



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Aislamiento, caracterización y diferenciación neural
de células troncales mesenquimales de la gelatina de
Wharton de cordón umbilical humano (hWJMSCs).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

Josiff Samuel Flores Reyes

ASESORES:
DR. EN C. JOSÉ ROMO YAÑEZ
M. EN C. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Aislamiento, caracterización y diferenciación neural de células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano (hWJMSCs).

Que presenta el pasante: **Josiff Samuel Flores Reyes**

Con número de cuenta: **309092870** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Noviembre de 2017.

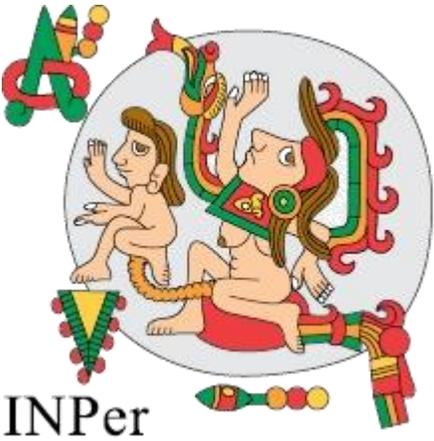
PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
VOCAL	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Q. Karla Paola Hernández Pérez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Ma. Llasbeth Hernández Calderón	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

El presente Proyecto fue elaborado en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), en el departamento de Genética y Genómica Humana bajo la dirección del Doctor en Ciencias José Romo Yáñez. No. de registro del proyecto: 3140-21202-01-15.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a mi tutor el Dr. José Romo debido a la infinita paciencia que me brindo a lo largo de todo el proyecto, dedicándome tiempo, recursos y gran esfuerzo por fundar en mí las bases de la investigación científica. Dr. José no sabe cuánto me hizo apreciar el trabajo en laboratorio con celulas troncales y gracias por fijarme retos que ahora me permiten plantearme más firme y convencido de lo desafiante, prometedora y curiosa que puede ser la investigación. Muchas gracias por su confianza y lamento las molestias ocasionadas.

Igualmente, a mi tutora la M. en C. Maritere Domínguez Rojas quien probablemente no lo sepa, pero su confianza en mí me ayudo a concluir este proyecto, dándome ese impulso final e inspirándome con sus enseñanzas.

Quiero agradecer especialmente a mis padres Ana María Reyes Fragoso y Samuel Flores Flores. Quienes no solo me apoyaron económicamente a lo largo de esta travesía, si no que siempre me brindaron apoyo incondicional. Instruyéndome valores que forman lo que soy actualmente e inspirándome diariamente a ser una mejor persona, sin ustedes no podría haber llegado a ningún lado ni me hubiera permitido hacer lo que realmente me gusta. Muchas gracias, no hay forma de pagar lo que han hecho por mí.

A mis hermanos Ana y Pedro quienes me han tenido que aguantar tantos años, con todas mis ideas “raras y ñoñas”. Igualmente, a mi persona favorita en la vida, mi abuelita Josefina Fragoso quien lamentablemente no pudo ver concluir el proyecto que inicie, pero sé que compartiría mi emoción y felicidad por terminar. Siempre la recordaré.

Igualmente quiero agradecer a mis amigos del INPer, a la Dra. Irma Monroy por permitirme compartir muchos momentos de alegría, pero sobre todo de experiencia. Al Dr. Ismael por ayudarme con los procedimientos de citometría de flujo y FACS, sin su ayuda jamás hubiera resultado este trabajo. Y en general a todos mis compañeros del laboratorio de genética quienes hicieron de los momentos de trabajo algo sumamente fácil, y muy placentero. Dianita, Sandy, Gaby y Oscar, gracias por todas las nieves compartidas. Los extrañaré y ojalá nuestros caminos se crucen nuevamente.

Agradezco a mis compañeras de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Arely, María, Guadalupe, Cinthya y Daniela. Por haberme acompañado durante 4 años de licenciatura y por confiar en mí, mucho antes que yo mismo. Gracias por todas las risas, siempre estaré para ustedes.

Finalmente agradezco a la UNAM por haberme resguardado durante toda mi etapa escolar, simplemente la mejor Universidad y a Dios por haber guiado mis pasos de formas misteriosas.

“It is most important in creative science not to give up. If you are an optimist you will be willing to "try" more than if you are a pessimist.”

Stanislaw Ulam,
Adventures of a Mathematician, 1976.

Este escrito está dedicado a mis padres **Samuel Flores y Ana Reyes** quienes han sido mi soporte y ejemplo durante toda mi vida, a mis hermanos **Ana, Pedro y Melany** quienes siempre creyeron en mí.

