59
Caracterización inmunocitoquímica de las células madre mesenquimales	60
Determinación de la viabilidad celular	61
Determinación de la proliferación celular por el método MTT	63
Células mesenquimales inducidas	65
Evaluación histoquímica de las células diferenciadas al linaje neural	67
Evaluación inmunocitoquímica de las células diferenciadas hacia el linaje neural	68
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFIA	73
ANEXOS	96

INDICE DE FIGURAS	Pág.
Fig. 1. Modelo jerárquico de los tipos de células madre según su potencialidad	2
Fig. 2. Aislamiento y obtención de células madre embrionarias	4
Fig. 3. Diagrama esquemático de linajes de diferenciación de las células madres mesenquimales	5
Fig. 4. Características del Cordón umbilical humano	7
Fig. 5. Diagrama tridimensional de la estructura del cordón umbilical humano	9
Fig. 6. Tipos celulares derivados del neuroepitelio del tubo neural	12
Fig. 7. Método para el aislamiento de células madre derivadas del CUH	27
Fig. 8. Transformación del MTT a formazan por las enzimas deshidrogenasa	33
Fig. 9. Diagrama de distribución de los tratamientos utilizados en la diferenciación celular	34
Fig. 10. Esquema de la impregnación de argéntica con nitrato de plata	36
Fig. 11. Cultivo primario de células derivadas del cordón umbilical humano observadas al microscopio invertido de fases	39
Fig. 12. Cultivo primario obtenido a partir de la disgregación enzimática con la enzima colagenasa tipo II de la gelatina de Wharton a los 12 días de cultivo	41
Fig. 13. Subcultivos de células mesenquimales del CUH observadas en el microscopio de contraste de fases	42

Fig. 14. Células provenientes de la gelatina de Wharton caracterizadas en el microscopio de contraste de fases y coloreadas con May-Grunwald-Giemsa	43
Fig. 15. Caracterización inmunocitoquímica de células provenientes del cordón umbilical humano antes y después de la criopreservación	44
Fig. 16. Curva de proliferación de las células mesenquimales del cordón umbilical humano	47
Fig. 17. Diferenciación neurogénica de las células mesenquimales observadas con el microscopio invertido de fases	49
Fig. 18. Diferenciación de células derivadas del CUH hacia el linaje neural observadas en el microscopio invertido de contraste de fases	50
Fig. 19. Células diferenciadas teñidas con tinción de plata a las 6 horas de inducción observadas al microscopio invertido de fases y microscopio de luz	52
Fig. 20. Células diferenciadas tenidas por el método de violeta de Cresilo a distintos tiempos de inducción	53
Fig. 21. Inmunomarcaje contra las neurofibrillas de las células diferenciadas hacia el linaje neural, observadas al microscopio de luz	55

INDICE DE TABLAS	Pág.
Tabla 1. Composición de los medios utilizados en la diferenciación neurogénica <i>in vitro</i>	35
Tabla 2. Rendimiento y viabilidad celular obtenidos a partir del CUH por el método de disgregación enzimática	38
Tabla 3. Porcentaje de viabilidad para células mesenquimales antes y después de la criopreservación por vitrificación	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA:	Análisis de Varianza
bFGF:	Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos
CM:	Célula Madre
CMA:	Células Madre Adultas
CME:	Células Madre Embrionarias
CMH:	Células Madre Hematopoyéticas
CMMs:	Células Madre Mesenquimales
CPO:	Crioprotector Celular
CPN:	Células Progenitoras Neuronales
CUH:	Cordón Umbilical Humano
DAB:	Diaminobencidina
DMEM:	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO:	Dimetilsulfóxido
D.O:	Densidad Óptica
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético
EG:	Etilenglicol
EFG:	Factor de Crecimiento Epidérmico
FNDC:	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
GDNF:	Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales
GF:	Factor de Crecimiento
GW:	Gelatina de Wharton
HLA:	Antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad
IBE:	Instituto de Biología Experimental
ISCT:	Sociedad Internacional de Terapia Celular

MA:	Membrana Amniótica
MAP2:	Proteína Asociada a Microtúbulos 2
MC:	Membrana Coriónica
MCI:	Masa Celular Interna
MHC:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MHC-D:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo D
MO:	Médula Ósea
MTT:	3-4,5 dimetil, tiazol-2y1)-2,5 bromuro de Difeniltetrazolium
Nanog:	Factor de Transcripción Homeobox
NF-L:	Neurofilamento Liviano
NF-M:	Neurofilamento Medio
NF-H:	Neurofilamento Pesado
Oct-4:	Octámeros de Proteínas de Unión 4
PBS:	Solución Buffer de Fosfato
SC:	Solución Crioprotectora
SFB:	Suero Fetal Bovino
Sox2:	Caja 2 de la Región y Determinante del Sexo
SSEA:	Antígeno Embrionario de Estadio Especifico
UFC:	Unidades Formadores de Colonias
UFC-F:	Unidades Formadoras de Colonias de Fibroblastos

INTRODUCCION

En los últimos años, las células madre han tomado gran importancia por parte de investigadores, debido a sus propiedades biológicas, como: la autorenovación y diferenciación celular utilizadas en la terapia celular, medicina regenerativa e ingeniería de tejidos (Guerrero y col., 2007; Márquez-Curtis y col., 2015), abriendo esperanzas en el tratamiento de distintas enfermedades.

Células madre y su clasificación.

Las células madre son un grupo de células indiferenciadas, caracterizadas por su capacidad de autorenovarse indefinidamente y de originar células hijas comprometidas en determinadas rutas de desarrollo, que finalmente, a través de la diferenciación se convierten en tipos celulares especializados (Weissman y col., 2001; Mata-Miranda y col., 2013; Wang y Zhao, 2013), de manera morfológica y funcional (Raff, 2003; Prósper y Herreros., 2004; Dominici y col., 2006). Entre sus funciones primordiales se encuentran el de mantener, generar y reemplazar las células diferenciadas, contribuyendo a la homeostasis, como consecuencia de la autorenovación, fisiológica o en respuesta al daño tisular secundario a una agresión (Horwitz, 2003; Arbós y col., 2013).

Los términos utilizados para definir una célula madre, obedecen al comportamiento celular bajo diferentes condiciones *in vitro* o *in vivo* (Weissman y col., 2001), teniendo esto en cuenta, pueden clasificarse: de acuerdo a la potencialidad, es decir; a la capacidad de originar tejidos, existen cuatro tipos de CM:

Las totipotentes como el cigoto, capaces de dar origen a un individuo completo (tejido embrionario) y las membranas extraembrionarias (Prósper y

Herreros, 2004; Jaenisch y Young, 2008), esta potencialidad se restringe a medida que transcurre el desarrollo embrionario. Las pluripotentes presentes en la masa celular interna del blastocisto, pueden generar células diferenciadas de cualquiera de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) (Fig. 1), además de las células germinales. Las multipotentes se diferencian en todos los tipos celulares procedente de una misma capa embrionaria del tejido en el que residen o se obtiene (Prósper y Herreros, 2004), por lo general encontrados en tejidos adultos; y por último; las unipotentes, con un menor potencial de diferenciación, dando origen a un tipo celular específico (Weissman y col., 2001; Prósper y Verfaillie, 2003; Raff, 2003).

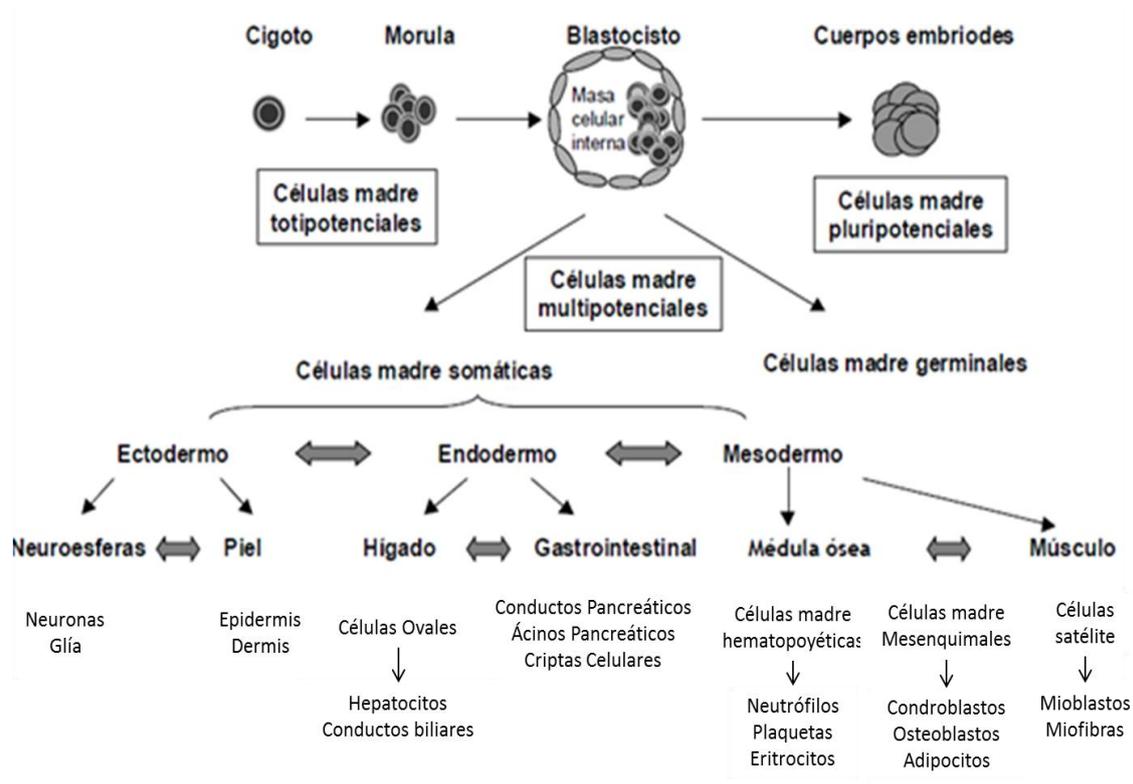


Fig. 1. Modelo jerárquico de los tipos de células madre según su potencialidad (Tomado y modificado de Prósper y Verfaillie, 2003).

Según el tejido de origen, las CM pueden proceder del embrión en sus primeras fases de desarrollo o de un organismo adulto, de ahí que se

denominen como: células madre embrionarias y células madre adultas (Riaño y col., 2007). Las células madre embrionaria sólo pueden ser obtenidas, a partir de la MCI del blastocito de embriones de mamíferos (Fig. 2), consideradas como células pluripotentes (Prósper y Herreros, 2004; Arbós y col., 2013; Pérez, 2014). Este tipo de CM, son capaces de replicarse y dividirse en cultivo por largos períodos de tiempos sin mostrar alteraciones cromosómicas (Merentes 1993; Forraz y McGuckin, 2011). Sin embargo, presentan implicaciones éticas por la destrucción de embriones para la obtención, cultivo e investigación celular. La gran ventaja de las CME radica en su enorme potencial de diferenciación, pero esta característica ha limitado su uso terapéutico por el alto riesgo de formación de teratomas (Reubinof y col., 2000; Nombela, 2007; García, 2015).

Por otra parte, las células madre adultas pueden obtenerse de los distintos tejidos encontrados en el organismo, siendo consideradas como multipotentes (Fiore y col., 2017), adquieren características fenotípicas y funcionales, como respuestas a cambios y a estímulos del microambiente en el que se desarrollen (Simons y Clevers, 2011). Se ha demostrado que las CMA no solo pueden generar células de su tejido de origen, sino que pueden derivar en células de tejidos de otras capas embrionarias (Raff, 2003), con capacidad de diferenciarse a células neuronales, pulmonares, islotes de células beta pancreáticas, células epiteliales corneales o cardiomiocitos, entre otros, por lo que pueden usarse para el tratamiento de numerosos tejidos dañados y desórdenes degenerativos (Consuelo y col., 2014). Sin embargo, no pueden definirse como CM pluripotentes. Dentro de este grupo de células, se han investigado las CMMs, debido a su gran potencial proliferativo y de diferenciación (Pacini, 2013; Wang y Zhao, 2013).

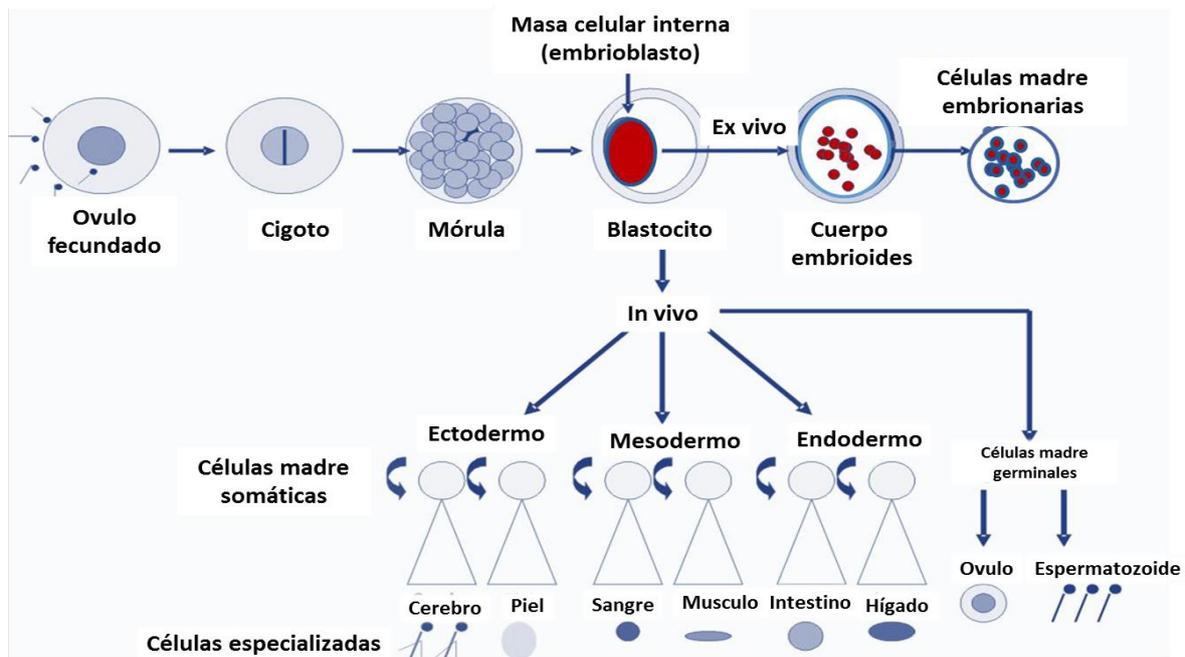


Fig. 2. Aislamiento y obtención de células madre embrionarias. El blastocito está formado por una capa externa denominada trofoblasto y una masa celular interna, con capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares existentes en el organismo adulto (Tomado y modificado de: Pérez, 2014).

Células madre mesenquimales.

Las células madre mesenquimales se encuentran en el tejido conectivo de distintos órganos como la medula ósea, tejido adiposo, tejido sinovial, músculo esquelético, cordón umbilical, entre otros. Estas CMA fueron caracterizadas por primera vez por Friedenstein y col., en 1976, las cuales se aislaron a partir de la MO (Koc y Lazarus, 2001), describiéndolas como células adherentes de morfología fibroblástica, que desarrollan unidades formadoras de colonias (Castro y Montesinos, 2015), con una extensa capacidad de proliferación y de diferenciación (Koc y Lazarus, 2001; Arévalo y col., 2007; Arbós y col., 2013; Pacini, 2013; Wang y Zhao, 2013). Las CMMs derivan de la capa embrionaria del mesodermo, diferenciándose en células que conforman los tejidos de esa

misma capa embrionaria, como: condrocitos, osteoblastos y adipocitos (Pittenger y col., 1999; Prósper y Verfaillie, 2003; Garzón-Perdomo y col., 2017). A pesar de haberse probado su potencial de diferenciación, como células multipotenciales, y su capacidad para diferenciarse en linajes neuroectodérmicos (Garzón-Perdomo y col., 2017), no pueden ser consideradas como células madre pluripotenciales, debido a que no logran diferenciarse en tejidos derivados del endodermo (Koc y Lazarus, 2001).

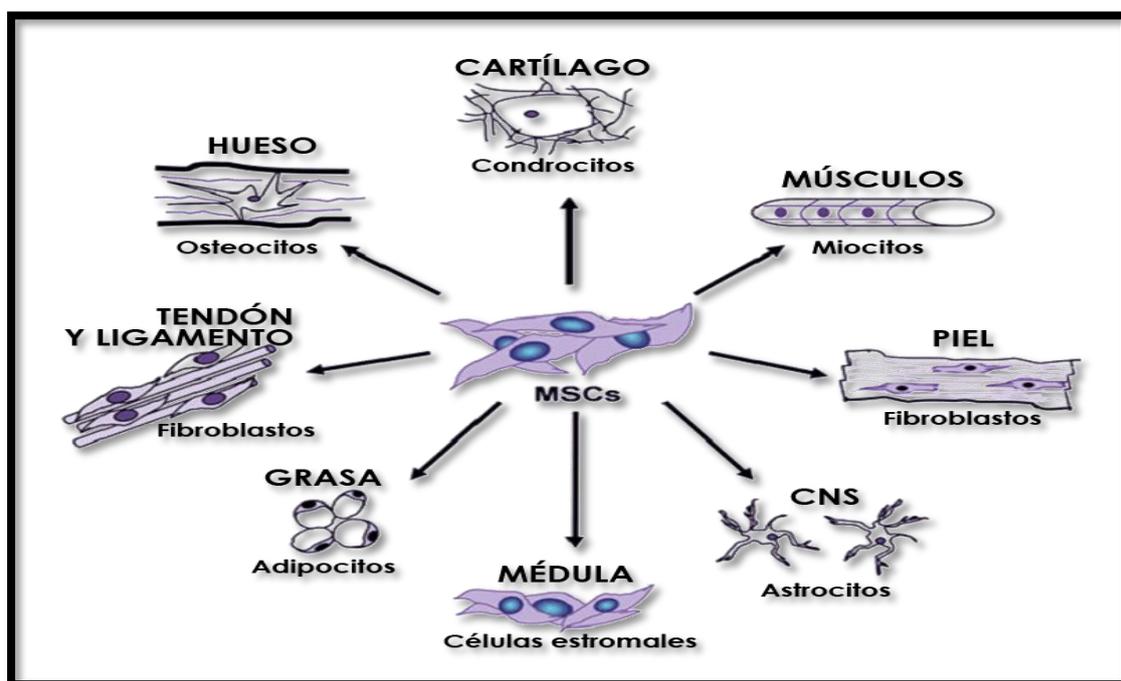


Fig. 3. Diagrama esquemático de linajes de diferenciación de las células madres mesenquimales (Tomado y modificado de: Cardozo, 2015).

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular propuso tres criterios para definir la CMMs (Dominici y col., 2006), éstas deben: 1) poseer la capacidad de adherencia al plástico en condiciones de cultivo; 2) presentar la expresión de los antígenos de superficie CD105, CD73, CD90 y ausencia de antígenos hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, CD79, HLA-DR y, por último, 3) poseer la capacidad de diferenciarse *in vitro* a los linajes osteogénico,

condrogénico y adipogénico (Fig. 3) (Arévalo y col., 2007; Carvalho y col., 2011; Arbós y col., 2013; Arutyunyan y col., 2016).

Las células madre mesenquimales de la medula ósea han sido muy estudiadas. El gran interés de éstas, se basa en su eficiencia de aislamiento y un bajo problema ético (Connolly y col., 1990), pero éstas contienen un bajo número de células madre, además, de la disminución del potencial de proliferación y diferenciación celular, según aumenta la edad del donante y su dificultad de extracción, hacen de este tejido un problema (Kern y col., 2006). Debido a estas desventajas, se han buscado otras fuentes de tejidos de CMMs, como las obtenidas a partir de la piel, cérvix, pulpa dental, tendón, sangre y GW provenientes del cordón umbilical, entre otros, que posean una mayor capacidad de proliferación y diferenciación celular, con una menor controversia por las técnicas de aislamiento celular. (Pacini, 2013; Castro y montesinos, 2015; Arutyunyan y col., 2016).

Cordón umbilical humano.

El cordón umbilical, constituye una estructura de tejido conectivo de origen extraembrionaria fundamental, que conecta la circulación fetal con la de la placenta (Di Naro y col., 2001; Fan y col., 2011; Piña y col., 2015; Davies y col., 2017); actuando como una barrera, cuya principal función es el transporte de fluidos, los cuales son esenciales para el desarrollo y crecimiento embrionario (Olaya y col., 2015) e innecesario en la vida extrauterina (Piña y col., 2015).

El CUH presenta un aspecto tubular, con un tamaño variable entre 55 y 65 cm de largo (Raio y col., 1999; Di Naro y col., 2001; Piña y col., 2015) y un diámetro de 1 a 2 cm (Cabero y col., 2007; Davies y col., 2017), presentado una morfología con dos arterias y una vena (Fig. 4) embebidas en un tejido conectivo

mucoso de origen mesenquimal (Fan y col., 2011), conocido como gelatina de Wharton, rodeado por un epitelio amniótico (Batsali y col., 2013). Los vasos umbilicales (Arteria y vena) se enrollan en espiral en el tejido conectivo mucoso, en el que no hay vasos linfáticos ni capilares (Arutyunyan y col., 2016). Además, a diferencia de otros vasos de similar diámetro en el ser humano, los vasos umbilicales solo comprenden una túnica íntima y media, sin una túnica adventicia (Davies y col., 2017).

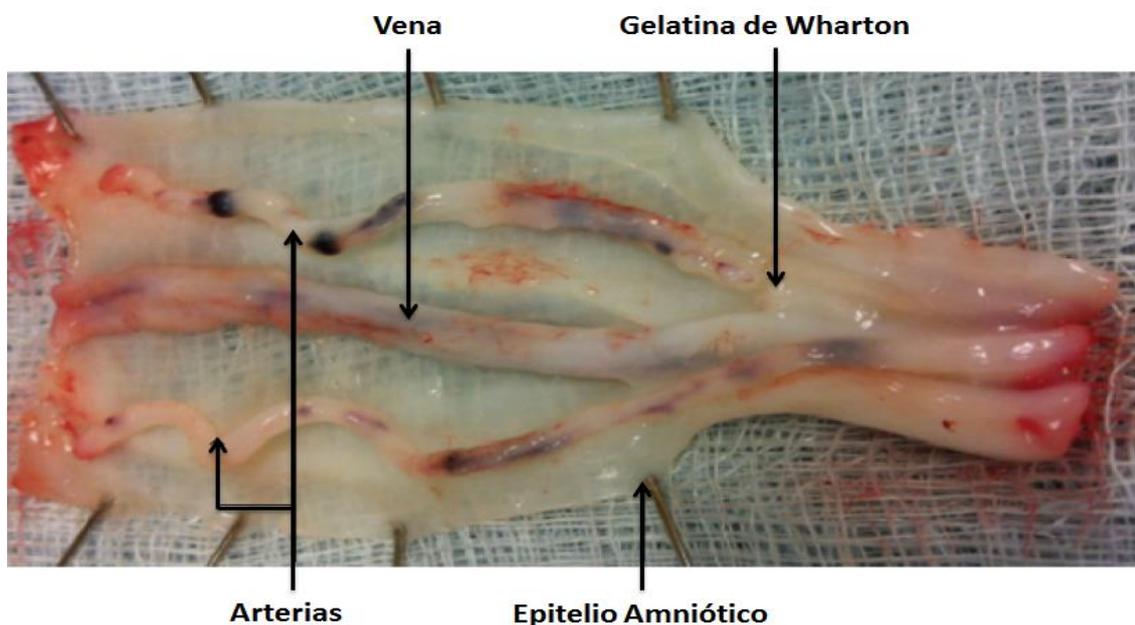


Fig. 4. Características del Cordón umbilical humano. Se aprecian los vasos umbilicales (dos arterias y una vena), la gelatina de Wharton y su respectivo epitelio de recubrimiento del CUH (epitelio amniótico) (Tomado y modificado de: Mennan y col., 2013).

Es importante destacar, que el CUH es una fuente doble de células progenitoras, teniendo: las células madre hematopoyéticas obtenidas a partir de la sangre y las células mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton (Forraz y McGuckin, 2011). Las células de la sangre del CUH, pueden generar progenitores más diferenciados que dan lugar a los distintos tipos celulares

presentes en la sangre, como: glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas (Ye y col., 1994; Bongso y Fong, 2013).