Y especialmente quiero dedicarlo a la memoria de mi abuelita **Josefina**, quien durante muchos años me brindo todo su cariño y comprensión inspirándome a ser siempre alguien mejor.

Gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	V

I. INTRODUCCIÓN..... 1

A. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES.....	2
B. CÉLULAS TRONCALES.....	6
C. CLASIFICACIÓN.....	7
D. FUENTES DE CÉLULAS TRONCALES.....	10
E. EL CORDÓN UMBILICAL HUMANO	12
F. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO	14
G. DIFERENCIACIÓN CELULAR	16
H. CRITERIOS DE LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR.....	19

II. OBJETIVOS..... 22

A. OBJETIVO GENERAL.....	22
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22

III. METODOLOGIA 23

A. AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE LA GELATINA DE WHARTON DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO.....	24
B. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES AISLADAS DE LA GELATINA DE WHARTON DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO.....	25
C. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES AISLADAS DE LA GELATINA DE WHARTON DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO.....	25
D. PROTOCOLO DE TINCIÓN DE HWJCS PARA INMUNOFENOTIPIFICACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	26
E. SELECCIÓN DE HWJMCS POR FACS.....	27
F. SELECCIÓN DE HWJMCS UTILIZANDO KIT DE MICROPERLAS.....	28
G. EXPERIMENTOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR ADIPOSA	28
H. PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN NEURAL	29
I. EVALUACIÓN DE DIFERENCIACIÓN NEURAL POR EPIFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	31

J.	EVALUACIÓN DE DIFERENCIACIÓN NEURAL POR EXPRESIÓN DE GENES.....	32
K.	EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES DE TRONCALIDAD Y DIFERENCIACIÓN NEURAL POR RT-PCR	34
L.	EXTRACCIÓN DE DNA DE GEL DE AGAROSA Y SECUENCIACIÓN.....	34
IV.	<u>RESULTADOS.....</u>	36
A.	AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR <i>IN VITRO</i> DE HWJMSC.	36
B.	CURVAS DE PROLIFERACIÓN PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO CELULAR.....	37
C.	CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DE LA MATRIZ DE CORDÓN UMBILICAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	38
D.	ENRIQUECIMIENTO DE HWJMSCs POR FACS.	41
E.	DIFERENCIACIÓN ADIPOSA DE HWJMSCs.	44
F.	DIFERENCIACIÓN TIPO NEURAL DE LAS HWJMSCs.	46
V.	<u>ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</u>	53
VI.	<u>CONCLUSIONES</u>	63
VII.	<u>PERSPECTIVAS</u>	64
VIII.	<u>REFERENCIAS.....</u>	65

ABREVIATURAS

AR: Ácido retinoico.

AV: Ácido valproico.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *brain derived neurotrophic factor*.

BHA: hidroxibutilanisol, del inglés *Butylated hydroxyanisole*.

BSA: Albúmina sérica bovina, del inglés *bovine serum albumine*.

CD: Cúmulo de diferenciación, del inglés *cluster of differentiation*.

cDNA: DNA complementario, del inglés *complementary deoxyribonucleic acid*.

CFU-F: Unidades formadoras de colonias de fibroblastos, del inglés *colony forming units of fibroblast*.

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dubelco, del inglés *Dubelcco's modified Eagle medium*.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ESC: Células troncales embrionarias, del inglés *Embryonic Stem Cells*.

FACS: Clasificación de células activadas por fluorescencia, del inglés *Fluorescence-Activated Cells Sorting*.

FBS: Suero fetal bovino, del inglés *fetal serum bovine*.

FC: Citometría de flujo, del inglés *flow cytometry*.

FGF- β : Factor de crecimiento fibroblástico β , del inglés *fibroblast growth factor β* .

FSK: Forskolina.

GFAP: Proteína glial ácida fibrilar, del inglés *glial fibrillar acidic protein*.

HSC: Células troncales hematopoyéticas, del inglés *Hematopoyetic Stem Cells*.

IF: Inmunofluorescencia.

iPSCs: Células troncales pluripotenciales inducidas, del inglés *induced pluripotent stem cells*.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular, del inglés *International Society for Cellular Therapy*.

MAP-2: Proteína asociada a microtúbulos 2, del inglés *microtubule-associated protein 2*.

MO: Médula ósea.

MSC: Células troncales mesenquimales, del inglés *Mesenchymal or stromal stem cells*.

NES: Nestina.

NF-L: Neurofilamento de la cadena ligera, del inglés *neurofilament light chain*.

PBS: Buffer fosfato salino, del inglés *phosphate buffered saline*.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*.

PPARG: Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*.

RNA: Ácido ribonucleico, del inglés *ribonucleic acid*.

SOX2: Región Y determinante del sexo, caja 2, del inglés *Sex determining Region Y-box 2*.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TD: Tiempo de duplicación

TH: Tirosin hidroxilasa.

TUB-βIII: Tubulina beta clase III.

hUC: Cordón umbilical humano, del inglés *human umbilical cordón*.

WJ: Gelatina de Wharton, del inglés *Wharton's jelly*.

WJMSC: Células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton, del inglés *Wharton's jelly mesenchymal stem cells*.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. LÍNEA DEL TIEMPO SOBRE LA INVESTIGACIÓN EN CÉLULAS TRONCALES.....	3
FIGURA 2. PROCESO MESENGÉNICO.. ..	5
FIGURA 3. DEFINICIÓN GRÁFICA DE CÉLULA TRONCAL (SC).....	6
FIGURA 4. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES HUMANAS DE ACUERDO CON SU POTENCIALIDAD Y ORIGEN	8
FIGURA 5. POTENCIA CELULAR. EJEMPLOS DE CÉLULAS TRONCALES CON BASE EN SU POTENCIAL DE PLASTICIDAD.....	9
FIGURA 6. PRINCIPALES FUENTES DE CELULAS TRONCALES MESENGIMALES (MSCs).....	12
FIGURA 7. CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCs.....	14
FIGURA 8. TRATAMIENTOS PARA EL AISLAMIENTO DE HWJMCS	16
FIGURA 9. GENES REGULADORES DE LOS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN EN LAS MSCs.....	18
FIGURA 10. RESUMEN METODOLÓGICO DEL PROCESO DE AISLAMIENTO, PROLIFERACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN NEURAL DE LAS HWJMCS.....	23
FIGURA 11. MORFOLOGÍA DE CÉLULAS MESENGIMALES AISLADAS DE LA GELATINA DE WHARTON DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO, CULTIVADOS EN MEDIO CHANG SUPLEMENTADO CON 1% ANTIBIÓTICOS Y FUNGICIDA, INCUBADAS A 37°C, 5%CO2 Y 95% DE HUMEDAD RELATIVA	36
FIGURA 12. PROLIFERACIÓN DE LAS HWJCS EN CULTIVO <i>IN VITRO</i>	37
FIGURA 13. CARACTERIZACIÓN CON TINCIÓN SENCILLA DE HWJCS POR MARCADORES DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO	39
FIGURA 14. CARACTERIZACIÓN DE DOS POBLACIONES IDENTIFICADAS EN LAS CÉLULAS DE LA GELATINA DE WHARTON	40
FIGURA 15. FACS PARA EL ENRIQUECIMIENTO DE WJMCS CON FENOTIPO CD31-, CD34-, Y CD45-	42
FIGURA 16. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR ENRIQUECIDA CON HWJMCS, DESPUÉS DE LA SELECCIÓN NEGATIVA DE CD31, CD34 Y CD45	43
FIGURA 17. PROLIFERACIÓN DE LAS HWJMCS POST SORTING, CON POBLACIÓN ENRIQUECIDA CD31-, CD34- Y CD45-	44
FIGURA 18. RESULTADOS DEL ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN ADIPOSITA DE LAS WJMCS.....	45
FIGURA 19. RESUMEN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INDUCCIÓN DE DIFERENCIACIÓN NEURAL ENSAYADOS EN LAS HWJMCS	46
FIGURA 20. RESUMEN DE LOS CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA CELULAR DE LAS HWJMCS DE ACUERDO CON LOS PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN NEURAL, POR MICROSCOPIA ÓPTICA	48
FIGURA 21. MICROSCOPIA ÓPTICA DE HWJMCS MOSTRANDO LA MORFOLOGÍA TIPO NEURAL DESPUÉS DE 14 DÍAS CON EL TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN NEURAL (FGF2 3d, FORSKOLINA 11d).....	49
FIGURA 22. ANÁLISIS CON MARCADORES DE TRONCALIDAD Y DIFERENCIACIÓN NEURAL TEMPRANA POR RT-PCR DE LAS HWJMCS DIFERENCIADAS CON FGF 3DÍAS Y 14 DÍAS FORSK	50
FIGURA 23. INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES NEURALES EN EL CULTIVO DE HWJMCS SIN TRATAMIENTO DE DIFERENCIACIÓN NEURAL	51
FIGURA 24. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE TRONCALIDAD Y DIFERENCIACIÓN NEURAL TEMPRANA EN CULTIVO DE HWJMCS POSTERIOR A LA INDUCCIÓN NEURAL CON FGF 3 DÍAS Y FORSKOLINA 14 DÍAS	52
FIGURA 25. COMPORTAMIENTO MORFOLÓGICO DE WJCS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	54
FIGURA 26. DIFERENCIACIÓN ADIPOSITA Y OSTEOGÉNICA DE MSCs	57
FIGURA 27. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS PRINCIPALES VÍAS DE ACTIVACIÓN DE PPARγ.....	58
FIGURA 28. REPORTE DE INDUCCIÓN NEURAL DE HWJMCS.....	59
FIGURA 29. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INDUCIDAS POR FORSKOLINA.	60