Gelatina de Wharton.

Por otro lado, la GW es un tejido caracterizado por la abundancia de componentes de la matriz extracelular, tales como: glicosaminoglicanos y proteoglicanos, siendo el de mayor abundancia el ácido hialurónico (Sobolewski y col., 1997; Pacini, 2013), que brinda una mayor hidratación a la matriz extracelular, protegiendo al CUH de presiones mecánicas (Sakamoto y col., 1996). Además, de muchos otros componentes embebidos en una matriz fibrilar de colágenos de tipo I, II, III, IV, VI y VII (Chan y col., 2006), aportando a la GW, propiedades de viscoelasticidad y viscoporosidad, permitiendo que el CUH tenga la flexibilidad y rigidez para resistir la compresión por los movimientos fetales, evitando así la pérdida de la oxigenación fetal.

Las células madre mesenquimales derivadas de la GW, fueron aisladas, cultivadas y caracterizadas *in vitro* por primera vez por McElreavey y col., en 1991, siendo células similares a fibroblastos con potencial de crecimiento. Éstas, han sido definidas en tres regiones de la GW: la perivascular, situada alrededor de los vasos umbilicales; el intervascular, propiamente las células madre de la GW, situada entre los vasos umbilicales y la región subamniótica (Fig. 4). Las células de estas regiones comparten una alta capacidad de proliferación y diferenciación. Sin embargo, se observaron que las células de la región subamniótica eran menos diferenciadas en comparación con las de la región perivascular, en donde ambas provenían de orígenes embrionarios distintos (Nanaev y col., 1997 citado en Davies y col., 2017). Asimismo, se ha demostrado que las CMMs derivadas de la región perivascular, comprenden una

subpoblación distinta (Batsali y col., 2013), en donde las células son de citoplasma ancho, con un menor potencial de diferenciación y proliferación, llegando a expresar citoqueratinas. En cambio, las otras CMMs de la GW son menos diferenciadas, no expresan citoqueratinas, apreciándose fusiforme en los cultivos, presentando un potencial de diferenciación y proliferación mayor (Can y Karahuseyinoglu, 2007).

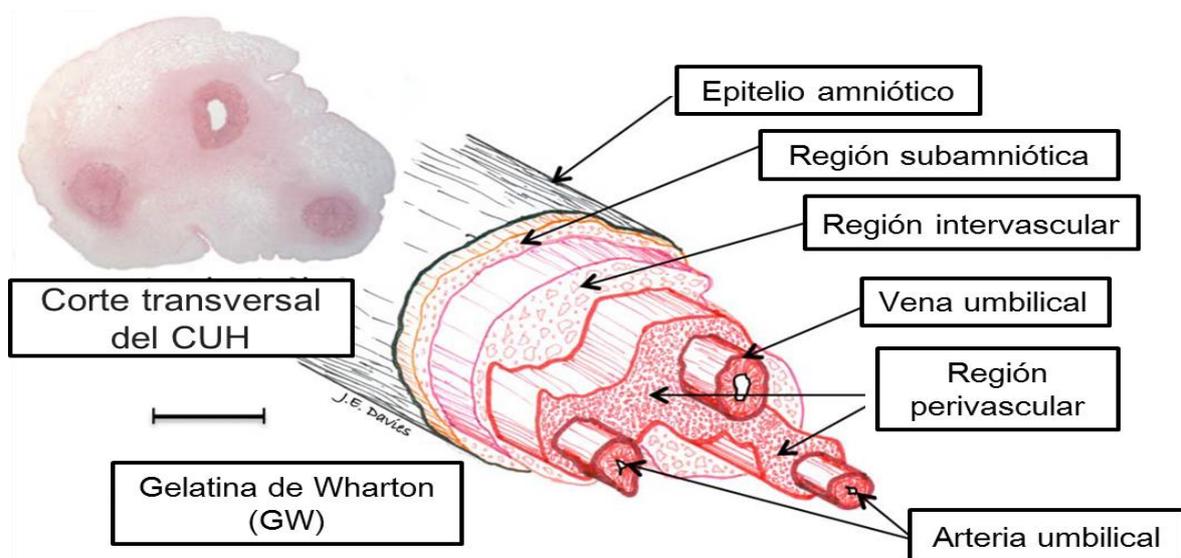


Fig. 5. Diagrama tridimensional de la estructura del cordón umbilical humano. Se aprecian la Gelatina de Wharton, vasos sanguíneos (arterias y vena) y el epitelio (Tomado y modificado de: Davies y col., 2017).

Estudios han propuestos que las CMMs provenientes de la GW, tienen propiedades únicas en comparación a células mesenquimales de otras fuentes. Se conoce que poseen características intermedias entre las células embrionarias y adultas, debido a la expresión de marcadores de ambos tipos celulares (Ilancheran y col., 2009), siendo consideradas, como células pluripotentes (Troyer y Weiss, 2008) y sugeridas como CMMs primitivas (Mitchell y col., 2003; Ma y col., 2005, Frausin y col., 2015; Oliver-Vila y col., 2015), logrando diferenciarse a células de origen no mesenquimal, como pulmonares, islotes de

células β -pancreáticas, células epiteliales corneales, cardiomiocitos y células nerviosas, entre otras (Woodbury y col., 2000; Pacini, 2013; Tantrawatpan y col., 2013; Consuelo y col., 2014; Kalaszczynska y Ferdyn, 2015; Drela y col., 2016). También, son células de fácil aislamiento a través de métodos no invasivos, con un potencial de proliferación celular mayor que las CMMs derivadas de otras fuentes (Chatzistamatiou y col., 2014; Drela y col., 2016), debido a factores, como el bFGF encontrados en la GW, que restaura la actividad de la telomerasa (Kurz y col., 2003). Por sus propiedades inmunomoduladoras han obtenido una creciente atención en el ámbito investigativo (Chen y col., 2016), presentando una baja expresión de moléculas del MHC clase I (Wu y col., 2007), y no expresan el MHC clase II (Chan y col., 2006), explicando la inhibición de respuestas inmunitaria. Por todas estas ventajas, constituyen una línea de investigación en el campo de la medicina regenerativa cuyo objetivo es la regeneración de órganos y tejidos (Riaño y col., 2007).

Neurogénesis *in vivo*.

El desarrollo del sistema nervioso se inicia con la formación del neuroectodermo (Cowan, 1987), el cual se engrosa en la línea media del embrión formando la placa neural (Moore y col., 2010). Posteriormente, la placa neural se invagina y sus extremidades laterales se fusionan originando el tubo neural. Por un proceso de proliferación y migración, se da origen al encéfalo y medula espinal (Gilbert, 2005; Moore y col., 2010). Con la formación del tubo neural y como resultado de pliegues, se desarrollan tres regiones vesiculares: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo separadas por constricciones (Purves y col., 2007; Rodríguez y col., 2012). Consecutivamente, se inicia la

generación y diferenciación celular del tubo neural, compuesto por células neuroepiteliales. Éste, siendo mitóticamente activo, produce neuroblastos por la acción de la proteína neurofibrilar y luego, a los glioblastos por efecto de la proteína glial fibrilar ácida, presentando propiedades y funciones distintas (Schuurmans y Guillemot, 2002; Purves y col., 2007; Rodríguez y col., 2015). Durante la proliferación celular del neuroepitelio, el núcleo es desplazado dentro de las células entre las membranas limitantes de la pared del tubo neural, provocando cambios morfológicos celulares, lo que da la característica de pseudoestratificado al neuroepitelio (Rodríguez y col., 2015).

Los neuroblastos son los precursores de los distintos tipos de neuronas (Fig. 6) (Schuurmans y Guillemot, 2002), que al perder su capacidad de proliferación se diferencian en neuroblastos bipolares, éstos mantienen contacto con las paredes del tubo neural. Posteriormente, los neuroblastos retraen su prolongación de la membrana limitante interna del tubo neural, convirtiéndose en neuroblastos unipolares. Al acumular grandes cantidades de retículo endoplasmático rugoso, las células inician la generación de múltiples extensiones, dando lugar a la formación de neuroblastos multipolares, que posteriormente se diferenciarán en dendritas y axones (Rodríguez y col., 2015). Estas células que pasan por las etapas unipolar, bipolar y multipolar llegan a ser neuronas maduras (Afifi y Bergman, 1999 citado en Calderón, 2007). Con respecto, a los glioblastos son los precursores de las células gliales (Schuurmans y Guillemot, 2002). De éstas se han identificado dos tipos distintos de astrocitos: los astrocitos fibrosos que tienen lugar esencialmente en la sustancia blanca, situados entre los axones de haces mielinizados y los astrocitos protoplásmicos encontrados principalmente en la sustancia gris

dispersa entre los cuerpos neuronales, constituyendo una gran proporción del volumen citoplasmático de la sustancia gris (Ross y Pawlina, 2007; Welsch y Sobotta, 2008). Al igual que los astrocitos, se tiene que los oligodendrocitos se generan a partir de células precursoras neurales pluripotentes del tubo neural (Billon y col., 2006), éstas células forman un tejido llamado oligodendroglia, encargadas de producir mielina dentro del SN que rodean los axones y dendritas en la sustancia blanca (Purves y col., 2006 citado en Calderón, 2007). Una vez que se han producido los glioblastos, ocurre la formación de las células endimarias, que cubren los espacios de las cavidades del sistema nervioso central (Purves y col., 2007).

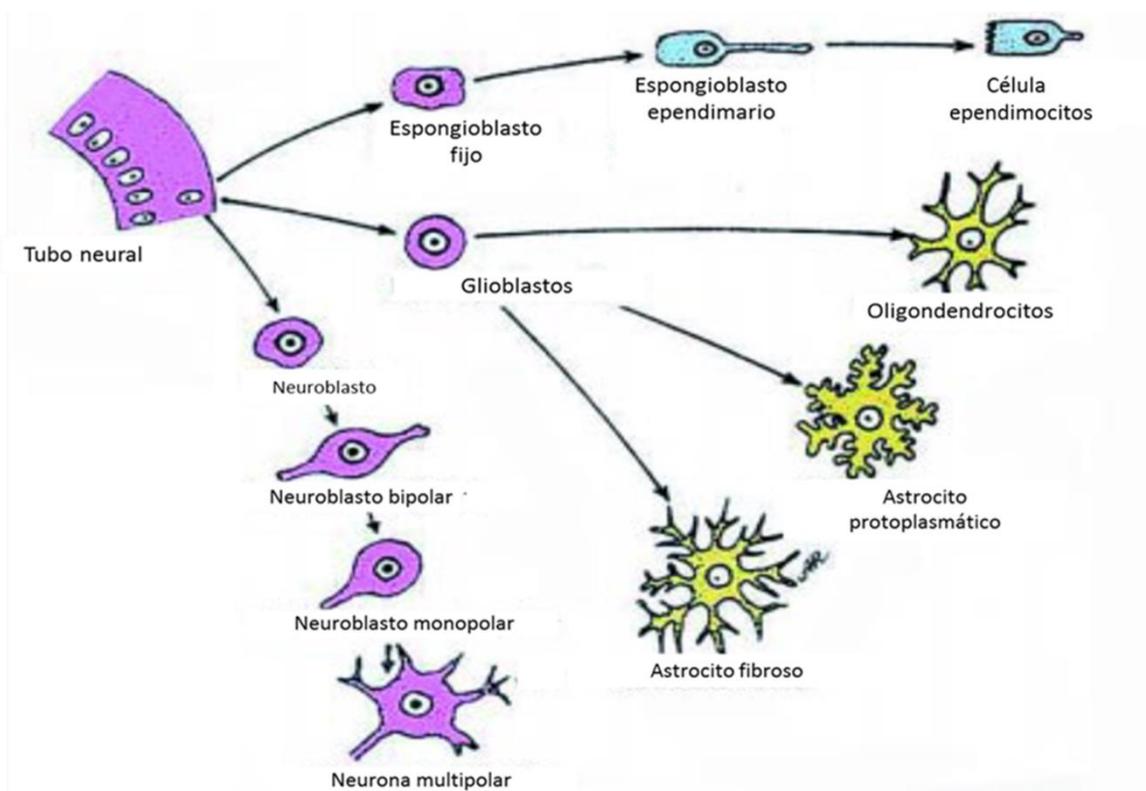


Fig. 6. Tipos celulares derivados del neuroepitelio del tubo neural. Se observan las células progenitoras y la diferenciación de las mismas alcanzando la madurez neuronal (Tomado y modificado de Rodríguez y col., 2015).

Concluido el periodo mitótico, inicia el periodo de migración neuronal, en donde las células postmitóticas dejan la zona ventricular del tubo neural y migran a las regiones que van a ocupar de manera definitiva con sus funciones específicas. Las células continúan proliferando y migrando de la zona ventricular, guiadas por células glías especializadas (Cowan, 1987), esta es una forma altamente especializada de locomoción celular dependiente de la relación entre las neuronas y la glía (Poch, 2001). La migración celular puede ocurrir de manera simultánea con la diferenciación celular. Las células postmitóticas que se encuentra migrando, inician el desarrollo de sus prolongaciones, extendiéndose hacia las regiones donde se establecerán (Rubenstein y Rakic, 2003).

Criopreservación de células madre.

Uno de los métodos más prometedores para el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de las células en cultivo (Day y Stacey, 2007), es el proceso de criopreservación, que consiste en la conservación del material celular, tejidos u órganos a temperaturas bajas, normalmente, a temperatura del nitrógeno líquido (-196°C) (Magaña, 2011). Uno de los tipos de criopreservación existente es la vitrificación, que es el proceso de solidificación de un líquido sin su cristalización, por lo cual el agua del tejido o célula permanece sin congelar en un estado no cristalino durante el enfriamiento, teniendo como objetivo la funcionalidad y mantenimiento de la viabilidad celular (Ávila-Portillo y col., 2006; López, 2015).

Se tiene que la estructura y composición de las membranas plasmáticas, determinan los eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de

criopreservación, siendo afectadas la difusión y ósmosis a través de las membranas por las bajas temperaturas. Asimismo, el proceso se ve afectado por diferentes variables, como la permeabilidad celular, volumen osmóticamente inactivo y relación superficie/área de la célula, la cual es variable de acuerdo a la especie, tipo y estadio de la célula a congelar (Ávila-Portillo y col., 2006).

El entender y aplicar la criopreservación del material biológico de manera adecuada, es sumamente importante para la creación de bancos de células, para esto se debe tomar en cuenta que cada célula maneja un perfil biofísico de interacción con diferentes CPO. Estos son significativos, al momento de brindar al material biológico las condiciones adecuadas para una alta supervivencia, debido a que evitan la formación de cristales de hielo intracelular y la destrucción celular por acción mecánica directa (Day y Stacey, 2007), por lo cual los CPO deben ser capaces de penetrar a la célula y de presentar una baja toxicidad. El CPO mayormente utilizado para la protección de las células durante la congelación es DMSO, este atraviesa la membrana celular de manera rápida (Ávila-Portillo y col., 2006). En un estudio realizado, se emplearon diversos CPO, como: polivinilpirrolidona, metilcelulosa y DMSO, con protocolos de congelación para la criopreservación de las CMMs, en este se concluyó que al utilizar una concentración del 10% de DMSO y efectuando etapas de enfriamiento lento, no se afectaba la viabilidad y capacidad de diferenciación celular (Hunt, 2011); sin embargo, en altas concentraciones pueden causar toxicidad a las células (Campos, 2014; Shivakumar y col., 2016). Otro extensamente usado es el Glicerol, empleado en distintos tipos de células, incluyendo el esperma de mamíferos (Rota y col., 2006; Rasul y col., 2007); mientras, el EG es usado para la criopreservación de tejido ováricos y embriones de especies (Rodríguez y col.,

2004). Estos crioprotectores permeables de bajo peso molecular, penetran la membrana celular, y reemplazan el volumen de agua intracelular evitando el daño producido por la formación de cristales, a su vez, manteniendo el volumen impidiendo el colapso celular por deshidratación (Rota y col., 2006).

Debido a la importancia que poseen las células madre y a su enorme potencial biomédico, en la última década ha habido una explosión en el número de CM aisladas de una variedad de tejidos embrionarios, fetales y adultos. En nuestro país, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental se están desarrollando proyectos de investigación que nos permite aislarlas, cultivarlas y ensayar métodos de diferenciación *in vitro* hacia linajes particulares que pueden tener aplicaciones en terapia celular, medicina regenerativa o ingeniería tisular (Merentes, 2009; Márquez y col., 2012; Merentes y col., 2012, Camejo y col., 2015; Merentes, 2016). Además, el estudio de estas células obtenidas de diferentes fuentes (MO, CUH, tejido adiposo, pulpa dentaria) permitirá crear modelos *in vitro* que contribuyan al conocimiento de los mecanismos de especialización y autorenovación celular (Merentes, 2009).

En el presente trabajo, se muestran los resultados acerca de la obtención de las células provenientes del cordón umbilical humano, su establecimiento en cultivo; además, de las características morfológicas, viabilidad y diferenciación celular, antes y después de la criopreservación por el método de vitrificación, demostrándose que el cordón umbilical es una fuente de células madre.

ANTECEDENTES

Una de las primeras células madre conocidas, fueron obtenidas a partir de la MO de rata despertando gran interés, debido a su gran plasticidad, su fácil cultivo y crecimiento *in vitro*. Estas fueron aisladas de una población celular, con capacidad de formar hueso (Friedenstein y col., 1966). Luego, en 1976 se describió a estas células con capacidad de adherencia al plástico y de ser cultivadas durante tiempo indefinido. Además, de tener la capacidad de diferenciarse a células de tejidos mesenquimales, como: hueso, cartílago, músculo, tendón, grasa y estroma medular (Friedenstein y col., 1976). A ésta población celular, se les propuso con el nombre de células madre mesenquimales (Caplan, 1991).

Célula madre del cordón umbilical humano.

Otra fuente de CMMs muy estudiada y convertidas en una alternativa de reemplazo de células madre embrionarias (Flores-Figueroa y col., 2006), son las derivadas del cordón umbilical humano. La población celular de la gelatina de Wharton, proveniente del CUH, se encuentra de forma dispersa y en menor proporción en comparación con los componentes de la matriz extracelular, encontrándose aisladas en una disposición determinada entre y alrededor de los vasos, siendo en el aislamiento inicial una población celular heterogénea (Dominici y col., 2006).

Para 1970, Parry realizó un análisis del CUH por técnicas de microscopía electrónica, observando que las CMMs presentaban diferentes morfologías dependiendo de la disposición del cordón umbilical, es decir, si este se encontraba colapsado o dilatado. Las células localizadas en la región dilatada presentaban un aspecto elongado, con orientación concéntrica; en cambio, las

células de la región colapsada presentaban un aspecto estrellado. En el año 1993, investigadores corroboraron lo obtenido por Parry, utilizando técnicas de inmunohistoquímica, observaron morfologías diferenciadas: unas de aspecto fusiforme o elongada, mientras otras de tipo estrellado; siendo ricas en organelos (mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi), así como vesículas pinocíticas y filamentos organizados. Las técnicas de inmunohistoquímica e inmunomarcaje revelaron que las CMMs eran positivas para actina, miosina, desmina, vimentina pero negativo para miosina del músculo liso (Takechi y col., 1993; Trivanović y col., 2013). En otro trabajo, se reportaron, células con una morfología similar a los fibroblastos, aislados a partir de la GW del CUH, determinando que estas células, tienen un fenotipo superficial similar, adherencia plástica múltiple y una mayor potencialidad que los de las CMMs, derivadas de otras fuentes (McElreavey y col., 1991; Wang y col., 2004). En otra investigación, se definió que se pueden obtener las CMMs de las distintas regiones del CUH, incluyen el epitelio de revestimiento, la región subamniótica, perivascular y la GW. Estas células presentan una gran capacidad de proliferación sin mostrar signos de senescencia en cultivos avanzados. Asimismo, se definió que las CMMs de la GW se mantienen en una fase embrionaria temprana con características primitivas, las cuales pueden diferenciarse en diversos tipos celulares (Watson y col., 2015).

Otro aspecto en la investigación de Wang y col., en el 2004, fue la determinación de marcadores de superficie de CMMs de la GW por citometría de flujo, reportando la expresión de receptores de matriz (CD44 y CD105), marcadores de integrinas (CD29 y CD51), marcadores de células madre mesenquimales (SH2 y SH3). También, se ha demostrado, que las CMMs

aisladas del CUH y MO, exhiben altos niveles de expresión del inmunofenotipo de CD29, CD44, CD51, CD73, CD90 y CD105, pero carecen de la expresión de marcadores CD34, CD45, CD11b, CD19 y HIA-D; indicando con esto, que no se encuentran contaminados con células hematopoyéticas o de origen endotelial (Kuleshova y col., 2009; Tantrawatpan y col., 2013). Otros estudios, realizados con las CMMs del endometrio de porcino definieron que estas mostraron una morfología similar a fibroblastos, siendo positivas para marcadores de superficie como: CD29, CD44, CD90, CD105, CD140b y CD144 (Subbarao y col., 2015).

Regiones de la gelatina de Wharton y epitelio del CUH.

Diferentes autores sostienen que la GW, consta de tres regiones (Can y Karahuseyinoglu, 2007; Troyer y Weiss, 2008), como: la perivascular, subamniótica e intervacular, en donde la población de células heterogéneas, no presentan una distribución uniforme en las región (Karahuseyinoglu y col., 2007). En otras investigaciones se han descrito, el aislamiento de células no hematopoyéticas a partir de la región perivascular del CUH, definiendo que es fácil obtener un número sustancial de CMMs después de varios pasajes, debido a un menor tiempo de duplicación y una amplia expansión in vitro, con un alto potencial proliferativo y capacidad de diferenciación a distintos fenotipos como: osteogénico, condrogénico y adipogénico (Sarugaser y col., 2005; Baksh y col., 2007). Además, fenotípicamente, se obtuvieron que hay dos tipos de células en la GW: tipo 1 y tipo 2, que expresaban filamentos de citoqueratina y vimentina respectivamente, en regiones distintas del cordón, siendo determinadas estas por determinación inmunohistoquímica. Se evidenció que no hubo diferencia en la potencialidad condrogénica, osteogénica y adipogénica, pero si en las células

del tipo 1 de la región perivascular, que en cultivos no pueden diferenciarse al linaje neurogenico (Karahuseyinoglu y col., 2007).

Con respecto a las células obtenidas a partir del epitelio de recubrimiento del CUH, en el 2004, Mizoguchi y col., para comprender su naturaleza obtuvieron células derivadas de esa región. Estas fueron cultivadas y diferenciadas hacia queratinocitos epidérmicos, los cuales se injertaron en ratones, lográndose formar un epitelio estratificado análogo al de la piel e incluso expresaron proteínas específicas de diferenciación, así como queratinas, proteínas asociadas con células cornificadas de la piel y proteínas de unión intercelular.

Obtención de células madre mesenquimales.

A través de los años, se han analizado distintas técnicas para la obtención de CMMs de la GW, conociendo que estas pueden afectar la cantidad y la calidad de las células aisladas. En el 2012, se compararon cuatro métodos de aislamiento: tres métodos enzimáticos; colagenasa-hialuronidasa-tripsina, colagenasa-tripsina, la tripsina, y un método de cultivo por explante. Se concluyó, que utilizando la mezcla de colagenasa-tripsina, se produce un mayor rendimiento celular que otros, mientras que el método por explante, resulta en una tasa de proliferación celular con una actividad más alta en comparación con los otros métodos (Salehinejad y col., 2012). Como ya se ha mencionado, el aislamiento de CMMs de GW, se ha realizado de muchas maneras, en un trabajo realizado por Hendijani y col., en el 2014, las CMMs se obtuvieron por el método de explante usando todo el CUH o solo la GW, ambos presentaron características similares en su morfología, tiempo de duplicación, viabilidad celular después de la descongelación, así como en la diferenciación en linajes

mesodérmicos, sin embargo, las CMMs obtenidas de todo el CUH, se lograron aislar en un menor tiempo de aislamiento en comparación con las obtenidas a partir de la gelatina de Wharton.

En el 2013, Trivanović y col., aislaron las CMMs de la sangre periférica y GW, por medio de la adhesión al plástico después de separación por gradiente de densidad y por el método de explante. En donde realizaron una comparación con respecto a la morfología, eficacia clonogénica, tasas de proliferación, inmunofenotipo y potencial de diferenciación. Estos observaron diferencias significativas en la capacidad clonogénica y en el inmunofenotipo, debido a que las células a partir de la GW mostraron una mayor eficacia de clonación de UFC-F, con una mayor expresión de marcadores embrionarios, como: Nanog, Sox2, SSEA4 concluyendo que estas células pueden ser utilizadas en aplicaciones de terapia celular. En el 2017, Araujo y col., realizaron la comparación de las características biológicas de las CMMs de la membrana amniótica, membrana coriónica, decidual placentaria y cordón umbilical, con la finalidad de determinar la mejor fuente para la terapia celular. Se evaluaron los índices de polaridad, complejidad celular, cinética de crecimiento, inmunofenotipo y diferenciación celular. En conjunto, se determinó que las células del CUH, DP y MC, presentaron una capacidad de crecimiento similar hasta el 8^{to} subcultivo. Además, definieron que las CMMs de la MC y CUH son buenas opciones para su uso en terapia celular.

Criopreservación de células mesenquimales.

En el año 2007, se obtuvieron células mesenquimales a partir de la gelatina de Wharton y la región perivascular del CUH, por el método de

disgregación enzimática y explantes. La población celular se sometió a estudios morfológicos, inmunocitoquímicos, de proliferación celular, criopreservación y potencialidad de diferenciación hacia linaje miogénico y neural. En este, se reportó que la criopreservación realizada con Glicerol al 10%, no afectó la viabilidad de las células (Calderón, 2007). Posteriormente, se demostró que la viabilidad celular después de la criopreservación con 10% de DMSO de las CMMs de la GW y el tejido adiposo adulto, fue alta y muy similar en ambos tejidos (Christodoulou y col., 2013).

En un estudio realizado por Shivakumar y col., en el 2016, se evaluó el efecto comparativo de dos diferentes crioprotectores compuesto de: 1) DMSO y 2) una solución crioprotectora compuesta con glucosa, sacarosa y EG, sobre el comportamiento de las células antes y después de un proceso de criopreservación de la GW por un período de 3 meses. Las características de crecimiento y el comportamiento de células mesenquimales de la GW del tejido criopreservado y no criopreservado, fueron comparados mostrando que mantuvieron la expresión de marcadores de superficie, presencia de factores pluripotentes y diferenciaron *in vitro* en osteocitos, adipocitos, condrocitos y hepatocitos. Se concluyó, que la solución crioprotectora mostraba un mayor porcentaje de viabilidad celular después de la descongelación en comparación con el DMSO. Este trabajo sugirió que los CPO desempeñan un papel importante en la crioconservación de tejidos, los cuales son necesarios para la formación de bancos de células para futuras terapias celulares y medicina regenerativa.

En relación con la utilización del método de vitrificación, como método de criopreservación de las CMMs de la GW, se tiene que tanto, las células

descongeladas y no criopreservadas, mostraron morfología típicas fusiformes, con patrones constantes de antígenos de superficie, dando positivo para CD44, CD105, CD90 y negativo para CD34 y CD45, manteniendo su capacidad de diferenciación en tejidos mesodérmicos. Estas tres características similares para las CMMs descongeladas y no criopreservadas, proponen a la vitrificación como un método rápido y seguro de conservación, con una capacidad de almacenamiento a largo plazo (Massood y col., 2013).

Diferenciación de las células madre.

En diversos experimentos *in vitro*, se han demostrado la potencialidad de las células madres mesenquimales hacia el linaje mesodérmico, siendo capaces de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos (Wang y col., 2004; Can y Karahuseyinoglu, 2007; Karahuseyinoglu y col., 2007). Asimismo, se demostró la capacidad de diferenciación de estas células hacia el linaje miogénico, a partir de una inmunotinción contra desmina (Calderón, 2007).

Asimismo, ha sido demostrada la capacidad de diferenciación de las CMMs hacia el linaje neuronal. Bajo una estimulación adecuada *in vitro*, se logró diferenciar CMMs en células similares a neuronas, que exhibieron propiedades morfológicas y bioquímicas de células neuronales (Woodbury y col., 2000). Para el año 2003, se identificó al CUH, como una fuente accesible de CMMs primitivas. Estas células fueron inducidas a expresar el fenotipo neuronal, por medio del método de Woodbury. En la primera hora de tratamiento, las CMMs, desarrollaron cuerpos celulares redondeados con extensiones múltiples de neuritas, muy semejantes morfológicamente a las células madre neurales, estas se asemejaron a neuronas bipolares o multipolares a los 3 días (Mitchell y col., 2003). En presencia de factores de crecimiento, se logró diferenciar las células

madre mesenquimales de la médula ósea en tres fenotipos neuronales: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Hermann y col., 2004). En el año 2009, se indujo a la diferenciación de las CMMs del CUH a células neuronales, con la utilización del medio de diferenciación neural que contiene N2/B27, Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y medio neurobasal. Inicialmente, la gran mayoría eran de morfología tipo huso y células bipolares, las cuales a la tercera semana exhibieron cambios morfológicos a neuroesferas. La diferenciación neural se determinó por medio de la tinción inmunohistoquímica con la expresión de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) y el neurofilamento medio (NF-M) (Kuleshova y col., 2009). Balasubramanian y col., en el 2013 compararon la eficiencia de la generación de progenitores neuronales entre CMMs de tejido adiposo, medula ósea y gelatina de Wharton, las cuales se indujeron a neuroesferas usando el EFG y bFGF. Los datos sugieren que las CMMs derivadas de la WJ se inducen a progenitores neuronales con mayor eficiencia que las células derivadas del tejido adiposo y MO. En el 2016, varios autores definieron que las CMMs de la medula ósea expuestas a la gelatina durante el cultivo primario, mostraron una capacidad de diferenciación neurogénica mayor que las no expuestas, demostrando que la gelatina mejora directamente la diferenciación neurogénica en MSC derivadas de MO (Lee y col., 2016). Recientemente en el 2016, se demostró que las CMMs del CUH, pueden ser inducidas en células madre neurales en términos de características morfológicas, fenotípicas, y capacidades funcionales, planteándose que estas células pueden ser una fuente importante para terapias neurodegenerativas (Chen y col., 2016).

En nuestro laboratorio, trabajando con diferentes fuentes neonatales se ha demostrado la diferenciación del cordón umbilical humano al linaje neuronal con la caracterización histoquímica utilizando dos tinciones, como: violeta de Cresilo y por el método de Bielschowsky (Calderón, 2007). Además, se pudo evidenciar el potencial neurogénico de células mesenquimales de la membrana amniótica (Leiva, 2017).

Las CMMs diferenciadas hacia el linaje neuronal han expresado diversos marcadores neuronales típicos, como la nestina (característica de las células madre precursoras neuronales) y neuroD4 (Woodbury y col., 2000; Hermann y col., 2004; Kuleshova y col., 2009, lee y col., 2016). Además, expresaron proteínas de neuronas maduras como: III B-tubulina, neurofilamentos H, proteína asociada al crecimiento axonal, tirosina hidroxilasa; marcadores de oligodendrocitos y astrocitos; y altos niveles de marcadores neuroectodérmicos tempranas, como los genes proneurales NeuroD1, Neurog2, MSL1, Otx1, con pérdida de las características de las células del estroma mesodérmico (Mitchell y col., 2003; Hermann y col., 2004).

OBJETIVOS

Objetivo general.

Caracterizar las células madre mesenquimales derivadas del Cordón Umbilical Humano criopreservadas por vitrificación y evaluar su potencialidad de diferenciación neurogénica *in vitro*.

Objetivos específicos.

- Aislar y establecer los cultivos de células mesenquimales derivadas del cordón umbilical humano.
- Caracterizar morfológicamente las células madre mesenquimales.
- Evaluar la viabilidad celular y determinar la proliferación celular de las células mesenquimales, antes y después de la criopreservación.
- Inducir la diferenciación de las células mesenquimales hacia células del fenotipo neuronal.
- Evaluar la potencialidad de diferenciación de las células mesenquimales, hacia el fenotipo neuronal.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico.

Se procesaron siete cordones umbilicales de parto por cesárea de mujeres gestantes a término, las cuales aceptaron participar en el estudio mediante consentimiento informado y presentaron pruebas serológicas negativas para Hepatitis B, Hepatitis C, sífilis y VIH. Los cordones umbilicales fueron facilitados por la Clínica Jiménez Rojas por el Dr. Pedro Hurtado. Éstos se transportaron al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores ubicado en el IBE, en medio F12 (GIBCO) con 2% de antibióticos-antimicótico (100µg/ml de estreptomicina, 100 unidades/ml penicilina y 2,5 µg/ml anfotericina B) a una temperatura de 4°C. El material biológico sobrante fue descartado bajo los reglamentos del laboratorio.

Obtención de células derivadas del cordón umbilical humano y establecimiento de los cultivos primarios.

La manipulación del cordón umbilical, se realizó bajo condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar. El CUH fue seccionado entre 4 a 7 segmentos de una longitud de 3-5 cm. Posteriormente, se procedió a lavar repetidamente los segmentos obtenidos en PBS, colocándolos luego en medio F12 con 2% de antibióticos-antimicótico con dispasa (1,2 unidades/ml), manteniéndolos a una temperatura de 4°C por 18 horas.

Para el aislamiento de las células derivadas del CUH, se utilizó una combinación de enzimas, aplicando primero la enzima dispasa que actúa a nivel de la membrana basal del epitelio pudiendo separar células epiteliales derivadas del epitelio de recubrimiento del CUH y células mesenquimales provenientes del

subamnios. Seguidamente, se usó la enzima colagenasa tipo II en forma fraccionada separando las células mesenquimales presentes en la GW. A continuación, se describirá en detalle la metodología para la obtención de las células epiteliales y mesenquimales del CUH:

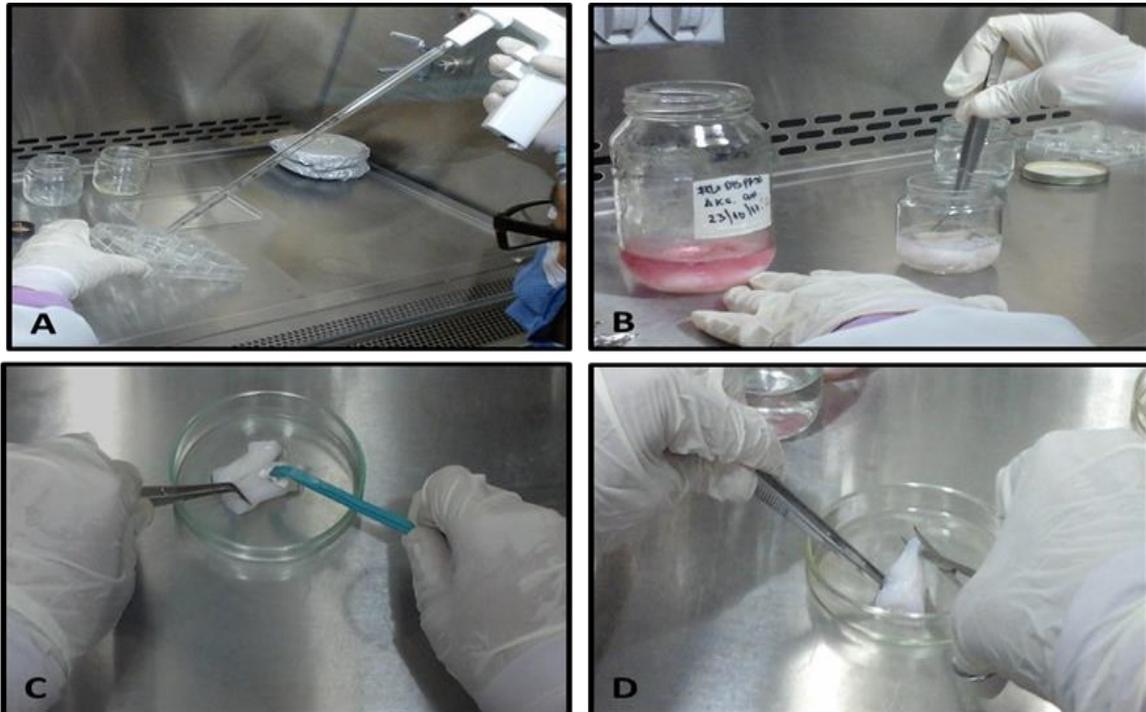


Fig. 7. Método para el aislamiento de células madre derivadas del CUH.

Posterior a la colocación de los segmentos de CUH en la enzima dispasa. A. Preparación de placas 3 x 2 con gelatina al 1% como superficie de sustrato de adhesión. B. Lavados repetitivos de los segmentos en solución PBS. C. Denudación del epitelio de revestimiento amniótico con rastrillo para la obtención de células epiteliales y células madre mesenquimales de la región subamniótica. D. Corte longitudinal a nivel de la vena cada uno de los segmentos.

Luego de que los segmentos del cordón umbilical estuvieron en presencia de la enzima dispasa (Fig. 7), se denudo el epitelio amniótico mediante un rastrillo para la obtención de las células. Estas fueron resuspendidas en medio nutritivo DMEM: F12 suplementado con 15% Suero Fetal Bovino, 1%

antibióticos-antimicótico (100µg/ml de estreptomicina, 100 unidades/ml penicilina y 2,5 µg/ml anfotericina B), 2mM de L-Glutamina, centrifugando por 5-10 minutos a 2500 rpm. Pasado este tiempo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio nutritivo. Finalmente, se sembraron las células obtenidas en placas multipozos 3 x 2, previamente cubiertas con gelatina al 1% como superficie de adhesión llevando a incubación a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

Posteriormente, para la realización de la disgregación enzimática fraccionada, se procedió a cortar longitudinalmente a nivel de la vena, los segmentos del CUH previamente rastrillados, y de manera inmediata, se realizó la disgregación mecánica de la GW, hasta obtener trozos pequeños. Estos fueron colocados en una fiola con tapa, agregando Tripsina 0,125% (GIBCO) – EDTA 0,0625% y llevando a incubación a 37°C por 30 minutos con agitación magnética. Pasado el tiempo, se descarta el sobrenadante y se continuó con la disgregación enzimática en dos tiempos, de los cuales se obtuvieron la 1^{ra} y 2^{da} fracción celular. Para esto, se agregó la enzima colagenasa tipo II a 1mg/ml (actividad 295 unidades/mg) llevándose a incubación a 37°C por 30 minutos con agitación magnética. Luego, fue trasvasado el sobrenadante a tubos de centrifuga, agregando medio nutritivo DMEM: F12 suplementado y centrifugando en frío por 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante obtenido fue descartado y el taco celular se resuspendió en medio nutritivo; trasvasando la suspensión celular a tubos de centrífuga, realizando una nueva centrifugación por 5 minutos a 2500 rpm. Transcurrido el tiempo, fue descartado el sobrenadante y se resuspendió el taco celular con medio nutritivo DMEM: F12 suplementado. Finalmente, las

células se sembraron en las placas multipozos 3 x 2, incubando a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

En cada proceso de disgregación enzimática se realizó un conteo celular para determinar el número de células viables, con el método de azul de tripano en la cámara de Neubauer.

Subcultivos celulares.

Los cultivos primarios obtenidos, se sometieron a un proceso de tripsinización, al observarse el 80-90% de confluencia en el microscopio invertido de contraste de fase Olympus IX50. Para esto, fue descartado el medio de cultivo y se realizaron lavados con PBS, eliminando los restos celulares. Luego, se añadió la mezcla enzimática Tripsina 0,125% (GIBCO) - EDTA 0,02% hasta cubrir la superficie celular, llevando a incubación a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por 5 minutos. Consecutivamente, fue verificado en el microscopio invertido el desprendimiento celular de la superficie, agregando el medio DMEM: F12 suplementado para inactivar la acción de la enzima. La suspensión celular, se centrifugó por 5 minutos a 2500 rpm; luego, se descartó el sobrenadante, y resuspendieron las células en medio nutritivo DMEM: F12 suplementado. Finalmente, se contaron y se llevó a cabo la siembra de las células, usando como medio de cultivo DMEM: F12 suplementado e incubándolas a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

Caracterización de las células derivadas del CUH.

Se realizó la caracterización de los cultivos de CMMs antes y después de la criopreservación. Para esto, se hicieron observaciones periódicas en el microscopio invertido de fases, acoplado a una computadora con el programa WinTvr3, tomando los registros fotográficos correspondientes. Además, se

realizó la coloración de rutina May-Grunwald-Giemsa, la cual se basa en teñir diferencialmente el citoplasma y el núcleo de las células (Leeson y col., 1990).

Caracterización de las células madre mesenquimales con la coloración de rutina May-Grunwald-Giemsa.

La mayoría de los cortes histológicos se tiñen con un colorante básico y ácido combinados, con respecto a la May-Grunwald-Giemsa se utiliza la combinación de dos colorantes: eosina y azul de metileno. Estas forman sales insolubles de diferentes coloraciones, permitiendo observar las características propias de las células (Leeson y col., 1990; García y col., 2006; Merentes, 2016).

Se procedió a realizar lavados con la solución PBS a los subcultivos obtenidos, fijando las células con metanol por 5 minutos. Para la tinción, se agregó a las células el colorante May-Grünwald (MERCK) por 5 minutos. Luego, se eliminó el exceso y tiñeron las células, con el colorante Giemsa (MERCK) diluido (1:18) por 20 minutos. Posteriormente, se realizó el proceso de deshidratación celular, a través de una batería de acetona-xileno (1:0, 2:1, 1:2 y 0:1). Consecutivamente, fue montada la laminilla del tubo de Leighton en un portaobjeto, empleando medio de montaje Permunt (Merentes, 2016). Finalmente, se identificó y procedió a observar en el microscopio óptico de luz y el microscopio invertido de contraste de fases, para la toma de registros correspondientes.

Caracterización inmunocitoquímica de las células derivadas del CUH.

Este método consiste en la detección y localización de antígenos *in situ*, utilizando anticuerpos como reactivos específicos reconocidos por el antígeno (Paniagua y col., 2007; Montuenga y col., 2009).

Las células provenientes del cordón umbilical humano, se caracterizaron utilizando como marcador molecular el anticuerpo monoclonal contra la proteína Vimentina (1:100; Santa Cruz Biotechnology), siendo esta proteína específica de las células mesenquimales. El revelado del marcaje, fue realizado usando el sistema inmunocitoquímica Mouse ABC Staining System: SC-2017 de Santa Cruz. La reacción final, fue revelada con una solución de Diaminobencidina (DAB) al 0,05%. Los registros se realizaron en el microscopio de luz.

Criopreservación y descongelación celular.

La criopreservación por vitrificación, se realizó utilizando una modificación del protocolo desarrollado por Moon y col., (2008). Para esto, se utilizó dos soluciones: 1) Solución de equilibrio al 20% de EG y 2) Solución de vitrificación al 40% EG, 18% Ficoll 70, 0,3 M Sacarosa. Las soluciones fueron preparadas en solución PBS con 20% de SFB. Las células se criopreservaron a una densidad de 1×10^6 células por criotubo.

Para la criopreservación celular, se realizó la tripsinización de los cultivos mediante la acción de la mezcla enzimática Tripsina 0,125% (GIBCO) - EDTA 0,02%. Luego, se procedió a realizar los pasos mencionados en el subcultivo celular. Una vez contadas las células, estas se resuspendieron en 50 μ l de solución de equilibrio por 5 minutos y luego, se añadió 500 μ l de solución de vitrificación por 40 segundos. Posteriormente, la suspensión celular, fue colocada en viales para criopreservación (criotubo de 1,2 ml) trasladándose al tanque de nitrógeno líquido, para su almacenamiento.

Las células se descongelaron después de un período de tiempo, para esto fueron colocados los criotubos en baño de maría a 37°C. Luego, se trasvaso la suspensión celular a un tubo de centrifuga, resuspendiendo en

solución de sacarosa a diferentes concentraciones 0.5 M, 0.25 M y 0 M en PBS con 20% SFB, y sometiendo a centrifugación por 5 minutos a 2500 rpm en cada concentración. Pasado el tiempo, fue descartado el sobrenadante y se resuspendió el taco celular en medio DMEM: F12 suplementado. Posteriormente, se evaluó el % de viabilidad celular, con el método de azul de tripano. Esta molécula de gran peso molecular sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada, por lo que una célula viva se observará traslucida mientras que una célula con la membrana dañada se coloreará de azul (Schmidt, 1979). El conteo celular se realizó en la cámara de Neubauer, determinándose el % de viabilidad celular con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad} = \left[\frac{\text{N}^{\circ} \text{ células vivas}}{\text{No células vivas} + \text{células muertas}} \right] \times 100$$

Finalmente, las células se sembraron y llevaron a incubación a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Se caracterizaron morfológicamente los cultivos obtenidos después de la criopreservación por medio de observaciones periódicos al microscopio invertido de fases. Además, con la coloración de rutina May-Grunwald-Giemsa y por medio del inmunomarcaje de la proteína vimentina (anteriormente señalados).

Determinación de la proliferación celular por el método de MTT.

Para la determinación de la proliferación celular (Fig. 8), se utilizó el método de MTT (3-(4,5-Dimetil, tiazol-2-yl)-2,5-bromuro de Difeniltetrazolium) desarrollado por Mossman en 1983, en donde se emplea la sal de tetrazolium soluble en agua, que al ser reducida por la acción de las enzimas deshidrogenasas encontradas en las mitocondrias de células vivas, pasa a formar un cristal insoluble morado denominado formazan, el cual se produce por

el rompimiento del anillo de tetrazolium, quedando atrapado en el interior de la célula. Este método permite la cuantificación del crecimiento celular a través de la densidad óptica (Mossman, 1983).

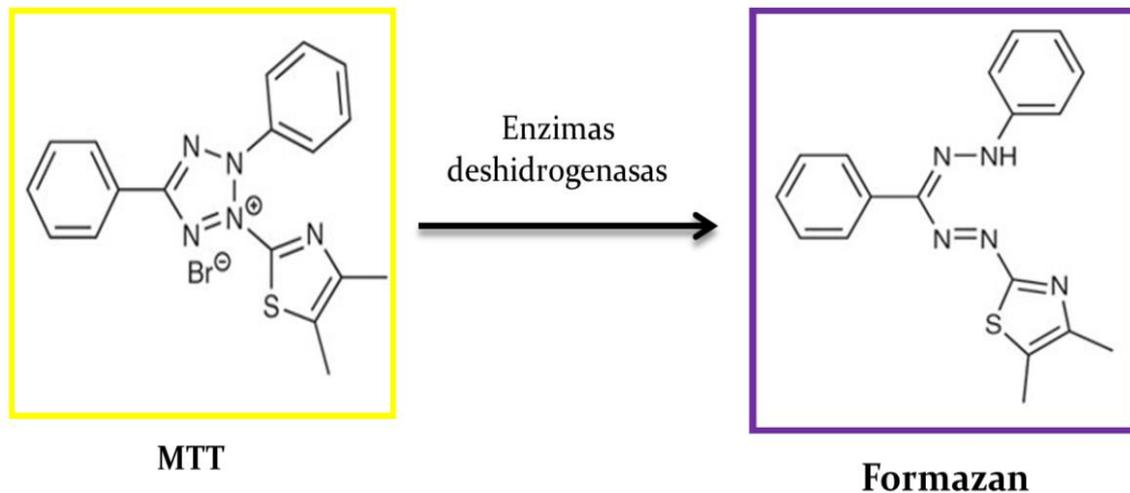


Fig. 8. Transformación del MTT a formazan por las enzimas deshidrogenasa (Tomado y modificado de Jaswir y col., 2011).

Para evaluar el crecimiento *in vitro*, las células madre mesenquimales antes y después del proceso de criopreservación fueron sembradas en placas de 96 pozos, a una densidad de 4×10^3 células/pozos en medio nutritivo y llevándose a incubación a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Paso seguido, se retiró el medio de cultivo a los 2, 4 y 7 días, añadiendo a cada pozo el MTT (disuelto en PBS a 0.4 µg/ml). Nuevamente, se llevó a incubación a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por 3 horas. Transcurrido el tiempo, se descartó el MTT y se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) en oscuridad. La lectura de las placas fue realizada en un lector de espectrofotómetro (ELISA) a una longitud de onda de 570nm (Mossman, 1983). Consecutivamente, para el análisis estadístico, se realizó la prueba paramétrica t-student, para evaluar el

efecto del tiempo sobre la densidad celular. El nivel de significación fue de $p < 0.05$.

Diferenciación neural de las células derivadas del CUH.

Las células obtenidas a partir del CUH se sembraron a una densidad de 8×10^4 células/pozos en placas de 3x4, en donde se cubrieron con gelatina al 1% como superficie de diferenciación en 2/3 de los pozos (Fig. 9).

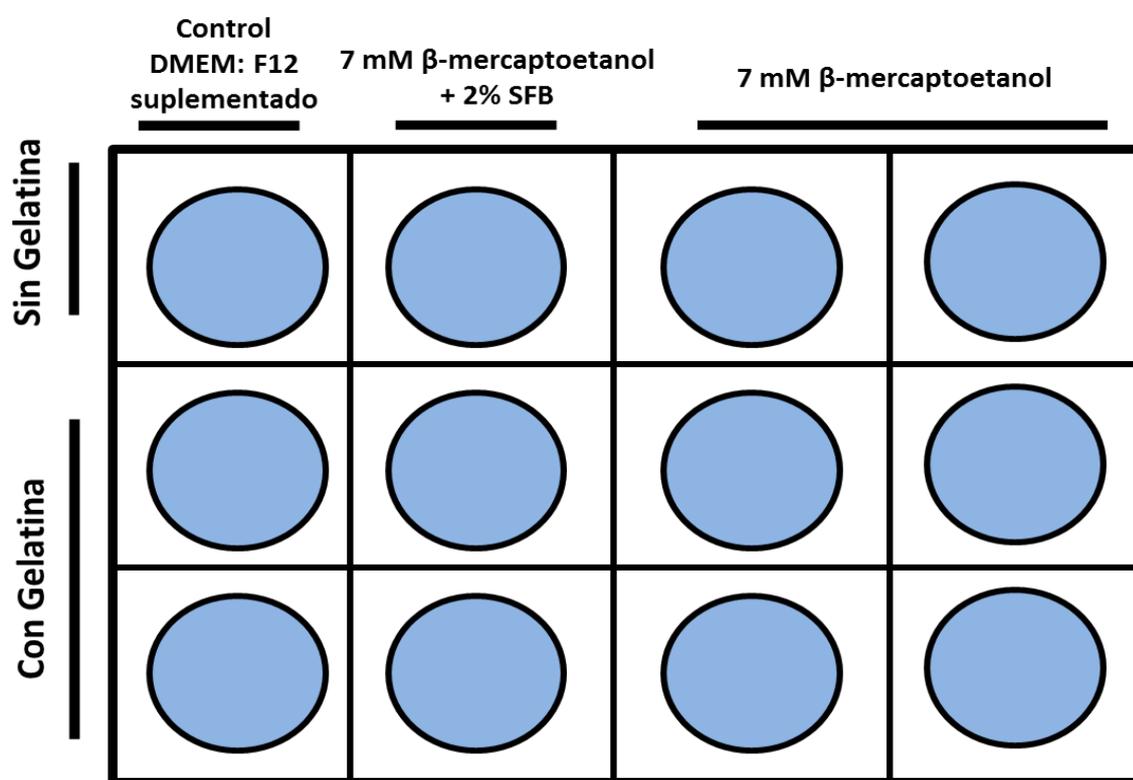


Fig. 9. Diagrama de distribución de los tratamientos utilizados en la diferenciación celular.

Transcurrido un día, se añadió al cultivo el medio preinductor por 24 horas. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS libre de calcio y magnesio, agregando los medios inductores por un tiempo máximo de 7 horas (Tabla 1). Se efectuaron registros periódicos al microscopio invertido de fase cada 2 o 3 horas.

Tabla 1. Composición de los medios utilizados en la diferenciación neurogénica *in vitro*.

Diferenciación celular	Medio	Suplemento
Control	DMEM:F12	15% SFB, 1% de antibiótico-antimicótico, 2mM L-Glutamina
Medio preinductor		20% SFB, 1 mM β -mercaptoetanol
Medio inductor		a. 2% SFB, 7 mM β -mercaptoetanol b. Sin SFB, 7 mM β -mercaptoetanol

Caracterización histoquímica de células diferenciadas al linaje neural.

Para la caracterización de las células diferenciadas hacia el fenotipo neural, fueron realizadas coloraciones histoquímicas que permitieron evidenciar la diferenciación fenotípica de las células neuronales.

Una de las coloraciones empleadas, fue la tinción con sales de plata utilizando el método de Bielschowsky para neurofibrillas (Mallory, 1961), este se basa en la impregnación argéntica (nitrato de plata, AgNO_3) de las células, la cual es reducida por algunos componentes celulares a un estado metálico insoluble dando lugar a depósitos estables de plata metálica (Fig. 10), permitiendo evidenciar los diferentes grados de argirofilia en los elementos celulares contenidos en las neuronas, evidenciándose selectivamente la neurofibrillas en los axones, soma y dendrita (Manzano y col., 2014). Este consistió, en el tratamiento de las células con una solución de Nitrato de Plata al 20% a 37°C por 20 minutos. Luego, esta solución se reemplazó por una solución de Plata amoniacal, constituida por una mezcla de nitrato de plata e hidróxido de amonio concentrado (proporción 1:2), y llevando a incubación en oscuridad a

37°C durante 15 minutos. Posteriormente, se descartó la solución y las placas fueron incubadas en una solución de Hidróxido de Amonio al 1% en oscuridad a 37°C por 3 minutos. A continuación, se agregó la solución desarrolladora (formalina al 10% sin estabilizar, agua destilada, ácido nítrico y ácido cítrico) durante 8 minutos y a continuación, se añadió hidróxido de amonio al 1% por 3 minutos. El revelado fue realizado utilizando una solución de tiosulfito de sodio al 5% por 5 minutos, y consecutivamente se realizaron 3 lavados con agua destilada, para tomar los registros fotográficos empleando un microscopio óptico de luz.

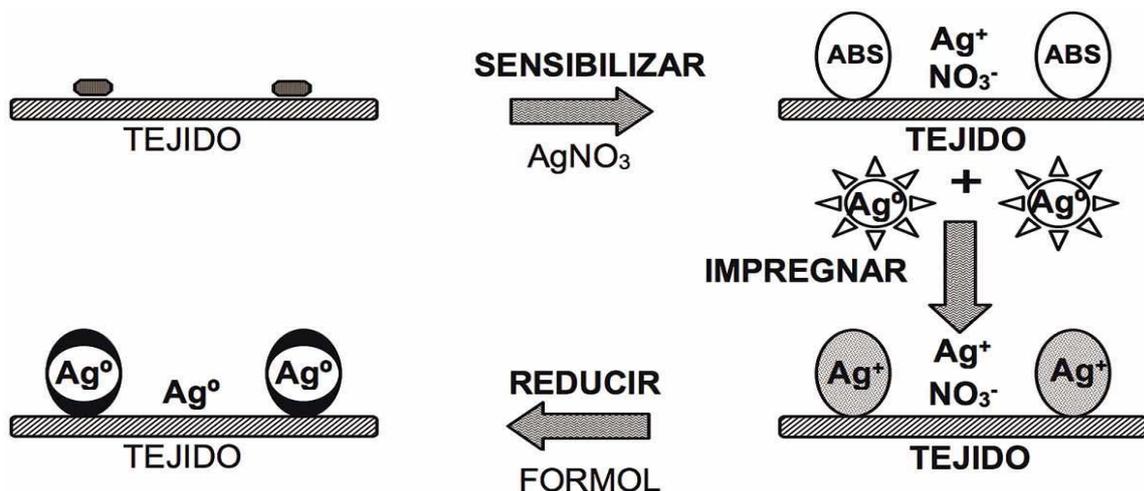


Fig. 10. Esquema de la impregnación de argéntica con nitrato de plata (Tomado de Manzano y col., 2014).

También, se realizó la tinción Violeta de Cresilo que permite determinar la presencia de la sustancia Nissl de las células diferenciadas, usando un colorante básico (azul de toluidina, azul de metileno o violeta de cresilo) para teñir el retículo endoplásmico rugoso (RER) encontrado en las neuronas (Kunkel, 2005), propiamente reacciona con los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos. La sustancia de Nissl aparece de un color azul oscuro debido a la tinción de ARN ribosómico, dando al citoplasma un aspecto moteado. Después de que las

células fueron fijadas en metanol al 100%, se realizaron lavados con PBS. Posteriormente, las células se tiñeron con una solución diaria de Violeta de Cresilo al 0.02%, compuesta de la solución matriz de Violeta de Cresilo al 2% en combinación con la solución estabilizadora de acetato de sodio (1:100). Luego, se descartó el colorante y se realizaron los registros necesarios en el microscopio invertido de fases.

Caracterización inmunocitoquímica de la diferenciación neurogénica.

Para la determinación de la presencia de células canalizadas hacia el linaje neural en los cultivos, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos usando un anticuerpo en contra de neurofibrillas de NF-M (SIGMA, Clone RMO44) a una dilución de 1:100. Estas células fueron fijadas con metanol por 5 minutos, para su posterior marcaje. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó un lavado con PBS por 30 minutos a las células fijadas, para después colocarle una solución de H₂O₂ al 3% diluido en PBS por un tiempo de 10 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos y se llevó a incubación con el anticuerpo primario en cámara húmeda durante toda la noche. Transcurrido el tiempo, se realizaron lavados por 5 minutos y se colocó el anticuerpo secundario por un tiempo de 30 minutos. Consecutivamente, fue realizado el revelado del marcaje utilizando el sistema inmunocitoquímica Mouse ABC Staining System: SC-2017 de Santa Cruz. Para esto, se procedió a evidenciar la reacción del anticuerpo con Diaminobencidina por 10 minutos, contrastando los núcleos con Hematoxilina, montando inmediatamente las placas en un portaobjeto con el medio de montaje Permount. A continuación, se realizaron los registros necesarios en el microscopio óptico de luz.

RESULTADOS

Aislamiento y obtención de las células derivadas a partir del CUH.

El primer objetivo planteado fue la obtención y aislamiento de las células provenientes del CUH, que consistió en la digestión con diversas enzimas. Los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento y viabilidad celular se plantean en la tabla 1, en donde se logra observar que el mayor número de células aisladas, fue a partir de la 2^{da} fracción obtenida por la disgregación enzimática de la gelatina de Wharton con un $41,96 \times 10^4$ células, además, obteniéndose de forma general una alta viabilidad en un rango de 95,77 a 97,13% en las distintas condiciones de aislamiento.

Tabla 2. Rendimiento y viabilidad celular obtenidos a partir del CUH por el método de disgregación enzimática. Expresado en media \pm SD.

Enzima	Dispasa	Colagenasa tipo II	
		1 ^{era} fracción	2 ^{da} fracción
Tiempo de digestión	18 horas	40-45 minutos	
Rendimiento celular	$12,16 \times 10^4$	$29,7 \times 10^4$	$41,96 \times 10^4$
% viabilidad celular	97,13 (SD \pm 0,96)	96,07 (SD \pm 0,46)	95,77 (SD \pm 0,76)

Establecimiento del cultivo primario de las células derivadas a partir del CUH.

Para establecer el cultivo primario se procesaron siete muestras de cordón umbilical provenientes de parto por cesárea, a partir del cual se obtuvo

una eficiencia en el establecimiento de un 71,43% (n=7), demostrándose que las células mantienen su capacidad de proliferación después de la acción enzimática. Con respecto a los cultivos primarios de las otras muestras de CUH procesadas (n=2), no hubo crecimiento y sólo se observaron células senescentes con el citoplasma vacuolado.

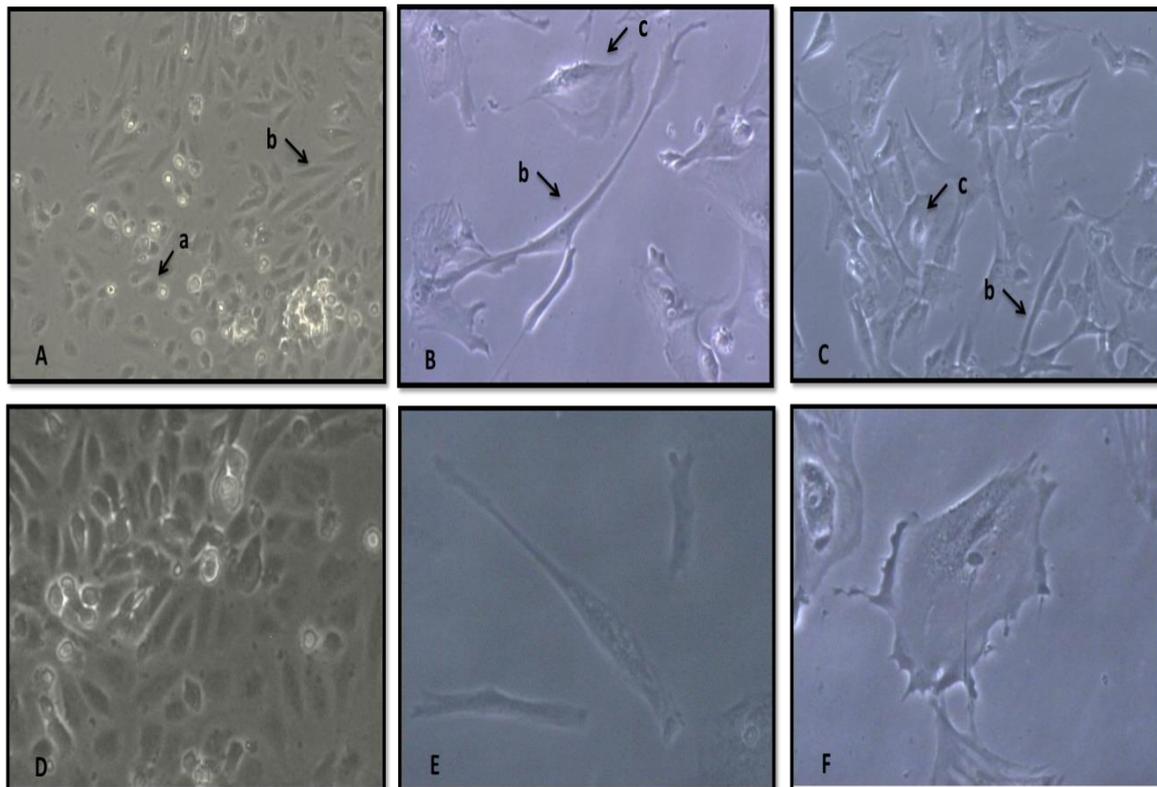


Fig. 11. Cultivo primario de células derivadas del cordón umbilical humano observadas al microscopio invertido de fases. A. Células obtenidas a partir del denudamiento del epitelio de recubrimiento a dos días del cultivo. B-C. Células derivadas de la gelatina de Wharton a los trece días de cultivo. B. 1^{ra} Fracción celular. C. 2^{da} Fracción celular. A-C. 100x. D. Detalle de colonias células epiteliales. E. Célula de tipo fibroblasto. F. Detalle de célula de amplio volumen citoplasmático. D-F. 200x. a: célula epitelial. b: célula tipo fibroblasto. c: célula de amplio volumen citoplasmático.

Los cultivos primarios se apreciaron con un alto grado de heterogeneidad morfológica, en donde las células obtenidas del denudamiento del epitelio de

recubrimiento del CUH, mostraron principalmente dos fenotipos: a) células de morfología poliédrica similares a células epiteliales y b) células del tipo fibroblasto provenientes de la región subamniótica (Fig. 11A), con diferencias morfológicas observables en el cultivo, siendo las células epiteliales de menor tamaño con respecto a las de tipo fibroblasto. Asimismo, se evidenció que estas células epiteliales tienden a crecer formando colonias (Fig. 11D). Por otro lado, a partir de la disgregación enzimática fraccionada de la gelatina de Wharton, se obtuvieron: a) células de morfología tipo fibroblasto y b) otras de un amplio volumen citoplasmático (Fig. 11B-E). En los cultivos a baja densidad se puede observar como las células del tipo fibroblasto extendían sus prolongaciones para interactuar con células adyacentes (Fig. 11B-C), favoreciendo la proliferación celular.

Establecimiento de los subcultivos de las células derivadas a partir del cordón umbilical humano.

Alrededor de 12 a 15 días del cultivo primario se observaba una confluencia celular en monocapa (Fig. 12), en su gran mayoría por células del tipo fibroblasto, donde bajo las condiciones de cultivo estas células proliferaban rápidamente.

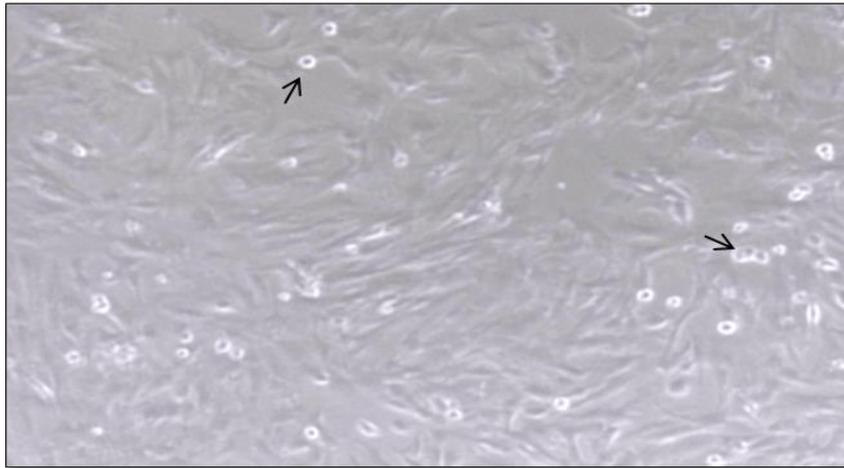


Fig. 12. Cultivo primario obtenido a partir de la disgregación enzimática con la enzima colagenasa tipo II de la gelatina de Wharton a los 12 días de cultivo. Se observan en su gran mayoría células del tipo fibroblasto con muchas células en división. Microscopio invertido de contraste de fases. 40x.

Para la amplificación y mantenimiento de las células del cultivo, se llevó a cabo el proceso de tripsinización al observarse un 80-90% de confluencia celular, evitándose la inhibición por contacto del crecimiento celular. En los subcultivos, se logró apreciar una disminución de la heterogeneidad, en cuanto a las células provenientes de la GW, este cambio se evidenció por un incremento de las células del tipo fibroblasto a partir del 4^{to} subcultivo en comparación con las células de amplio volumen citoplasmático, las cuales disminuyeron en los subsiguientes pasajes. Las células mesenquimales se mantuvieron por un máximo de siete pasajes (Fig. 13) sin mostrar cambios morfológicos asociados a la senescencia, alcanzando una confluencia entre 5 a 6 días de cultivos. Con respecto a las células provenientes del epitelio de recubrimiento del CUH, en los subcultivos no se lograron apreciar las células epiteliales, en cambio, se observó

un crecimiento celular de las células mesenquimales provenientes de la región subamniótica (Fig. 13A).

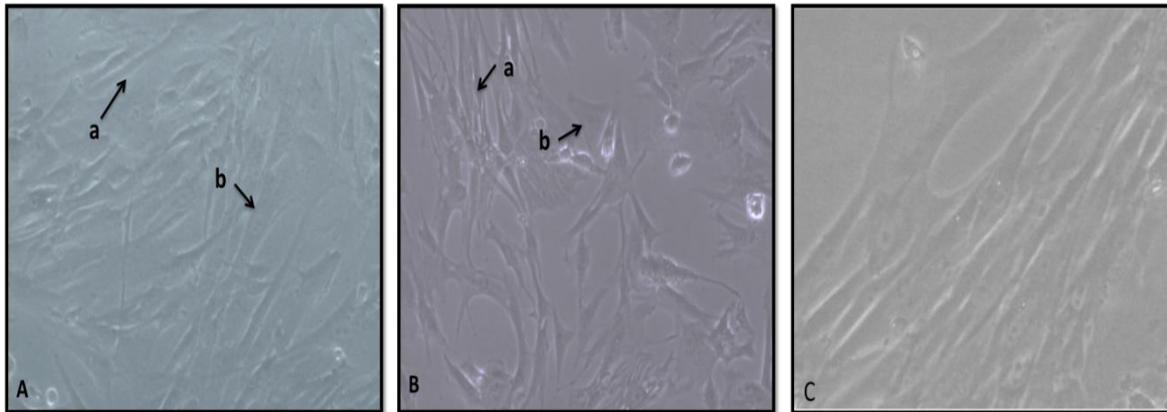


Fig. 13. Subcultivos de células mesenquimales del CUH observadas en el microscopio de contraste de fases. A. Población celular heterogénea, 2^{do} subcultivo a los 3 días. B. Se observa una población más homogénea con células del tipo fibroblasto, 4^{to} subcultivo a los 7 días. A-B. 100x. C. Células mesenquimales, 7^{mo} subcultivo a los 10 días. 200x. a: células tipo fibroblasto. b: células con amplio volumen citoplasmático.

Caracterización de las células derivadas del CUH.

Después del establecimiento de las células mesenquimales, se procedió a realizar la caracterización celular a partir del estudio morfológico, por medio de las observaciones periódicas con el microscopio de contraste de fases y con la coloración de rutina May-Grunwald-Giemsa. Además, del inmunomarcaje contra la proteína vimentina. En donde, se obtuvo que las células mantuvieron las características morfológicas después del proceso de vitrificación (Fig. 14), sin mostrar rasgos aparentes de senescencia.

Caracterización morfológica de las células del cordón umbilical humano.

Al evaluar las características morfológicas de las células provenientes de la GW, se confirmó que estas presentaban dos tipos de fenotipos celulares: a)

célula del tipo fibroblasto con citoplasma ahusado basófilo, núcleo ovalado y prominente localizados en la región engrosada del citoplasma y algunos con varios nucléolos fuertemente basófilos y b) célula con citoplasma ancho, de amplio volumen con una coloración basófila, núcleo excéntrico y nucléolos intensamente basófilos (Fig. 14C-F).

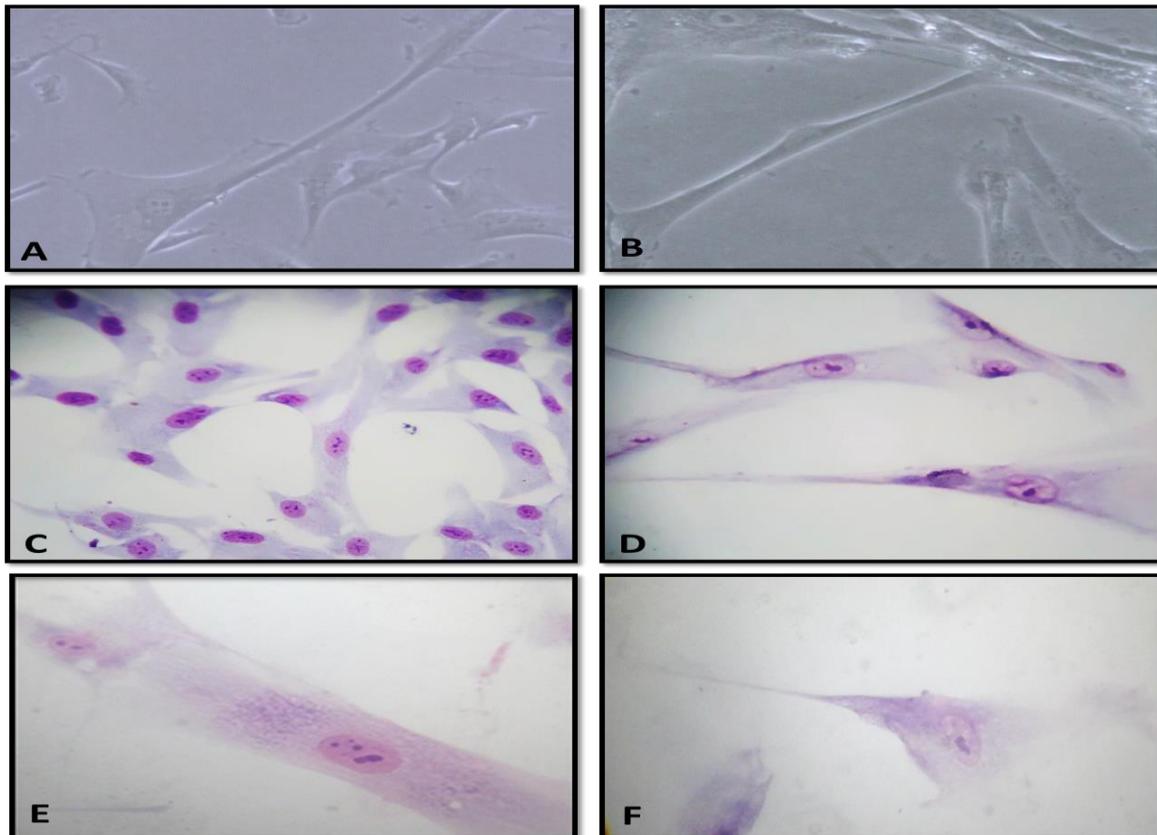


Fig. 14. Células provenientes de las gelatinas de Wharton caracterizadas en el microscopio de contraste de fases y coloreadas con May-Grunwald-Giemsa. A-B. Células observadas en el microscopio de contraste de fase. A. Población celular heterogénea, 2^{do} subcultivo. B. Población celular homogénea del tipo fibroblasto después de la criopreservación, 6^{to} subcultivo. A-B. 100x. C-F. Células mesenquimales coloreadas por tinción May-Grunwald-Giemsa. C. 2^{do} subcultivo antes de criopreservar. D. 6^{to} subcultivo después de la criopreservación. C-D. 250x. E. Detalle de célula tipo fibroblasto, 4^{to} subcultivo. F. Detalle de célula de amplio volumen citoplasmático después de un proceso de criopreservación, 6^{to} subcultivo. E-F. 400x.

Caracterización inmunocitoquímica de las células mesenquimales.

La caracterización inmunocitoquímica de las células provenientes del CUH antes y después de la criopreservación, se realizó a partir del inmunomarcaje contra la proteína vimentina, esta molécula se involucra en el transporte de proteínas entre el núcleo y la membrana citoplasmática.

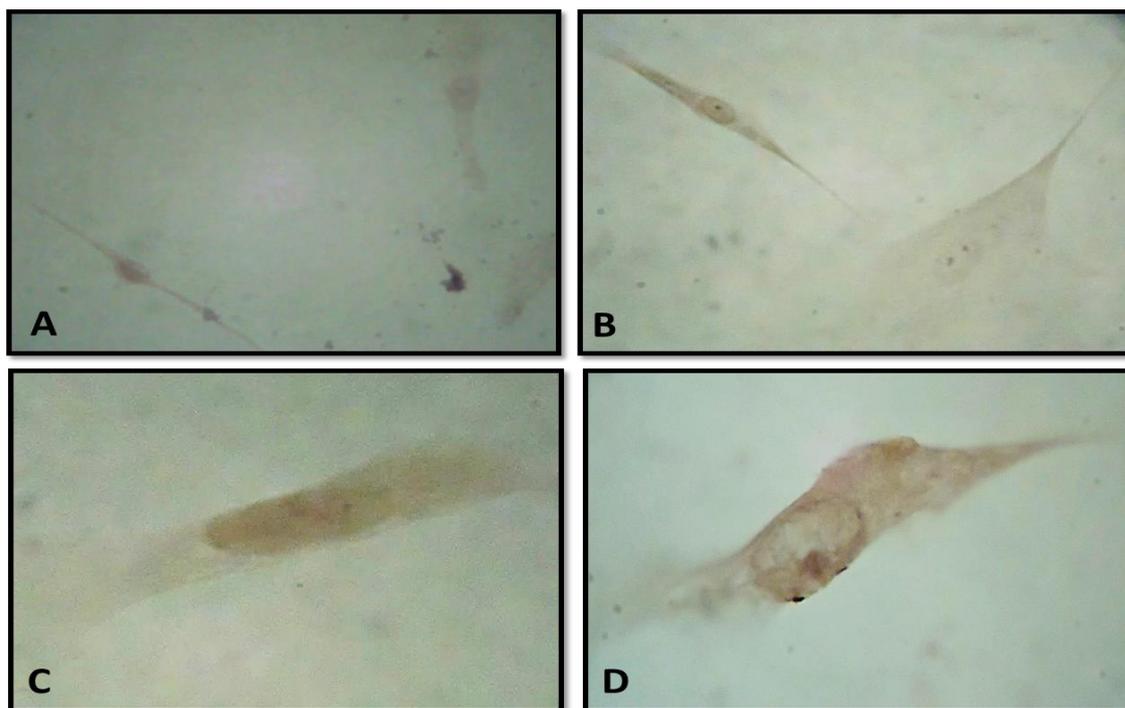


Fig. 15. Caracterización inmunocitoquímica de células provenientes del cordón umbilical humano antes y después de la criopreservación. A-D. 4to subcultivo. A-B se observan la diferencia en la intensidad de marcaje entre células del tipo fibroblasto y de amplio volumen citoplasmático. 400x. C-D. Detalle de célula tipo fibroblastos. 1000x. A y C. Antes de la criopreservación. B y D. Después la criopreservación.

En la Fig. 15, se observan las dos subpoblaciones obtenidas a partir del CUH, estas se expresaron positivas ante el marcaje contra la vimentina, evidenciándose por la coloración marrón en el citoplasma, debido al revelado del marcaje con el cromógeno diaminobencidina. Es importante destacar, que no se observó diferencia entre las células antes y después del proceso de

criopreservación por vitrificación, en cuanto a la expresión del inmunomarcaje, obteniéndose que las células tipo fibroblastos presentaron una mayor expresión por la vimentina en comparación con las células de amplio volumen citoplasmático (Fig. 15A-B), siendo evidente por la mayor intensidad en el marcaje del citoplasma para las células mesenquimales.

Criopreservación y descongelación de células mesenquimales del CUH.

Uno de los principales intereses de este trabajo, fue el de evaluar la eficiencia de la vitrificación como un método de criopreservación de las células mesenquimales propias de la gelatina de Wharton. La ventaja de esta técnica, es que no se requiere de equipos especializados como un congelador programable dando tasas de viabilidad altas y necesitando solo de un tanque de nitrógeno líquido y la disponibilidad de los crioprotectores. Las células mesenquimales se criopreservaron entre el 2^{do} y 5^{to} pasaje, descongelándose las mismas en un lapso de 4 a 16 semanas.

Determinación de la viabilidad celular.

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el ensayo de exclusión con el colorante azul de tripano. En la tabla 3, se muestran los valores obtenidos del porcentaje de viabilidad antes y después del proceso de criopreservación. En donde, se evidenció que antes de la vitrificación, las células mesenquimales del CUH, mantuvieron una viabilidad promedio del 97,10%, en cambio, a realizar la descongelación celular la viabilidad disminuyó a 61,25%, sin embargo, cuando se subcultivan las CMMs mantuvieron su capacidad de adhesión y de proliferación, siendo evidente un aumento de la viabilidad de los cultivos en un 97,41%, similar al de antes de la vitrificación.

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad para células mesenquimales antes y después de la criopreservación por vitrificación. Expresado en media \pm SD.

Numero de muestras	Proceso de vitrificación		Subcultivo de células criopreservadas
	Antes	Después	
1	98,6	62,5	97,6
2	95,1	57,3	96,7
3	96,7	62,7	98,5
4	97,3	61,5	95,3
5	97,9	63,0	98,4
6	96,3	63,9	97,8
7	97,8	57,9	97,6
Promedio \pm SD	97,10 (SD\pm1,17)	61,25 (SD\pm2,60)	97,41 (SD\pm1,11)

Determinación de la proliferación celular por el método de MTT.

Se realizó la estimación de la tasa de proliferación celular antes y después del proceso de criopreservación por vitrificación, para esto se determinó la densidad óptica en los cultivos a los 2, 4 y 7 días. En donde, el aumento de la D.O se encuentra directamente relacionado con el crecimiento celular. En la Fig. 16, se observó que entre el segundo y cuarto día de cultivo para las CMMs antes de la criopreservación (2^{do} subcultivo), la curva se encuentra en una fase adaptativa, en donde a partir del cuarto día de cultivo se evidenció un incremento en la población de manera exponencial, llegando a un máximo el día séptimo. En cambio, no se apreció una fase adaptativa para las CMMs descongeladas (6^{to} y 7^{mo} subcultivo), demostrando un aumento poblacional desde el segundo día de cultivo.

Al comparar un 2^{do} subcultivo antes de la congelación celular con los cultivos de un 6^{to} y 7^{mo} pasaje después del proceso de vitrificación (Fig. 16A y Fig. 16B), se obtuvo que no se observaron diferencias significativas ($P=0.885>0.05$ y $P=0.945>0.05$ respectivamente), lo que sugiere que las células no fueron afectadas por el proceso de criopreservación establecido en el trabajo.

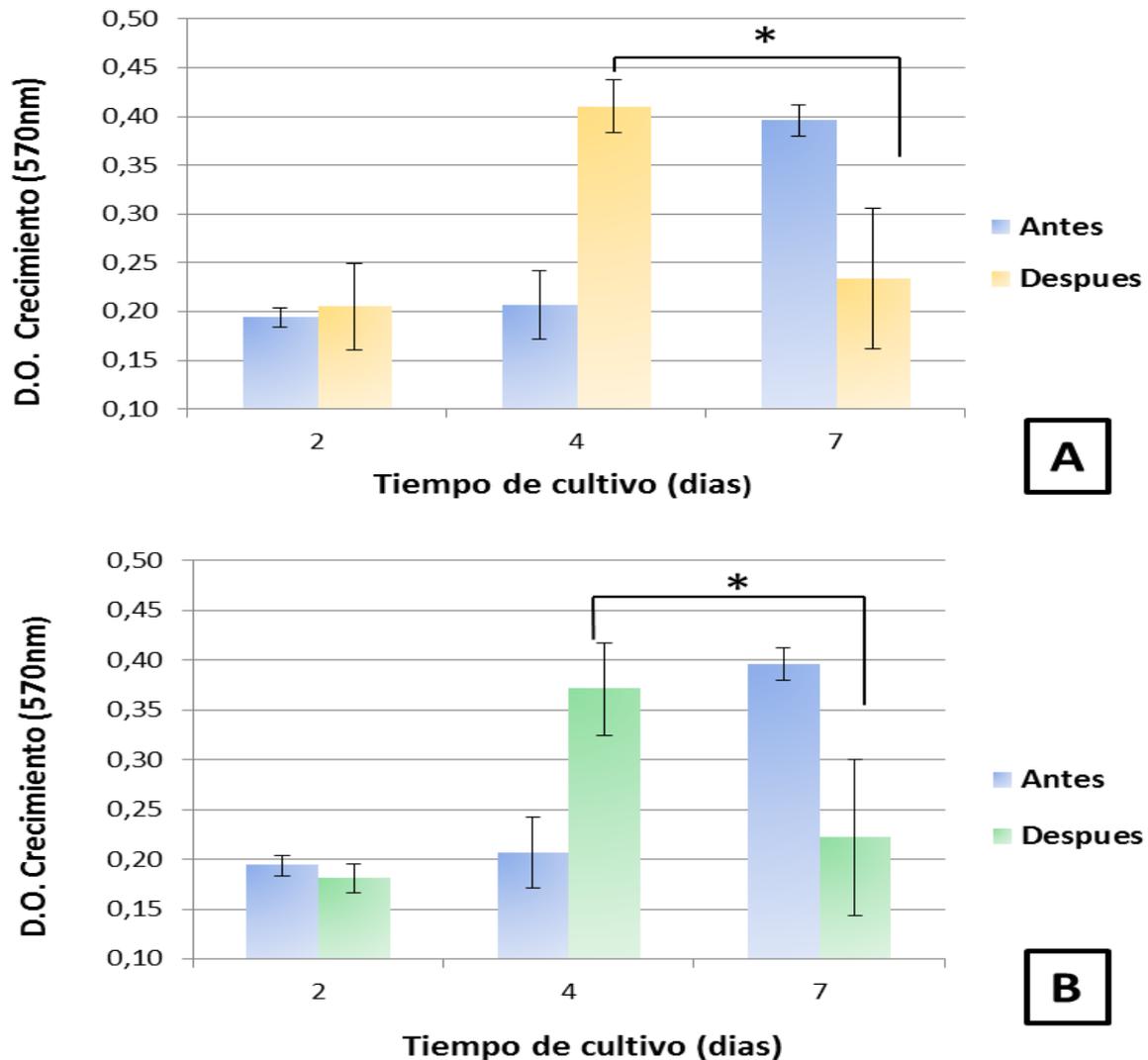


Fig. 16. Curva de proliferación de las células mesenquimales del cordón umbilical humano. Intervalo de confianza del 95%. A. Comparación de la proliferación celular entre un 2^{do} subcultivo antes de la criopreservación y el 6^{to} subcultivo de células mesenquimales descongeladas. B. Comparación de la proliferación celular entre 2^{do} subcultivo y un 7^{mo} subcultivo después de la criopreservación. A*: $p=0,002<0.05$; B*: $P=0,0237<0.05$.

En este estudio de crecimiento *in vitro*, las células del CUH se cultivaron bajo las mismas condiciones de cultivo, en donde se mantuvieron con medio DMEM: F12 suplementado al 15% de SFB, que brindaron los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para el mantenimiento y funcionalidad celular. A pesar de esto, se evidenció una disminución considerable en la absorbancia al 7^{mo} día de cultivo para las CMMs después de la vitrificación, siendo este estadísticamente significativo al comparar el día cuarto con el séptimo del 6^{to} y 7^{mo} pasaje ($p= 0,002 < 0.05$ y $P= 0,0237 < 0.05$ respectivamente).

Diferenciación neurogénica de las células derivadas del CUH.

Se evaluó el potencial neurogénico de las CMMs, para esto las células fueron incubadas con el medio preinductor constituido con un 20% SFB y 1mM de β -mercaptoetanol, por un tiempo de 24 horas. Consecutivamente, se agregaron los medios inductores compuestos de: 1) 7mM de β -mercaptoetanol con 2% SFB y 2) 7mM de β -mercaptoetanol sin SFB para la diferenciación *in vitro* en presencia de gelatina como sustrato o ausencia. Inicialmente, se evaluaron los cambios morfológicos de las CMMs hacia el fenotipo neural en presencia del medio preinductor por medio del microscopio invertido de fases, en donde, se observaron cambios significativos de las CMMs hacia el linaje neurogénico a las 24 horas (Fig. 17B y 17C), siendo posible apreciar que algunas células presentaban una retracción del cuerpo celular con pequeñas prolongaciones.

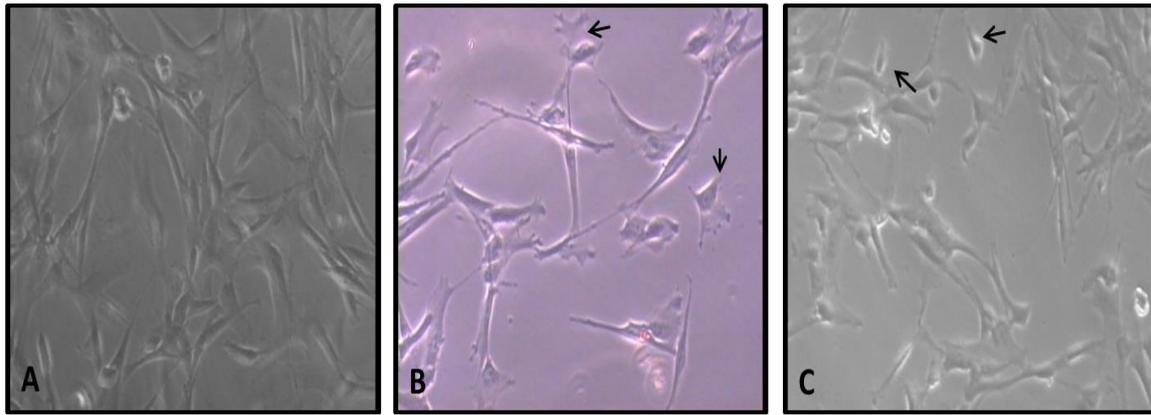


Fig. 17. Diferenciación neurogénica de las células mesenquimales observadas con el microscopio invertido de fases. A-C. Antes de iniciar la diferenciación neural con el medio preinductor a las 24 horas. A-B. Células no criopreservadas. A. células mesenquimales, no inducidas (control). B. células diferenciadas sin gelatina y sin SFB. C. Células diferenciadas con gelatina y sin SFB. B-C. Se aprecian células mesenquimales iniciando el proceso de diferenciación (flecha). A-C. 100x.

Los registros al microscopio invertido de fases en el proceso de diferenciación celular con los distintos medios inductores (tabla 1), permitieron evidenciar la transformación de las CMMs antes y después del proceso de criopreservación hacia el linaje neurogénico, en donde se lograron observar cambios morfológicos evidentes en las primeras 3 horas de inducción de la neurogénesis (Fig. 18G-I). Posteriormente a las 6 y 7 horas bajo las distintas condiciones, las células mostraron extensiones similares a las neuritas derivadas de un cuerpo o soma más denso, esto debido a que las células retrajeron su citoplasma hacia la región que rodea el núcleo, reflejando células similares a progenitores neuronales: neurona pseudo-unipolares (Fig. 18F), neurona bipolares (Fig. 18C) y células que se asemejan a células gliales, como: astrocitos (Fig. 18D), oligodendrocitos (Fig. 18E).

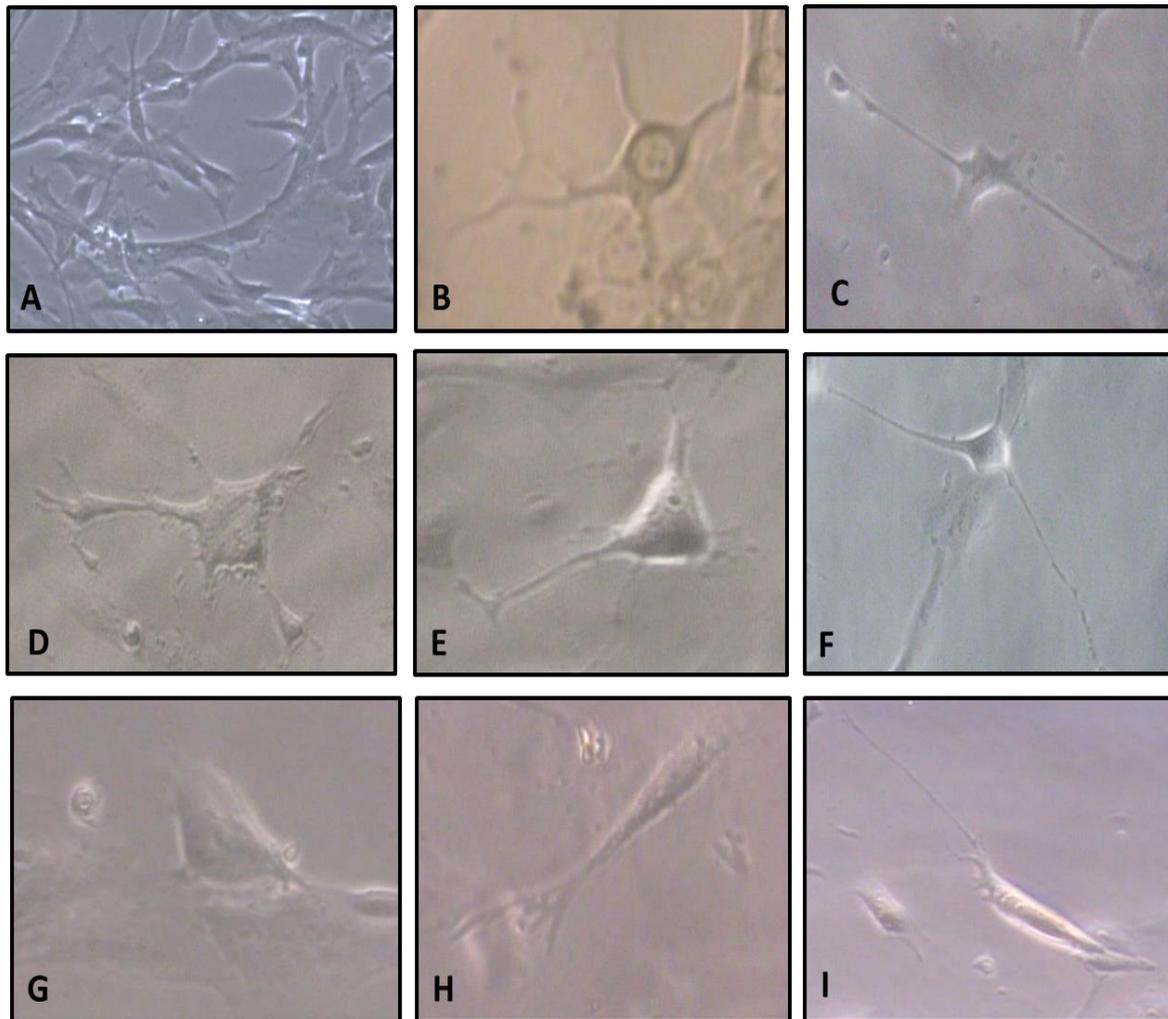


Fig. 18. Diferenciación de células derivadas del CUH hacia el linaje neural observadas en el microscopio invertido de contraste de fases. A. CMMs después de la criopreservación (control). 100x. B. Célula aislada del cerebro de ratón (control positivo). 400X. C-F. Células neuronales provenientes de la diferenciación de CMMs antes de criopreservar. C-D. Con gelatina. C. Sin SFB a las 4 horas de inducción. D. Con 2% SFB, a las 6 horas de inducción. E-F. Sin gelatina y sin SFB, a las 6 horas de inducción. G-I. Células neuronales provenientes de CMMs después de la criopreservación, 3 horas de inducción. G. Con gelatina y 2% SFB. H-I. Sin gelatina y Sin SFB. C-I. 200x

En este estudio, la exposición de las células mesenquimales a la gelatina al 1% en combinación con el BME sin la presencia de SFB, produjo cambios morfológicos como la retracción del cuerpo celular y la formación de múltiples

prolongaciones, obteniéndose células similares a astrocitos o células semejantes a oligodendrocitos mayoritariamente bajo esta condición. En cambio, se evidenciaron en su mayoría cambios morfológicos hacia células similares a neuronas bipolares para las células tratadas con 2% de SFB con o sin gelatina. Es importante destacar que bajo todas las condiciones brindadas para la diferenciación, se evidenciaron los cambios morfológicos de las células mesenquimales.

Al finalizar la inducción de la diferenciación hacia el linaje neural, se apreciaron células que no mostraron cambios morfológicos, manteniendo estas las características propias de las dos subpoblaciones de la GW: 1) tipo fibroblasto y 2) células de amplio volumen citoplasmático. De manera cualitativa, se apreció entre un 10 a 15% de diferenciación neural para las células mesenquimales inducidas con las diferentes condiciones, estos cambios morfológicos fueron corroborados por la caracterización histoquímica e inmunocitoquímica de las células.

Evaluación histoquímica de las células diferencias hacia el linaje neural.

Para la identificación de las células hacia el linaje neural se realizaron tinciones histoquímicas, con la cual se evidenciaron los fenotipos, como: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Inicialmente, las células similares a progenitores neurales se caracterizaron por medio de la tinción con sales de plata por el método de Bielschowsky, esta permitió la impregnación argéntica de estructuras filamentosas en el soma y en las prolongaciones de las neuronas, apreciándose en especial la forma y longitud del axón, permitiendo caracterizar las células

diferenciadas hacia el fenotipo neural, como células semejantes a neuronas y astrocitos, en donde las extensiones citoplasmáticas fueron altamente y poco teñidas respectivamente (Fig. 19B-D), reconociendo la posible disposición de las neurofibrillas, las cuales se oscurecieron por el precipitado de plata metálica, observándose con una coloración marrón oscuro en contraste con un fondo claro (poco precipitado). En cambio, las CMMs no se tiñeron, corroborando que estas células no presentan estructuras características de las células neuronales (Fig. 19A).

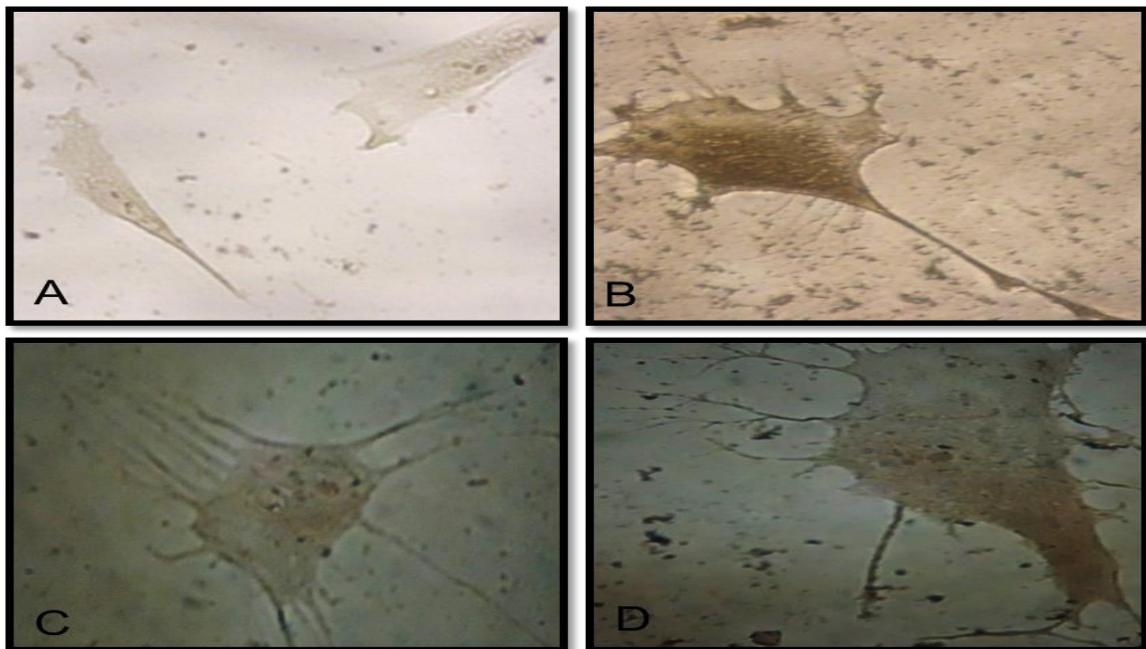


Fig. 19. Células diferenciadas teñidas con tinción de plata a las 6 horas de inducción observadas al microscopio invertido de fases y microscopio de luz. A. Control sin gelatina, se observan células derivadas del CUH sin teñir. B. Células similares a neurona, donde se aprecia el axón altamente teñido, Inducida sin gelatina y sin SFB a partir de células no criopreservadas. A-B. 40x. C-D. Células diferenciadas a partir de células mesenquimales criopreservadas, inducidas con gelatina y sin SFB. 1000x. C. Célula similar a astrocito con múltiples prolongaciones poco teñidas y un núcleo ovalado no teñido. D. Célula similar a neurona multipolar. Se aprecian las prolongaciones altamente teñidas.

Otra de las tinciones utilizadas fue la violeta de cresilo, esta permitió evidenciar gránulos finos y gruesos, como lo son los corpúsculos de Nissl: retículo endoplasmático rugoso y ribosomas asociadas, tiñendo tanto a neuronas como las células gliales, pero no las extensiones neuronales, ya que carecen de RER. Esta tinción proporcionó una panorámica general sobre la distribución, tamaño y morfología de las neuronas en el tejido nervioso, pero no sobre las extensiones de las neuronas.

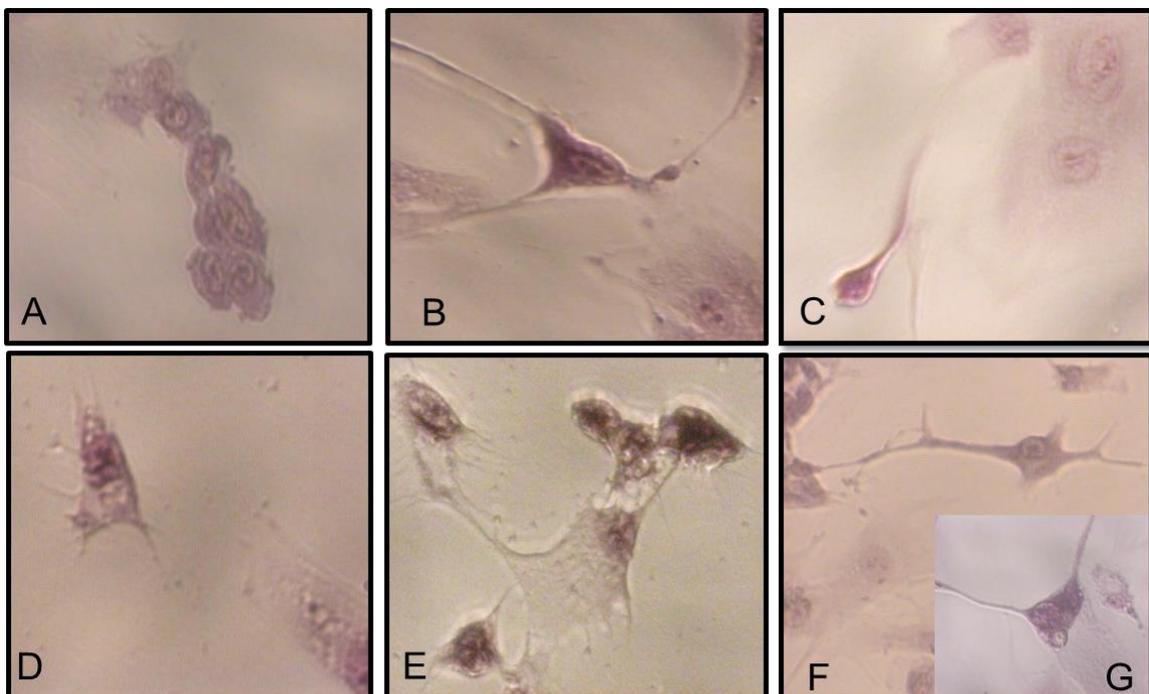


Fig. 20. Células diferenciadas teñidas por el método de violeta de cresilo a distintos tiempos de inducción. A-C. Células diferenciadas a partir de CMMs antes de la criopreservación, inducidas con gelatina. 400x. D-E. CMMs diferenciadas después descongelación celular, inducidas con gelatina. 400x. F-G. Control positivo, cultivo del tejido nervioso del cerebro de ratón. A. Grupos de células similares a oligodendrocitos, inducidas con 2% SFB. B. Célula similar a neurona con soma piramidal, inducida sin SFB. C. Célula similar a neurona unipolar, inducida sin SFB. D. Célula similar a astrocito, inducida con 2% SFB. Se aprecia un citoplasma poco teñido. E. Grupo de células similares a astrocitos, inducidas sin SFB. F. Célula bipolar, se observa como mantiene el contacto con otra célula. 200x. G. Neurona con soma piramidal. 400x.

Por medio de la tinción, se logró apreciar células similares a neuronas y células gliales, en donde las células similares a neuronas (Fig. 20B-C y Fig. 20G) presentaron una coloración intensa en comparación con las células gliales: astrocitos (Fig. 20E) y oligodendrocitos, en las que únicamente se tiñeron sus núcleos. Sin embargo, algunas células gliales presentaron un citoplasma muy teñido, esto puede deberse a que son progenitoras y aún no han culminado el proceso de diferenciación, por lo tanto, no expresan un fenotipo maduro (Fig. 20A)

Evaluación inmunocitoquímica de la diferenciación neurogénica.

Para confirmar la diferenciación neurogénica de las CMMs antes y después de la criopreservación por vitrificación, se realizó el inmunomarcaje contra la neurofibrillas, las cuales son compuestas principalmente por proteína de neurofilamentos, que atraviesan el soma como una red densa o haces de fibrillas paralelas, encontrándose en las prolongaciones citoplasmáticas,

El marcate contra neurofibrillas, permitió corroborar la diferenciación neuronal de las CMMs, en donde, las células diferenciadas antes y después de la criopreservación se expresaron positivas ante el mismo (Fig. 21A-B y 21C-D; respectivamente), presentando las células una coloración marrón-ámbar en el citoplasma y extensiones neuronales, debido al revelado del marcate con el cromógeno diaminobencidina. Las CMMs no diferenciadas no expresaron el marcate contra el anticuerpo (Fig. 21A) y tampoco las células similares a oligodendrocitos. Además, el marcate permitió confirmar potencial de diferenciación neurogénica de las CMMs, observándose con un mayor detalle las células similares a neuronas y células similares a células gliales, las cuales se

encontraron en mayor proporción en el tratamiento con gelatina al 1% en combinación con BME sin la presencia de SFB.

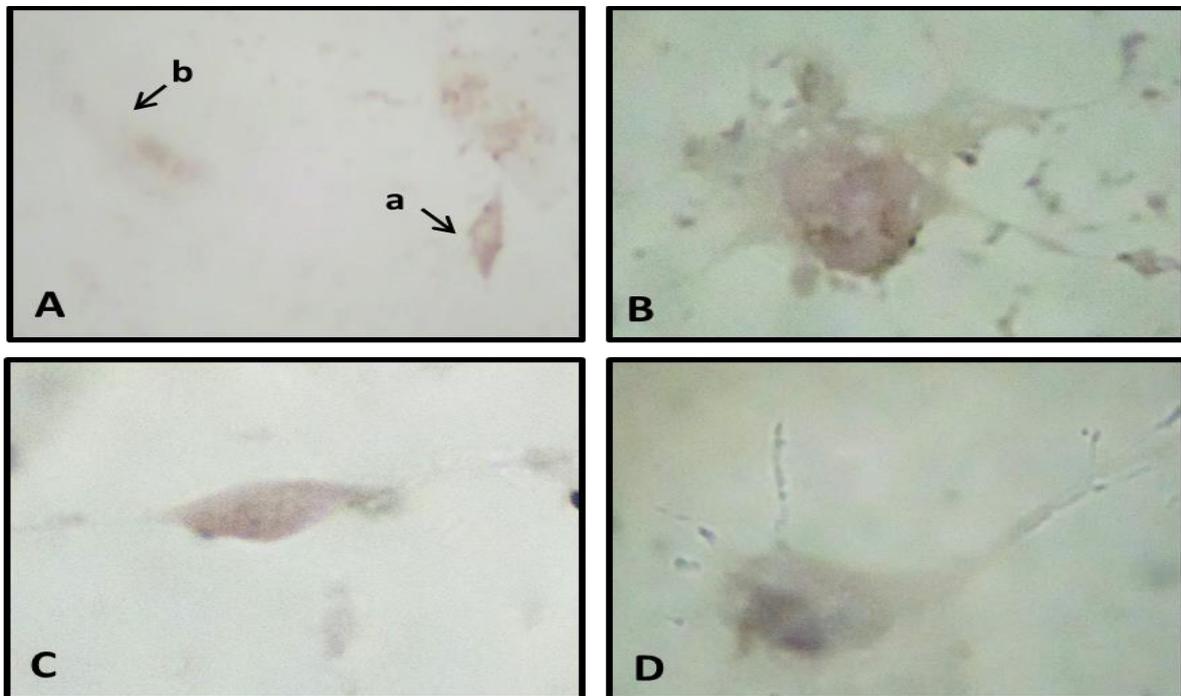


Fig. 21. Inmunomarcaje contra las neurofibrillas de las células diferenciadas hacia el linaje neural, observadas al microscopio de luz. A-D. CMMs Inducidas en gelatina sin SFB a las 6 horas. A-B. Células diferenciadas a partir de CMMs descongeladas. C-D. CMMs no criopreservadas diferenciadas hacia el linaje neurogénica. A. Se aprecia el marcaje positivo de una célula similar a neurona bipolar (a) en comparación con una célula de amplio volumen citoplasmático que no expresa marcaje (b). B. Célula similar a astrocito. C. Célula similar a neurona bipolar, no se logra apreciar claramente las prolongaciones. D. Célula similar a neurona, se aprecia las prolongaciones. B-D. 1000x.

DISCUSIÓN

Aislamiento y obtención celular a partir del CUH.

Los protocolos de aislamiento de las células a partir del cordón umbilical humano son muy variados, para éstos no hay un proceso estandarizado (Karahuseyinoglu y col., 2007; Tsagias y col., 2011; Nagamura-Inoue y He, 2014), pero aun así, permiten el mantenimiento de las características morfológicas y fenotípicas durante los pasajes (La Rocca y col., 2009). En éste trabajo, el tiempo de digestión fraccionado se mantuvo en un rango establecido de 40 a 45 minutos con la enzima colagenasa tipo II, obteniéndose un número mayor de células aisladas ($41,96 \times 10^4$), con una viabilidad del 95,77% en un menor tiempo que el reportado por otros trabajos (Salehinejad y col., 2012) y con una mejor eficiencia en el aislamiento. En cambio, Karahuseyinoglu y col., en el 2007, obtuvieron $2,6 \times 10^4$ células aisladas con la digestión de la enzima colagenasa tipo II por un tiempo de 4 horas. Es posible que la diferencia en cuanto al rendimiento sea mayor en el presente trabajo, por la acción de la tripsina que promueve una mayor obtención celular al actuar en la disociación celular y de los tejidos (Freshney, 2005). Además, otros trabajos han reportado el procedimiento por disgregación enzimática con tripsina-colagenasa como exitoso, ya que se obtiene una mayor densidad celular, una expresión más alta de marcadores de superficie (C-kit, Oct-4, entre otros), así como una mayor capacidad de proliferación (Semenov y col. 2009; Salehinejad y col., 2012). Sin embargo, es importante tomar en cuenta el tiempo de la digestión enzimática, puesto que las enzimas pueden degradar la membrana celular y evitar que las células se adhieran al sustrato de cultivo (Can y Karahuseyinoglu, 2007), influyendo directamente en la viabilidad de las células.

En el trabajo, la viabilidad se mantuvo en niveles altos entre 95,77-97,13% con la combinación enzimática de dispasa, tripsina y colagenasa tipo II. Es relevante destacar que el tipo y la concentración de las enzimas desempeñan un papel en la digestión del tejido, principalmente en la eficiencia, viabilidad y toxicidad (Costa y col., 1987; Koning y col., 1993), en donde cada tejido debe ser tratado enzimáticamente en base a sus características histológicas.

Establecimiento del cultivo primario de las células del CUH.

Se tiene que las condiciones brindadas a los cultivos permitieron una alta adherencia, crecimiento y proliferación para el establecimiento de las células obtenidas del CUH, aún después del proceso de disgregación enzimática. Igualmente, algunos autores afirman que las células obtenidas por digestión enzimática de la matriz extracelular, presentan una tasa de proliferación celular significativamente mayor en comparación con los cultivos primarios obtenidos por explantes (Park y col., 2006; Huang y col., 2008).

Con respecto a su comportamiento celular, los cultivos primarios presentaron una población heterogénea, esto debido a que la composición celular se asemeja a las características del tejido nativo, el cual está compuesto por diversos tipos celulares que interactúan dentro de la GW (Calderón, 2007) y en el tejido epitelial. En donde la GW, presenta regiones distintivas como: la perivascular, intervascular y región subamniótica (Can y Karahuseyinoglu, 2007; Troyer y Weiss, 2008), con una población de células heterogéneas que no presentan una distribución uniforme en cada región.

Las observaciones periódicas de los cultivos, mostraron dos tipos de fenotipos celulares obtenidos a partir de la gelatina de Wharton, las cuales

concuerdan con una subpoblación definidas por varios autores como: tipo 1, descritas como células de citoplasma ancho y aplanadas con una menor capacidad de proliferación y de diferenciación en comparación a las células del tipo 2, definidas como células del tipo fibroblasto, más delgadas y fusiformes (Can y Karahuseyinoglu, 2007; Khatami y col., 2014).

Establecimiento de los subcultivos de las células derivadas a partir del CUH.

Los subcultivos celulares aumentan la población celular a lo largo de los pasajes, permitiendo la homogenización de los mismos, al predominar el tipo celular que presenta una tasa de crecimiento mayor con respecto a las otras células en cultivo (Sharp, 1980; Helgason y Millar, 2005). En el cordón umbilical, son las células mesenquimales propias de la gelatina de Wharton. En los primeros subcultivos, se observaron las células de amplio volumen citoplasmático en conjunto con las del tipo fibroblasto, disminuyendo en proporción las primeras a partir del 3^{er} subcultivo y aumentando progresivamente las del tipo fibroblasto en los posteriores pasajes. Esta variación en el número de ambos tipos celulares demuestra la selectividad de los cultivos y la baja proliferación que poseen las células de amplio volumen citoplasmático, lo que evita la colonización de la placa en los siguientes subcultivos (Araos, 2009).

Para el mantenimiento de las células epiteliales, se requieren condiciones específicas en el cultivo que favorezcan la adhesión y proliferación de las mismas, siendo necesaria la gelatina al 1% como sustrato de adhesión para el mantenimiento de las células *in vitro*, además, de medios de cultivo enriquecidos con el EFG que estimula el crecimiento y supervivencia celular (Yun y col., 2013; Lim y Phan, 2014). En este trabajo no se suministraron las condiciones óptimas

para el mantenimiento de estas células epiteliales, pero si se brindaron las condiciones de cultivo necesarias para que las células de interés del tipo fibroblasto de la región subamniótica, se mantuvieran en los cultivos, mostrando una de sus principales características como lo es: la adhesión al plástico. Esta capacidad no es sólo para las células mesenquimales provenientes del CUH, sino también las provenientes de otros tejidos (MO, tejido adiposo, entre otros), siendo uno de los criterios sugerido por la ISCT (Arévalo y col., 2007; Carvalho y col., 2011; Arbós y col., 2013; Arutyunyan y col., 2016).

Caracterización morfológica de las células derivadas del CUH.

Desde el punto de vista morfológico, los cultivos a partir de la GW presentaban dos subpoblaciones, en primer lugar, las células tipo fibroblasto con morfología ahusada y escaso citoplasma con núcleo céntrico, reportadas a partir de distintos métodos de aislamiento en diferentes tejidos: MO, tejido adiposo, piel, pulpa dental, tendón, sangre provenientes del CUH, entre otros (Mitchell y col., 2003; Kern y col., 2006; Calderón, 2007; Tsagias y col., 2011; Salehinejad y col., 2012; Christodoulou y col., 2013; Arbós y col., 2013; Pacini, 2013; Castro y Montesinos, 2015; Arutyunyan y col., 2016). Asimismo, se ha determinado que las células del tipo fibroblastos de la GW, son células madre por la expresión de genes como: Oct4, Rex1, Sox2, y Nanog (Carlin y col., 2006 citado de Araos, 2009; Tantrawatpan y col., 2013), C-kit (CD117) con actividad telomerasa (Mitchell y col., 2003) en sus primeros pasajes, presentando un mayor potencial de diferenciación, al diferenciarse a linajes de origen no mesenquimal, como las células nerviosas (Woodbury y col., 2000; Mitchell y col., 2003; Can y Karahuseyinoglu, 2007; Khatami y col., 2014); por esto último estas células son las de mayor interés para este trabajo.

En segundo lugar, las células con amplio volumen citoplasmático. Estas persistieron en los subcultivos en menor proporción que las células del tipo fibroblasto, sin mostrar características morfológicas propias de la senescencia, esto evidencia que constituyen una subpoblación celular presente en la gelatina de Wharton, descritas como semejantes a las células mesenquimales, pero con una proliferación y diferenciación menor que estas (Mitchell y col., 2003; Karahuseyinoglu y col., 2007). Igualmente, para los dos fenotipos celulares, el citoplasma se observó basófilo indicando un aumento en la cantidad de retículo endoplasmático rugoso que se asocia a la síntesis proteica (Takechi y col., 1993; Ross y Pawlina, 2007).

Caracterización inmunocitoquímica de las células madre mesenquimales.

La vimentina es una de las proteínas de filamentos intermedios del tipo III expresadas en células de origen mesenquimático (fibroblastos, adipocitos, condrocitos, entre otros), tiende a congregarse alrededor del núcleo desde donde irradian hacia retículo endoplasmático y mitocondrias, cumpliendo funciones importantes en el soporte y anclaje de las organelas en el citoplasma, organización del citoesqueleto, integridad del citoplasma y morfología celular (Katsumoto y col, 1990, citado en Calderón, 2007; Paniagua y col., 2007; Ericksson y col., 2009; Martínez y Martínez, 2010).

Ambos fenotipos obtenidos a partir del CUH resultaron positivos para el inmunomarcaje contra la vimentina, confirmando el origen mesenquimal de las mismas (Takechi y col., 1993; Kadner y col., 2004). La afinidad de las células tipo fibroblastos por el anticuerpo vimentina, ha sido reportados por varios autores (Sarugaser y col., 2005; Karahuseyinoglu y col., 2007, citado en Jeschke

y col., 2011; Araos, 2009), corroborando una mayor expresión para las células del tipo fibroblasto en comparación con las células de amplio volumen citoplasmático, siendo estas, además, reportadas positivas para marcadores endoteliales como la pancitoqueratina (Karahuseyinoglu y col., 2007). Algunos autores sugieren que esta diferencia en el marcaje, se debe a que las células del tipo fibroblasto son células indiferenciadas, mostrando una menor madurez en su desarrollo con respecto a las células de amplio volumen citoplasmático, representado por variaciones en los niveles de la proteína vimentina según el desarrollo celular (Vaittinen y col., 2001, Pascual y col., 2010)

Determinación de la viabilidad celular.

En todo protocolo de congelación, los tejidos y suspensiones celulares responden de manera distinta a la velocidad de enfriamiento y descongelación (Djuwantono y col., 2011), definido por la estructura y composición de las membranas que determinan los índices de supervivencia celular (Ávila-Portillo y col., 2006). La velocidad de congelación afecta la velocidad y el tamaño de la formación de cristales intracelulares y extracelulares (Shivakumar y col., 2015). En donde, una elevada formación de cristales intracelulares es asociada a un enfriamiento rápido, ya que el agua no tiene suficiente tiempo de migrar fuera de la célula (Shivakumar y col., 2015). En este estudio, se observó la disminución de la viabilidad en todos los subcultivos descongelados, esto puede deberse a que las células se expusieron a una mayor concentración de CPO, lo cual puede significar un mayor riesgo de lesión celular (Bahadori y col., 2012).

Para la criopreservación de las células se utilizó una solución crioprotectora compuesta de EG, Ficoll y sacarosa. En donde, el EG evita la

formación de cristales (Rota y col., 2006), estableciéndose que posee una baja toxicidad para CMMs (Gajda y col., 2007). Durante la congelación es necesario CPO de bajo peso molecular (Palasz y Mapletoft, 1996), en este trabajo se emplearon: el Ficoll, que promovió la permeabilidad del CPO, con una menor toxicidad y viscosidad (Kasai y Mukaida, 2004) y la sacarosa, que permitió la disminución de la concentración del CPO permeable (Moon y col., 2008), promoviendo una rápida deshidratación. En un estudio realizado por Shivakumar y col., en el 2016, se evaluó el efecto de varios crioprotectores: 1) DMSO y 2) una solución crioprotectora (glucosa, sacarosa y EG) sobre las CMMs provenientes de la GW, se obtuvo una tasa de supervivencia mayor con la solución crioprotectora. Igualmente, se ha determinado que la criopreservación puede ser afectada por la presencia del SFB, siendo una mezcla compleja de: citoquinas, hormonas y factores de crecimiento (Shivakumar y col., 2015), que ayudan al mantenimiento y funcionalidad celular, sirviendo como tapón de la presión osmótica y protector de la membrana al reducir el riesgo de formación de cristales (Vunjak-Novakovic y Freshney, 2006; Hunt, 2011). En este trabajo, la viabilidad disminuyó a un 61,9% en los cultivos criopreservados en una combinación de crioprotectores con un 20% SFB. Sin embargo, un estudio reveló que el porcentaje de viabilidad se redujo a un 56%, al eliminar el SFB de la solución crioprotectora (10% PVP) (Shivakumar y col., 2015). Un resultado similar, se obtuvo para CME humanas descongeladas, en donde la ausencia de SFB causó una disminución significativa en el porcentaje de viabilidad (Ha y col., 2005).

El mantenimiento de la funcionalidad de las CMMs, se demostró por el aumento de la viabilidad a un 97,38%, después del subcultivo de las células

descongeladas. La razón de que estas células se recuperarán puede estar relacionado con su estado indiferenciado (Martin-Piedra y col., 2013). La gelatina de Wharton es definido como un tejido conectivo neonatal (Kierszenbaum y Tres, 2011), en donde las células mesenquimales, han sido caracterizadas como primitivas (Mitchell y col., 2003; Ma y col., 2005; Oliver-Vila y col., 2015), lo cual puede explicar que estas células preserven características óptimas durante un mayor número de pasajes, en relación a otros tipos celulares (Martin-Piedra y col., 2013), aún después de un proceso de vitrificación.

Determinación de la proliferación celular por el método de MTT.

Los resultados evidenciaron la cinética de crecimiento *in vitro* de las células del cordón umbilical antes y después de la criopreservación, en donde, la proliferación celular demostró las siguientes fases: una fase de latencia, en ésta las células presentaron un período de adaptación al cultivo, en la cual se mantuvieron las condiciones *in vitro*, siendo ésta de una duración de 4 días para las CMMs antes de la congelación; posteriormente una fase exponencial, caracterizada por un aumento en la proliferación celular, y por ende un incremento en la población de manera logarítmica, ésta se evidenció a partir del 2^{do} día para las CMMs después de la descongelación, mientras que para las CMMs antes de la criopreservación fue evidente que este período empezó a los 4 días de cultivo. Este crecimiento implica el aumento de los elementos, traducido en un incremento en el volumen celular y su posterior multiplicación (Freshney, 2005, Meyer, 2012), para finalizar una fase estacionaria, en donde el crecimiento celular permanece constante (Freshney, 2005; Madigan y col., 2004). Esta fase, no se logró observar en la curva, es posible que se necesitara

evaluar el crecimiento por un período mayor de 7 días para las células antes de la criopreservación.

En el desarrollo del trabajo, los cultivos evolucionaron siguiendo un comportamiento celular, en donde se logró apreciar que con cada subcultivo sucesivo, las células se seleccionaban en base a su velocidad de proliferación más rápida, en este caso las células del tipo fibroblasto, llegando a la confluencia celular en un menor tiempo (Can y Karahuseyinoglu, 2007; Khatami y col., 2014). Esto se confirmó al realizar la curva de crecimiento en donde las CMMs sembradas después de la criopreservación, fueron cultivos avanzados (6^{to} y 7^{mo} pasaje) que alcanzaban la confluencia celular entre 4 a 5 días, por lo cual no se logró apreciar una fase adaptativa para las mismas.

La curva de proliferación para las células sembradas después de la descongelación, mostró una disminución en la absorbancia, es posible que esta disminución en la viabilidad celular puede ser adjudicada a la acumulación de detritos en el medio o a la confluencia de la monocapa en cultivo (Calderón, 2007), ya que cuando las células ocupan toda la superficie disponible, establecen contacto entre ellas que inhiben su proliferación, por ende se detiene el crecimiento celular (Beltrán y Gonzales, 2016), o se evidencia el desprendimiento de las células por una alta confluencia en el cultivo. La tasa de proliferación permitió corroborar el tiempo más apropiado para realizar los subcultivos, como lo es la fase logarítmica (Calderón, 2007), entre los 5 y 6 días para las células provenientes del CUH. En general, las células en crecimiento exponencial están en su forma reproducible, y por ello, son las más indicadas para distintos estudios, como: enzimáticos, estructurales, entre otros (Madigan y col., 2004; Helgason y Miller, 2005 citado de Merentes, 2016).

Células mesenquimales inducidas.

Las células mesenquimales del CUH, se indujeron hacia el linaje neurogénico con la utilización de dos medios (descritos anteriormente), que contaron con distintos compuestos: b-mercaptoetanol y suero fetal bovino o la ausencia del mismo. Además, algunas de las células se sembraron en gelatina al 1% como sustrato que puede inducir la diferenciación de las células mesenquimales (Lee y col., 2016). Se conoce que el BME es un agente antioxidante que promueve la rápida transición de las células hacia el fenotipo neural, en donde se observa la generación de neuritas y formación de filamentos intermedios (Woodbury y col., 2000), esto se corroboró al observar el inicio de cambios morfológicos durante el período con el medio preinductor (Fig. 16), como la retracción del cuerpo celular y el desarrollo de pequeñas prolongaciones (neuritas) en células antes y después de la criopreservación, siendo favorecido por la presencia del SFB y la gelatina al 1% como superficie de diferenciación.

Otro de los factores inductores de la diferenciación neurogénica fue el suero fetal bovino, éste consta de hormonas y factores de crecimiento (Merentes, 2016), tales como: EGF y bFGF, los cuales potencian la división celular y la expresión de genes precursores neuronales, promoviendo una mayor respuesta a la inducción (Woodbury y col., 2000; Delcroix y col., 2010). En el trabajo, se evidenció que en el tratamiento con el 2% de SFB para la diferenciación *in vitro* en presencia de gelatina como sustrato o en ausencia, se observó un mayor porcentaje cualitativo de células similares a neuronas, en comparación con aquellas inducidas sin SFB que presentaron una mayor diferenciación hacia células similares a astrocitos. Se ha demostrado que una baja concentración de bFGF, regula la diferenciación neurogénica (Qian y col.,

1997 citado de Cardozo, 2015). Además, la utilización de medios preinductores con EGF y bFGF, incrementan hasta un 78% la diferenciación neuronal de las CMMs de la MO, favoreciendo la extensión de neuritas (Woodbury y col., 2000), en donde la utilización de SFB inhibe la expresión de nestina en CMMs de MO de ratón, y solo las positivas a esta proteína filamentosa son capaces de diferenciarse en células GFAP – proteína expresada por astrocitos (Wislet-Gendebien y col., 2003; Soto-Rodríguez y col., 2014). Por lo tanto, el SFB desempeña una función reguladora independiente en presencia o no, de otros factores inductores (Croft y Przyborski, 2006).

Otro factor de la inducción celular utilizado fue la gelatina, esta es una proteína soluble originada por la hidrólisis del colágeno, que promueve la adhesión, proliferación y diferenciación celular (Lee y col., 2016; Lu y col., 2016). En el trabajo, se evidenció que en presencia o ausencia de gelatina al 1% se indujo la diferencia neurogénica, obteniéndose diversos fenotipos neuronales. Sin embargo, la presencia de ésta favoreció la madurez de los fenotipos neuronales en las células inducidas sin SFB, en comparación con las diferenciadas sin gelatina, en donde se observaron cualitativamente un mayor porcentaje de células similares a progenitoras neuronales. En un estudio realizado con CMMs de la médula ósea de ratón, aquellas células que se cultivaron en placas recubiertas con gelatina aumentaron su proliferación y diferenciación hacia el linaje neurogénico en comparación con las sembradas en placas no recubiertas (Park y col., 2013 citado en Obara y col., 2016). Además, se demostró que la gelatina induce la generación de CMMs con una mayor respuesta hacia la diferenciación neurogénica, cuando esta molécula es utilizada en el cultivo primario en comparación con aquellas que no estuvieron expuestas

a la gelatina como superficie de adhesión (lee y col., 2016). Por lo tanto, es posible que las CMMs obtenidas a partir del CUH, se hayan favorecido por la presencia de gelatina al 1% como superficie de adhesión en los cultivos primarios.

Evaluación histoquímica de las células diferenciadas al linaje neural.

La tinción de plata por el método de Bielschowsky y la tinción de violeta de cresilo, se utilizaron para evidenciar la diferenciación de las células hacia el linaje neurogénico en cada tratamiento, antes y después del proceso de criopreservación, apreciando células similares a neuronas y a células gliales.

En el trabajo se identificaron distintos tipos de células similares a neuronas, como: unipolares, bipolares y multipolares. En donde, se observó que las células similares a neuronas multipolares presentaron un mayor tamaño *in vitro*, con respecto a las células similares a células gliales. Estas presentaron un aspecto estrellado que constaba de un cuerpo celular o soma, a partir del cual proceden múltiples neuritas y un axón de gran dimensión, las que se mostraron positivas ante la tinción de plata y violeta de cresilo, siendo positivas también las células similares a neuronas bipolares con un soma esférico de menor tamaño. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Calderón en el 2007, que define a las células similares a neuronas como positivas para estas dos tinciones.

En cultivo se observaron los dos tipos astrocitos diferenciables por sus prolongaciones neuronales, como: células similares a astrocitos protoplasmáticos que presentaron extensiones gruesas y cortas con un contorno irregular de morfología estrellada, y un cuerpo celular transparente de gran

tamaño en proporción a las múltiples neuritas. El otro tipo evidenciado, fueron las células similares a astrocitos fibrosos con extensiones largas, delgadas y lisas. Ambas de mayor tamaño en comparación con los oligodendrocitos. Estas células se mostraron positivas con una coloración leve tanto para la tinción de plata y la tinción violeta de cresilo, debido a que las células similares a astrocitos protoplasmáticos poseen una escasa concentración del RER (Eliseiev y col., 1985 citado en Calderón, 2007).

Además, se reconocieron células similares a oligodendrocitos, siendo identificadas por su menor tamaño y menor número de ramificaciones con respecto a los astrocitos (Eynard y col., 2008). En cultivo poseían una morfología esférica con largas prolongaciones, sino se encontraban en contacto con células similares a neuronas. Estas células se presentaron positivas para la tinción violeta de Cresilo, debido a que presentan un desarrollo de los organelos citoplasmáticos ricos en retículo endoplasmático rugoso, complejo de Golgi, mitocondrias y ribosomas (Leeson, 1990; Purves y col., 2007), sin embargo, resultaron negativas para la tinción con plata porque no presentan neurofibrillas.

Evaluación inmunocitoquímica de las células diferenciadas hacia el linaje neural.

Para una mejor comprensión de los fenotipos neuronales se realizó la inmunocitoquímica contra la neurofibrillas. Éstas se encuentran compuestas por proteínas de neurofilamentos, encargados de proporcionar soporte al soma, dendritas y axón para el manteniendo de su forma, además, encargándose del transporte celular (Kunkel, 2005; Welsch y Sobotta, 2008). Los neurofilamentos se clasifican en tres según su tamaño: 1) liviano (NF-L) de 61-68 kDa, 2)

mediano (NF-M) de 90-110 kDa y, por último, 3) pesado (NF-H) de 115-130 Dka (Grant y Pant, 2000; Ross y Pawlina, 2007). Se tiene que el desarrollo del sistema nervioso va acompañado de una expresión diferencial de los neurofilamentos (Nixon y Shea, 1992 citado en Lariviere y Julien, 2004), en donde la expresión génica está regulada durante el desarrollo neuronal, siendo la subunidad NF-L expresado en etapas tempranas, el NF-M al inicio de la formación de las neuritas y NF-H durante el desarrollo post-natal (Lariviere y Julien, 2004; Julien y cols., 1987 citado en Alberti, 2006).

En el presente trabajo, las células diferenciadas hacia el fenotipo neural resultaron positivas para el marcaje contra la neurofibrillas, tanto para las CMMs antes y después del proceso de criopreservación, confirmándose la presencia de las mismas. En donde, el marcaje para las células diferenciadas no fue homogéneo, debido a que la proteína del citoesqueleto neural (NF-M) se expresa al comienzo de la formación de las prolongaciones. Se evidenció que aquellas células maduras tanto para las células similares a neuronas y astrocitos, presentaron una expresión menos intensa al compararlas con las células que iniciaban la formación de sus extensiones que mostraron un inmunomarcaje intenso. Con respecto, a las células similares a oligodendrocitos no se evidenció expresión, debido a que estas no presentan neurofibrillas (Bravo, 2007 citado en Calderón, 2007). Para identificarlas, se podrían emplear marcadores específicos contra la proteína nucleótido-cíclico-fosfodiesterasa (CNPasa) o contra el anticuerpo antioligodendroglia presente en los oligodendrocitos (Sprinkle, 1986; Lyck, 2008).

CONCLUSIONES

1. La combinación de enzimas dispasa, tripsina y colagenasa tipo II, utilizadas en el trabajo, permitieron el aislamiento de las células madre mesenquimales presentes en los diferentes compartimientos del cordón umbilical humano, principalmente de las regiones subamniótica y de la gelatina de Wharton.
2. En el establecimiento de los cultivos primarios en monocapa, se logró observar una población celular heterogénea, lo que nos indica que existen subpoblaciones de células con características intrínsecas del tejido de origen. A pesar de esto, cuando se realizan los subcultivos se logran obtener poblaciones más homogéneas de células de morfología tipo fusiforme que son las consideradas como células madre mesenquimales.
3. Se establecieron las condiciones óptimas que permitieron el mantenimiento y proliferación de las células mesenquimales en los cultivos primarios y subcultivos, logrando expandir hasta el séptimo pasaje sin rasgos aparentes de senescencia.
4. Las células mesenquimales del cordón umbilical humano, mantienen aparentemente su identidad morfológica después del proceso de criopreservación por vitrificación, lo cual fue evidenciado por la expresión de la vimentina, citoesqueleto característico de células progenitoras de naturaleza mesenquimal.
5. El proceso de criopreservación por vitrificación es un método efectivo y simple, que permite que las células mesenquimales del cordón umbilical humano después del proceso de criopreservación por vitrificación, puedan mantener su potencial de proliferación y diferenciación neurogénica.

RECOMENDACIONES

- 1) Realizar un ensayo de electrofisiológico, para corroborar que las células madre mesenquimales diferenciadas hacia el linaje neural son células neuronales funcionales.
- 2) Evaluar otros marcadores específicos en contra de neurofibrillas, tales como: NF-L y NF-H, que permitan determinar las distintas fases de diferenciación neurogénica *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

1. Alberti, C.A. 2006. Aislamiento y análisis del grado de fosforilación de los neurofilamentos de líquido cefalorraquídeo de pacientes con paraparesia espástica tropical. Universidad de Chile. Santiago de Chile, Chile.
2. Anastasiu, D.M., Cean, A., Bojin, M.F., gluhovschi, A., Panaitescu, C., Paunescu, V., Tanasie, G. 2016. Explants-isolated human placenta and cord cells share characteristics of both epithelial and mesenchymal stem cells. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **57(2)**: 383-390.
3. Araos, C. 2009. Cultivo de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano. Potencialidad ósteo-condrogénica “in vitro”. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
4. Araujo, A.B., Salton, G.D., Furlan, J.M., Schneider, N., Angeli, M.H., Laureano, A. M., Silla, L., y colaboradores. 2017. Comparison of human mesenchymal stromal cells from four neonatal tissues: Amniotic membrane, chorionic membrane, placental decidua and umbilical cord. *Cytotherapy.* **19(5)**: 577-585.
5. Arbós, A., Nicolau, F., Quetglas, M., Ramis, J.M., Monjo, M., Muncunill, J., Calvo, J. y colaboradores. 2013. Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunología.* **32(1)**: 3-11.
6. Arévalo, J.A., Páez D.M., Rodríguez V.M. 2007. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA.* **5(8)**:101-212.

7. Arutyunyan, I., Elchaninov, A., Makarov, A., Fatkhudinov, T. 2016. Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. *Stem Cells Int.* **2016**: 6901286, 17 pág.
8. Ávila-Portillo, L.M., Madero, J. I., López, C., León, M.F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L.G., y colaboradores. 2006. Fundamentos de la criopreservación. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* **57(4)**: 291-300.
9. Bahadori, M.H., Soltani, B., Mirzajani, E., Babaei, P., Ansari, M.M., Jalai, M.A. 2012. Cryopreservation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells by two conventional and open-pulled straw vitrification methods. *Yakhteh. Mel. J.* **11(3)**: 317-326.
10. Baksh, D., Yao, R., Tuan, R.S. 2007. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* **25**: 1384 –92.
11. Balasubramanian, S., thej, C., Venugopal, P., Priya, N., Zakaria, Z., SundarRaj, S., Sen, A. 2013. Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. *Cell Biol Int.* **37**: 507–515
12. Batsali, A.K., Kastrinaki, M.C., Papadaki, H., Papadaki, H., Pontikoglou, C. 2013. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **8**: 144-155.
13. Beltrán, N.E., Gonzáles, C.H. 2016. Técnicas de cultivo celulares e ingeniería de tejidos. Universidad Autónoma Metropolitana. Cuajimalpa, México D, S.

14. Billon, N., Jolicoeur, C. y Raff, M. 2006. Generation and characterization of oligodendrocytes from lineage-selectable embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol. Biol.* **330**: 15-32.
15. Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.M. Messi, M.L., Enikolopov, G.N., Mintz, A., Delbono, O. 2013. Skeletal muscle neural progenitor cells exhibit properties of NG2-glia. *Exp. Cell Res.* **319(1)**: 45-63.
16. Bongso, A., Fong, C.Y. 2013. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev. Rep.* **9(2)**: 226-240.
17. Buzanska, L., Machaj, E.K.; Zablocka, B., Pojda, Z., Domanska-Janik, K. 2002. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J. Cell Sci.* **115 (10)**: 21331-2138.
18. Cabero, L., Saldivar, D., Cabrillo, E. 2007. Obstetricia y medicina materna fetal. Editorial médica panamericana. Tercera edición. Madrid, España.
19. Calderón, D. 2007. Establecimiento de cultivo de células mesenquimales del cordón umbilical humano y estudio de su potencialidad de diferenciación *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.
20. Camejo, M. V., Merentes, E., Payares, T., Márquez, M. L., Espinoza, M. 2015. Aislamiento, cultivo y diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales adultas de pulpa dentaria humana. *Acta odontológica Venezolana.* **53 (1)**.
21. Campos, L.L. 2014. Aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de células troncales mesenquimales derivadas de la membrana amniótica, gelatina de Wharton y sangre del cordón umbilical de fetos bovinos. Título en medicina veterinaria. Universidad Estatal Paulista. San Paulo, Brasil.

22. Can, A., Karahuseyinoglu, S. 2007. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*. **25(11)**: 2886-95.
23. Caplan, A. 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9(5)**: 641- 650.
24. Cardozo, A.J. 2015. Mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Argentina.
25. Castro, M.E., Montesinos, J.J. 2015. Células troncales mesenquimales: biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas. *Rev. Med. UV.* **58(5)**.
26. Carvalho, M.M., Teixeira, F.G., Reis, R.L., Sousa, N., Salgado, A.J. 2011. Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **6(3)**:221-8.
27. Caviness, V., Takahashi, T., Nowakowski, R.S., 2002. Neuronogenesis and the early events of neocortical histogenesis. *Results Probl. Cell Differ.* **30**: 107-143.
28. Chan, J.L., Tang, K.C., Patel, A.P., Bonilla, L.M, Pierobon, N., Ponzio, N.M., Rameshwar, P. 2006. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood.* **107(12)**: 4817-24.
29. Chatzistamatiou, T.K., Papassavas, A.C., Michalopoulos, E., Gamaloutsos, C., Mallis, P., Gontika, I., Panagouli, E. 2014. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell

- (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*. **54(12)**:3108-20.
30. Chen, S., Zhang, W., Wang, J.M., Duan, H.T., Kong, J.H., Wang, Y.X., Dong, M. y colaboradores. 2016. Differentiation of isolated human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural. *Int. J. Opthamol*. **9(1)**: 41-47.
 31. Christodoulou, I., Kolisis, F.N., Papaevangeliou, D., Zoumpourlis, V. 2013. 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 Int*. **1**: 246-134.
 32. Connolly, P., Clark, P., Curtis, A.S., Dow, J.A., Wilkinson, C.D., 1990. An Extracellular microelectrode Array for monitoring electrogenic cells in culture. *Biosens. Bioelectron*. **5(3)**: 223-234.
 33. Croft, A.P., Przyborski, S.A. 2006. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells*. **24**:1841–1851.
 34. Consuelo, M.A., Valle-Pérez, L., Cabrera, J.A., Guetara, K., Socarrás, B., Hernández, P. 2014. Caracterización fenotípica de células madre mesenquimales humanas de médula ósea y tejido adiposo. *Inmunología y Hemoterapia*. **30(2)**: 162-170.
 35. Costa, A., Silvestrini, R., Del Bino, G., Motta, R. 1987. Implications of disaggregation procedures on biological representation of human solid tumours. *Cell Tissue Kinet*. **20(2)**:171-80.
 36. Cowan, W.M. 1987. Organización del cerebro. Investigación y ciencias. 68-82.

37. Davies, J.E., Walker, J.T., Keating, A. 2017. Concise review: Wharton`s jelly: the rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Transl. Med.* **6(7)**:1620-1630.
38. Day, J.G., Stacey, G. 2007. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Editorial Humana Press. Segunda Edición. New Jersey, EEUU.
39. Delcroix, G.J., Curtis, K.M., Schiller, P.C., Montero-Menei, C.N., 2010. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells. *Differentiation*. **80**: 213–227.
40. Di Naro, E., Ghezzi, F., Raio, L., Franchi, M., D'Addario, V. 2001. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **96(2)**: 150- 157.
41. Djuwantono, T., Wirakusumah, F.F., Achmad, T.H., Sandra, F., Halim, D., Faried, A. 2011. A comparison of cryopreservation methods: Slow-cooling vs. rapid-cooling based on cell viability, oxidative stress, apoptosis, and CD34⁺ enumeration of human umbilical cord blood mononucleated cells. *BMC. Res. Notes.* **4**: 371.
42. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., y colaboradores. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. **8(4)**: 315- 317.
43. Drela, K., Lech, W., Figiel-Dabrowska, A. Zychowicz, M., Mikula, M., Sarnowska, A., Domanska-Janik, K. 2016. Enhanced neuro-therapeutic potential of wharton`s jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. *Cytotherapy*. **18(4)**: 497-509.

44. Ericksson, J.E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Méndez, M., Pallari, M.H., Goldman, R. D. 2009. Introducing Intermediate Filaments: From Discovery to Disease. *J. Clin. Invest.* **119 (7)**: 1763-71.
45. Escarabajal, M.D., Portavella, M., Viñuela, M.C., Vargas, J.R. 2006. Fundamentos de psicología, libros de prácticas I. Delata publicaciones. Primera edición. Madrid, España.
46. Eynard, A.R., Valentich, M.A., Rovasio, R.A. 2008. Histología y embriología del ser humano, bases celulares y moleculares. Editorial medica panamericana. Cuarta edición. Buenos aires, Argentina.
47. Fan, C.G., Zhang, Q., Zhou, J. 2011. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem Cell Rev.* **7(1)**:195-207.
48. Fiore, E., Picazo, E., Aquino, J., Mazzolini, G. 2017. Células madre mesenquimales y medicina regenerativa en la cirrosis hepática. *Medicina.* **77**: 135-142.
49. Flores-Figueroa, E., Montesinos, J.J., Mayani, H. 2006. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev. Invest. Clin.* **58(5)**: 498-511.
50. Forraz, N., McGuckin, C.P. 2011. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif.* **44(1)**: 60–69.
51. Frausin, S., Viventia, S., Falzacappa, L.V., Quattromania, M.J., Leanza, G., Tommasini, A., Valencic, E. 2015. Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta. Histochemica.* **117(4-5)**: 329-38.

52. Freshney, R.I. 2005. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley-Hoboken. 5th edition. New York, E.E.U.U.
53. Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I., Petrakova, K.V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **16(3)**: 381-390.
54. Friedenstein, A.J, Gorskaja, J.F., Kulagina, N.N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4(5)**: 267-274.
55. Gajda, B., Katska-Ksiazkie, L., Rynska, B., Smorag, Z. 2007. Survival of bovine fibroblasts and cumulus cells after vitrification. *Cryo. letters.* **28(4)**:271-9
56. García, M.J., Colon, M.F., Sala-Roda, M.P., Sánchez, E.B., Del Castillo, L., Gómez, M. 2006. Técnico especialista en anatomía patológica del servicio vasco de salud-osakidetza. Editorial MAD, S.I. Primera Edición. Madrid, España.
57. García, B.S. 2015. Aplicaciones farmacológicas de las células madre. Trabajo de final de grado. Universidad Complutense. Madrid, España.
58. Garzon-Perdomo, D.K., De los Reyes, L.M., Turner, L.F. 2017. Metodologías utilizadas en la diferenciación de células madre mesenquimales a linaje neuronal. *Acta. Neurol. Colomb.* **33(4)**: 299-306.
59. Gil, P.E. 2011. Cultivo de Células Animales y Humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa. Editorial Visión Libros, Primera Edición. Madrid, España.
60. Gilbert, S.F. 2005. Biología del desarrollo. Editorial Médica Panamericana. Séptima Edición. Buenos Aires, Argentina.

61. Grant, P., Pant, H.C. 2000. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J. Neurocytol.* **29 (11-12)**: 843–872.
62. Guerrero, D.P., Romero, J.A., Pardo, V.M. 2007. Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. *NOVA.* **5(8)**: 101- 212.
63. Ha, S.Y., Jee, B.C., Suh, C.S., Kim, H.S., Oh, S.K., Kim, S.H., Moon, S.Y. 2005. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Hum. Reprod.* **20**:1779-1785.
64. Helgason, C., Miller, C. 2005. *Methods in Molecular Biology*. Editorial Human Press, Tercera Edición.
65. Hendijani, F., Sadegui-Aliabadi, H., Haghjooy, J.S. 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. *Cell Tissue Bank.* **15(4)**: 555-65.
66. Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M.O., Fiedler, J., Boehm, B.O., Maisel, M., y colaboradores. 2004. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* **117(19)**: 4411–22.
67. Horwitz, E.M. 2003. Stem Cell Plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch. Med. Res.* **34(6)**:600-6.
68. Hunt, C.J. 2011. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. *Transfus. Med. Hemother.* **38(2)**:107-123.
69. Ilancheran, S., Moodley, Y., Manuelpillai, U. 2009. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair. *Placenta.* **30**: 2-10.

70. Jaenisch R., Young R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. **132(4)**: 567-82.
71. Jaswir, I., Noviendri, D., Salleh, H.M., Taher, M., Miyashita, K. 2011. Isolation of fucoxanthin and fatty acids analysis of *Padina australis* and cytotoxic effect of fucoxanthin on human lung cancer (H1299) cell lines. *African J Bio*. **10(81)**: 18855-862.
72. Jeschke, M.G., Gauglitz, G.G., Phan, T.T., Herndon, D.N., Kita, K. 2011. Umbilical cord lining membrane and Wharton`s jelly-derived mesenchymal stem cells: the similarities and differences. *J. Tissue Eng. Regen. Med. J*. **4**: 21-27.
73. Kadner, A., Zund, G., Maurus, C., Breymann, C., Yakarisik, S., Kadner, G., Turina, M., y colaboradores. 2004. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. **25(4)**: 632-641.
74. Kalaszczynska, I., Ferdyn, K. 2015. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells; future of regenerative medicine?. *Biomed. Res. Int*. **2015**: 1-11.
75. Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G.G., Demiralp, D.O., Tukun, A., y colaboradores. 2007. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys. *Stem Cells*. **25(2)**: 319-331.
76. Kasai, M., Mukaida, T. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod. Biomed. Online*. **9(2)**:164-70.
77. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., Bieback, K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. **24(5)**: 1294-301.

78. Khatami, S.M., Zahir, S., Maleki, M., Hamidi, K. 2014. Stem cell isolation from human Wharton's jelly: a study of their differentiation ability into lens fiber cells. *Cell J.* **15(4)**: 364-371.
79. Kierszenbaum, A.L., Tres, L. 2011. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. Editorial Elsevier-Mosby. Tercera edición. Philadelphia, E.E.U.U.
80. Kim, D.W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.D., Borlongan, C.V. 2013. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 11692- 712.
81. Koc, O.N., Lazarus, H.M. 2001. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant.* **27(3)**:235-239.
82. Koning, J.J., van Dongen, J.W., Schroder, F.H. 1993. Preferential loss of abnormal prostate carcinoma cells by collagenase treatment. *Cytometry.* **14(7)**:805-10.
83. Kuleshova, L.L., Tan, F.C.K., Magalhaes, R., Gouk, S.S., Lee, K.H., Dawe, G.S. 2009. Effective cryopreservation of neural stem or progenitor cells without serum or proteins by vitrification. *Cell Transplan.* **18**: 135-44.
84. Kunkel, W. 2005. Atlas color de histología e histología. Editorial panamericana. Onceava edición. México D.S.
85. Kurz, D.J., Hong, Y., Trivier, E., Huang H.L., Decary, S., Zang, G.H., Luscher, T.F. y colaboradores. 2003. Fibroblast growth factor-2, but not vascular endothelial growth factor, upregulates telomerase activity in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23(5)**: 748-54.

86. Lariviere, R.C., Julien, J.P. 2004. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J. Neurobiol.* **58(1)**:131-48.
87. La Rocca, G., Anzalone, R., Corrao, S., Magno, F., Loria, T., Lo Iacono, M., Di Stefano, A. 2009. Isolation and characterization of Oct-4⁺/HLA-G⁺ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem. Cell Biol.* **131(2)**: 267-82.
88. Lee, H., Han, N.R., Hwang, J.Y., Yun, J.I., Kim, C., Park, K.H., Lee, S.T. 2016. Gelatin directly enhances neurogenic differentiation potential in bone marrow-derived mesenchymal stem cells without stimulation of neural progenitor cell proliferation. *DNA cell biology.* **35(9)**: 530-6.
89. Leeson, T.S., Leeson, C.R., Paparo, A.A. 1990. Texto/Atlas de Histología. Editorial McGraw-Hill- Interamericana. Primera Edición. México.
90. Leiva, L. 2017. Potencial neurogénico de las células mesenquimales de la membrana amniótica humana. Trabajo final de grado. Universidad Católica Andrés Bello. Caracas, Venezuela.
91. Lim, I.J., Phan, T.T. 2014. Epithelial and mesenchymal stem cells from the umbilical cord lining membrane. *Cell Transplant.* **23(4-5)**:497-503.
92. Lu, S., Lee, E.J., Lam, J., Tabata, Y., Mikos, A.G. 2016. Evaluation of gelatin microparticles as adherent-substrates for mesenchymal stem cells in hydrogel composite. *Ann. Biomed. Eng.* **44(6)**: 1894-1907.
93. Lyck, L., Dalmau, I., Chemnitz, J., Finsen, B., Schroder, H.D. 2008. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *J. Histochem. Cytochem.* **56(3)**:201-21
94. Ma, L., Feng, X.Y., Cui, B.L., Law, F., Jiang, X.W., Yang, L.Y., Xie, Q.D., y colaboradores. 2005. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived

- mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin. Med. J.* **118(23)**:1987-93.
95. Magaña, A. 2011. Efecto del método de criopreservación y de la blastolectomía sobre el desarrollo in vitro de los blastocitos bovinos. Tesis Especial de Grado. Universidad Veracruzana, Veracruz, México.
96. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Biología de los microorganismos. Editorial Pearson. Décima edición. Madrid, España.
97. Manzano, P.R., Chavira, C.T., Hernández, R.O. 2014. Adaptación de la técnica de impregnación argéntica de Ilombart para la demostración de fibras nerviosas, en cualquier tejido en cortes por parafina. *Int. J. Morphol.* **32(3)**: 973-980.
98. Márquez-Curtis, L.A., Janowska-Wieczorek, A., McGann, L.E., Elliott, J.A. 2015. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology.* **71(2)**:181-97.
99. Márquez, M.L., Hernández, A., Scioscia, D., Merentes, E. 2012. Cultivo de células de cartílago nasal humano. *Gac. Med.* **120**: 48-54.
100. Martín-Piedra, M.A., Garzon, I., Oliveira, A.C., Rodríguez, C.A., Sánchez-Quevedo, M.C. 2013. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy.* **15**: 507-18.
101. Martínez, J. M., Martínez, J. M. 2010. Review of intermediate filaments with special reference to cytokeratins. *Rev. Comp. Ciencias Veterinarias.* **4(2)**: 1-11.
102. Marshak, D.R., Gardner, R., Gottlieb, D. 2001. Stem cell biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EEUU.

- 103.** Massood, E., Maryam, K., Parvin, S., Mojgan, M., Seyed, N.M. 2013. Vitrification of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *CryoLetters*. **34(5)**: 471-480.
- 104.** Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G.J., Sánchez-Monroy, V. 2013. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatol. Reprod. Hum.* **27(3)**: 194-199.
- 105.** McElreavey, K.D., Irvine, A.I., Ennis, K.T., McLean, W.H. 1991. Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans.* **19(1)**: 29S.
- 106.** Mennan, C., Wrihght, K., Bhattacharjee, A., Balain, B., Richardson, J., Roberts, S. 2013. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Bio. Med. Res. Int.* **2013**: 916136, 8 pág.
- 107.** Merentes, E. 1993. Establishment of embryonic stem cells lines and their developmental potentiality. Tesis doctoral. Universidad de Ciencias Eötvös Lorand, Budapest, Hungría.
- 108.** Merentes, E. 2009. Fuentes de obtención de células madre mesenquimales. Potencialidad de diferenciación *in vitro*. Trabajo de Ascenso a Titular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- 109.** Merentes, 2016. Manual de técnicas básicas del cultivo celular. Ediciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- 110.** Merentes, E., Camejo, M.V., Navarro, E., Márquez, M.L. 2016. Biomatrices naturales en la bioingeniería de tejidos. *MIBE*. **8**:45-48.

111. Merentes, E., Márquez, M.L., Rodríguez, M. 2012. Fuentes de células para la bioingeniería de tejidos. *MIBE*. **6**: 73-76.
112. Meyer, M. 2012. Establecimiento del cultivo de células madre mesenquimales de la membrana amniótica. Caracterización y diferenciación *in vitro*. Facultad de ciencias. UCV. Caracas, Venezuela.
113. Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M. Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B. y colaboradores. 2003. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. **21(1)**: 50-60.
114. Mizoguchi, M., Suga, Y., Sanmano, B., Ikeda, S., Ogawa, H. 2004. Organotypic culture and surface plantation using umbilical cord epithelial cells: morphogenesis and expression of differentiation markers mimicking cutaneous epidermis. *J. Dermatol. Sci*. **35**: 199-206.
115. Montuenga, L., Esteban, F., Calvo, A. 2009. Histología y Biología Celular. Editorial Elsevier. Primera Edición. Barcelona, España.
116. Moon, J.H., Lee, J.R., Jee, B.C., Suh, C.S., Kim, S.H., Lim, H.J., Kim, H.K. 2008. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum. Reprod*. **23(8)**:1760-70.
117. Moore, K. L., Persaud, T.V., Torchia, M.G. 2010. Embriología clínica. Editorial Elsevier. Novena Edición. España.
118. Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. **65(1-2)**:55-63.
119. Nagamura-Inoue, T., He, H. 2014. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J. Stem Cells*. **6(2)**: 195–202.

- 120.** Nombela, C. 2007. Células Madre- encrucijadas biológicas para la Medicina: del tronco embrionario a la regeneración adulta. Editorial Edaf. Primera Edición. Madrid, España.
- 121.** Obara, C., Takizawa, K., Tomiyama, K., Hazawa, M., Saotome-Nakamura, A., Gotoh, T., Yasuda, T., y colaboradores. 2016. Differentiation and molecular properties of mesenchymal stem cells derived from murine induced pluripotent stem cells derived on gelatin or collagen. **2016**: 9013089, 10 pág.
- 122.** Olaya, M., Vargas, W., Bernal, J.E. 2015. Una aproximación desde la física a las consecuencias patológicas de la longitud excesiva del cordón umbilical. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* **66(1)**: 53-60.
- 123.** Oliver-Vila, I., Coca, M.I., Grau-Vorster, M., Pujals-Fonts, N., Caminal, M., Pla, A., García, J., y col. 2015. Off-the-shelf mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord tissue. *BMC Proc.* **9(9)**:65.
- 124.** Pacini, S. 2013. Biology of MSCs isolated from different tissues, in essentials of mesenchymal stem cell biology and its clinical translation. *Springer.* 17-32.
- 125.** Palasz, A.T., Mapletoft, R.J. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.* **14**:127-149
- 126.** Paniagua, R., Nistal, P., Álvarez-Uría, M., Sesma, P., Fraile, B., Anadòn, R., Sáez, F.J. 2007. Biología celular. McGraw-Hill-Interamericana. Tercera Edición. Madrid, España.
- 127.** Park, K.S., Lee, Y.S., Kang, K.S. 2006. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *J. Vet. Sci.* **7(4)**: 343–348.

128. Parry, E.W. 1970. Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord. *J. Anat.* **107(3)**: 505-518.
129. Pascual, G., Montes, M.A., Perez-Rico, C., Perez-Kohler, B., Bellon, J.M. Buján, J. 2010. Expression of embryonic markers in pterygium derived mesenchymal cells. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* **85(12)**:400-4.
130. Pérez, E. 2014. Terapia intravenosa con células mesenquimales en la fase aguda del daño cerebral. Estudio experimental en un modelo animal de trauma craneal pediátrico. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Madrid. Madrid, España.
131. Piña, L.A., Manosalva, C.A., Allel, C.R. 2015. Patología del ombligo. *Rev. Ped. Electr.* **12(1)**:28-39.
132. Pittenger M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., y colaboradores. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* **284(5411)**:143-147.
133. Poch, M.L. 2001. Neurobiología del desarrollo temprano. *Contextos Educativos.* **4**:79-94.
134. Prósper, F., Hebreros, J. 2004. Células Madre adultas. *Rev. Argent. Cardiol.* **72**: 68-73.
135. Prósper, F., Verfaillie, C.M. 2003. Células Madre Adultas. *An. Sist. Sanit. Navar.* **26(3)**: 345-356.
136. Purves, D., Augustine, G.J, Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A.S., Mcnamara, J., y colaboradores. 2007. Neurociencia. Editorial Médica Panamericana. Tercera edición. México.
137. Raff, M. 2003. Adult stem cell plasticity: fact or artefact?. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 1-22.

138. Raio, L., Ghezzi, F., Di Naro, E., Gomez, R., Franchi, M., Mazor, M., Bruhwiler, H. 1999. Sonographic measurement of the umbilical cord and fetal anthropometric parameters. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Repro. Biol.* **83(2)**: 131-135.
139. Rasul, Z., Ahmed, N., Anzar, M. 2007. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology*. **68(5)**: 813-19.
140. Reubinof, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., Bongso, A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat. Biotechnol.* **18(4)**: 399-404.
141. Riaño, N.B., Vera, V.J., Villamil, L.C. 2007. Las células madre mesenquimales desde la perspectiva de las ciencias veterinarias. *Rev. Med. Vet.* **13**: 19-26.
142. Rodríguez, A.P., Amorim, C.A., Costa, S.H., Matos M.H., Santos, R.R., Lucci, C.M., Báó, S.N., y colaboradores. 2004. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*. **61(6)**: 1009-24.
143. Rodríguez, A., Domínguez, S., Cantin, M., Rojas, M. 2015. Embriología del sistema nervioso. *Int. J. Med. Surg. Sci* **2(1)**:385-400.
144. Rojas, I.A., Bertholdo, D., Castillo, M. 2012. Células madre: implicaciones en el desarrollo de tumores cerebrales. *Radiología*. **54(3)**:221-30.
145. Ross, M., Pawlina, W. 2007. Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana, Quinta Edición. Madrid, España.

146. Rota, A., Milani, C., Cabisianca, G., Martini, M. 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*. **65 (9)**: 1848-58.
147. Rubenstein, J., Rakic, P. 2013. Cellular migration and formation of neuronal connections. Editorial Elsevier Inc. First edition. USA.
148. Sakamoto, T., Ono, H., Saito, Y. 1996. Electron microscopic histochemical studies on the localization of hyaluronic acid in Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*. **48(7)**: 501-7.
149. Salehinejad, P., Alitheen, N.B., Ali, A.M., Omar, A.R., Mohit, M., Janzamin, E., Samani, F.S., y colaboradores. 2012. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **48(2)**: 75-83.
150. Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D. Hosseini, M.M., Davies, J.E. 2005. Human umbilical cord perivascular cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*. **23(2)**: 220-229.
151. Schmidt, N.J. 1979. Cell culture techniques for diagnostic virology, in diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Editorial APHA. Washington, D.C. USA.
152. Semenov, O. V., Koestenbauer, S., Riegel, M., Zech, N., Zimmermann, R., Zisch, A. H., Malek, A. 2009. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **20**: 191-193.
153. Sharp, J.A. 1980. Introducción al cultivo de tejidos animales. Ediciones Omega, S.A. Primera edición. Barcelona, España.

- 154.** Simons, B.D., Clevers, H. 2011. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell*. **145(6)**: 851–62.
- 155.** Shivakumar, S.B., Bharti, D., Jang, S.J., Hwang, S.C., Park, J.K., Shin, J.K., Byun, J-H., y colaboradores. 2015. Cryopreservation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells following controlled rate freezing protocol using different cryoprotectants; a comparative study. *Inter. J. Stem.* **8(2)**: 155-169
- 156.** Shivakumar, S.B., Bharti, D., Subbarao, R.B., Jang, S.J., Park, J.S., Ullah, I., Park, J.K., y col. 2016. DMSO and serum free cryopreservation of Wharton's jelly tissue isolated from human umbilical cord. *J. Cell Biochem.* **117(10)**: 2397-412.
- 157.** Sobolewski, K., Bankowski, E., Chyczewski, L., Jaworski, S., 1997. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol. Neonate.* **71(1)**: 11-21.
- 158.** Soto-Rodríguez, G., Blanco-Álvarez, V.M., González-Barrios, J.A., Martínez- Fong, D., León- Chávez, B.A. 2014. Función neuroinmunológica de la glía en los procesos desmielinizantes. *Rev. Esp. Méd. Quir.* **19**:336-346.
- 159.** Sprinkle, T. 1986. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit. Rev. Neurobiol.* **4**:235-301.
- 160.** Subbarao, R.B., Ullah, I., Kim, E-J., Jang, S-J., lee, W-J., Jeon, R.H., Kang, D. 2015. Characterization and evaluation of neuronal trans-Differentiation with electrophysiological properties of mesenchymal stem cells isolated from porcine endometrium. *Int. J. Mol. Sci.* **16(5)**: 10934-951.

- 161.** Shuurmans, C., Gullemot, F. 2002. Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12(1)**:26-34.
- 162.** Takechi, K., Kuwabara, Y., Mizuno, M. 1993. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta.* **14(2)**: 235-45.
- 163.** Tantrawatpan, C., Manochantr, S., Kheolamai, P., U-Pratya, Y., Supokawej, A., Issaragrisil, S. 2013. Pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly and their differentiation potential to neural-like cells. *J. Med. Assoc. Thai.* **96(9)**:1208-17.
- 164.** Trivanović, D., Kocić, J., Mojsilović, S., Krstić, A., Ilić, V., Djordjević, I.O., Santibanez, J.F., y colaboradores. 2013. Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp. Arh. Celok. Lek.* **141(3-4)**: 178-86.
- 165.** Troyer, D.L., Weiss, M.L. 2008. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells.* **26(3)**: 591-599.
- 166.** Tsagais, N., Koliakos, I., Karagiannis, V., Eleftheriadou, M., Koliakos, G.G. 2011. Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes. *Transfus. Med.* **21(4)**:253-61.
- 167.** Vaittinen, S., Lukka, R., Sahlgren, C., Hurme, T., Rantanen, J., Lendahl, U., Eriksson J. E. y colaboradores. 2001. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J. Neuropath. Exp. Neur.* **60**: 588-597.

168. Vunjak-Novakovic, G., Freshney, I. 2006. Culture of cells for tissue engineering. John Wiley & Sons, Inc. New jersey, E.E.U.U.
169. Wang, H.S., Hung, S.C., Peng S.T., Huang, C.C., Wei. H.M., Guo, Y.J., Fu, Y.S., Lai, M.C. y colaboradores. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical Cord. *Stem Cells*. **22(7)**: 1330-1337.
170. Wang, S., Zhao, R.C. 2013. A historical overview and concepts of mesenchymal stem cells, in essentials of mesenchymal stem cell biology and its clinical translation. *Springer*. 3-15.
171. Watson, N., Divers, R., Kedar, R., Mehindru, A., Mehindru, A., Borlogan, M.C., Borlogan, C.V. 2015. Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. **17(1)**:18-24.
172. Weissman, I.L., Anderson, D.J., Gage, F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments and transdifferentiations. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 387-403.
173. Welsch, U., Sobotta, J. 2008. Histología. Editorial medica panamericana. Segunda edición. Madrid, España.
174. Wislet-Gendebien, S., Leprince, P., Moonen, G., Rogister, B. 2003. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* **116**: 3295-3302.
175. Woodbury, D., Schwarz, E., Prockop, D., Black, I. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* **61(4)**: 364-70.
176. Wu, K.H., Zhou, B., Lu, S.H., Feng, B., Yang, S.G., Du, W.T., Gu, D.S., Han, Z.C., Liu, Y.L. 2007. *In vitro* and *in vivo* differentiation of human

umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J. Cell Biochem.* **100(3)**: 608-616.

- 177.** Ye, Z.Q., Burkholder, J.K., Qiu, P., Schultz, J.C., Shahidi, N.T., Yang, N.S. 1994. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91(25)**:12140–44.
- 178.** Yun, W.J., Bang, S.H., Min, K.H., Kim, S.W., Lee, M.W., Chang, S.E. 2013. Epidermal growth factor and epidermal growth factor signaling attenuate laser-induced melanogenesis. *Dermatol. Surg.* **39(12)**:1903-11.

ANEXOS

1) Medios y soluciones utilizadas en el cultivo *in vitro*.

1.1) Medio DMEM – F12 suplementado al 15 % SFB.

Preparación: El medio DMEM: F12 con bicarbonato, se filtra y se le realiza una prueba de esterilidad. Posteriormente, se combina con el SFB y los antibióticos- Antimicóticos.

Medio DMEM: F12.....	1
Bicarbonato de Sodio- NaHCO ₃	1.2 grs
Antibióticos-Antimicótico.....	20 ml
Suero Fetal Bovino-SFB.....	150 ml
Agua Bidestilada Desionizada.....	1000 ml

1.2) Medio Hanks- F12 (para 500 ml)

Medio Hanks-F12.....	5.3 grs
Bicarbonato de Sodio- NaHCO ₃	0.588 grs
Agua Bidestilada Desionizada.....	500 ml

1.3) Medio Hanks-F12 (Para transporte del CUH)

Antibióticos-Antimicótico.....	2 ml
Medio Hanks-F12.....	98 ml

1.4) Solución buffer de Fosfato (PBS), libre de calcio y magnesio.

Cloruro de Sodio-NaCl	8 grs
Cloruro de potasio- KCl	0.2 grs
Di-sodio Hidrógeno Fosfato Dodecahidrato- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 grs
Di-hidrógeno de Potasio Primario - KH_2PO_4	0.2 grs
Agua Bidestilada Desionizada.....	1000 ml

1.5) Solución de EDTA al 0,04%.

Ácido Etilendiaminotetraacético-EDTA.....	0.4 grs
Agua Bidestilada Desionizada.....	1000 ml

1.6) Solución de Gelatina al 1%. (Para sustrato de adhesión y de diferenciación)

Gelatina.....	1 grs
Agua Bidestilada Desionizada.....	100 ml

1.7) Solución de Tripsina al 0,25%.

Cloruro de Sodio-NaCl	8 grs
Cloruro de Potasio-KCl	4 grs
Di-sodio Hidrógeno Fosfato Dodecahidrato - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.1 grs
Trizma-Base.....	3 grs
Penicilina G.....	0.06 grs
Glucosa Monohidratada.....	1 gr
Rojo Fenol.....	0.01 grs
Tripsina.....	1 gr
Agua Bidestilada Desionizada.....	1000 ml

1.8) Solución Dispasa (1,2 unidades/ml)

Dispasa.....	0.066 gr
Antibióticos-antimicótico.....	2 ml
Medio Hanks-F12.....	100 ml

1.9) Solución de Colagenasa Tipo II (actividad 295 unidades/mg)

Colagenasa Tipo II.....	0.12 grs
Medio Hanks-F12.....	120 ml

1.10) Soluciones para la criopreservación y descongelación celular

1.10.1) Solución PBS al 20% SFB (Para 100 ml)

Suero Fetal Bovino- SFB.....	20 ml
Solución Buffer Fosfato-PBS.....	80 ml

1.10.2) Solución de Equilibrio al 20% Etilenglicol

Etilenglicol.....	20 ml
PBS al 20% SFB.....	80 ml

1.10.3) Solución de Vitricación al 40% Etilenglicol

Etilenglicol.....	20 ml
Ficoll 70.....	9 ml
Sacarosa (3M).....	3 ml
PBS al 20% SFB.....	18 ml

1.10.4) Solución de sacarosa al 0,5M

Sacarosa (5M).....	2.5 ml
PBS al 20% SFB.....	22.5ml

1.10.5) Solución de sacarosa al 0,25M

Sacarosa (5M).....	1.25 ml
PBS al 20% SFB.....	23.75ml

1.11) Medios para la diferenciación neurogénica

1.11.1) Medio preinductor con 20% SFB

β -mercaptoetanol (500 mM).....	40 μ l
SFB.....	4 ml
DMEM: F12.....	16 ml

1.11.2) Medio inductor con 2% SFB

β -mercaptoetanol (500 mM).....	140 μ l
SFB.....	0.4 ml
DMEM: F12.....	19.6 ml

1.11.2) Medio inductor sin SFB

β -mercaptoetanol (500mM).....	280 μ l
DMEM: F12.....	20 ml