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS QUE DEFINEN A LAS CÉLULAS TRONCALES.....	11
TABLA 2. MARCADORES DE CÉLULAS TRONCALES DE PROGENITORES NEURALES DURANTE DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i>	18
TABLA 3. CRITERIOS DE LA ISCT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES.	19
TABLA 4. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS HWJMCS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	26
TABLA 5. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN ADIPOSA COMPARANDO LOS DIFERENTES PROCESOS DE ENRIQUECIMIENTO DE HWJMCS.	28
TABLA 6. FACTORES NEUOTRÓFICOS Y DE CRECIMIENTO PARA DIFERENCIACIÓN NEURAL.	29
TABLA 7. FACTORES QUÍMICOS EN DIFERENCIACIÓN NEURAL.	30
TABLA 8. LISTA DE ANTICUERPOS EMPLEADOS PARA INMUNOFUORESCENCIAS INDIRECTAS.	31
TABLA 9. SET DE PRIMERS DISEÑADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES DE TRONCALIDAD Y DIFERENCIACIÓN NEURAL.	33
TABLA 10. FORMULACIÓN SUGERIDA PARA DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA	58
TABLA 11. GENES NEURONALES MODULADOS EN LAS HWJMCS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON FORSKOLINA	61

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton (hWJMSCs) son un grupo particular de células troncales asociadas a tejidos de recién nacidos, aisladas del tejido conectivo del cordón umbilical humano. Estas células se han caracterizado por su habilidad de adherencia al plástico, así como la expresión de marcadores de superficie como CD13, CD44, CD73, CD90 y CD105, además de la nula expresión de CD45, CD34, CD31 y CD14 entre otros. Reportes han demostrado que las hWJMSCs presentan potencial osteogénico, condrogénico y adipogénico de acuerdo con lo establecido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). El interés de estas células radica en su potencial de diferenciación no limitado al linaje mesenquimal, alta proliferación *in vitro*, baja respuesta inmune al trasplante y la fuente de obtención es el cordón umbilical por lo que no genera consideraciones bioéticas y es de fácil aislamiento a diferencia de otras fuentes como las células troncales embrionarias (ESC), o las células troncales hematopoyéticas (HSC). El presente estudio pretende establecer un método de aislamiento fácil de células troncales mesenquimales (MSCs) a partir de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano, evaluar las condiciones óptimas de cultivo y proliferación celular, caracterizar a las células y obtener una población enriquecida de hWJMSCs mediante FACS que se apeguen a los criterios fenotípicos, inmunológicos y potencial de diferenciación establecido por la ISCT; igualmente, se pretende utilizar a la población enriquecida de hWJMSCs para evaluar el mejor protocolo de inducción neural para la obtención de células tipo neurales. Como resultados apreciamos que la metodología de aislamiento por explantes de la gelatina de Wharton sin tratamiento enzimático resultó adecuada al obtener una gran cantidad de células con morfología típica de célula troncal mesénquimal en corto tiempo, el mejor medio de proliferación celular fue el medio CHANG, al tener un tiempo de duplicación celular de 22.99 ± 4.08 Hrs, sin cambio significativo con las células hWJMSCs posterior a la separación celular (Proliferación hWJMISC postsorting medio CHANG= 23.52 ± 3.37 Hrs). La caracterización de las células de la gelatina de Wharton (WJCs) reveló que más del 89% de la población celular expresaba fuertemente los marcadores de troncalidad CD105, CD90, CD73, CD44 y CD13, además de no expresar el marcador hematopoyético CD45; sin embargo, el marcador endotelial CD31 y el hematopoyético CD34 se encontraron presentes en el 40% de las WJCs. Con la finalidad de obtener una población más

homogénea se prosiguió a hacer una separación de las células que no expresaran los marcadores CD45, CD34 y CD31, por FACS. La selección de las células fue un 92.13% eficiente, al cultivarlas e inmunofenotipificarlas se destacó el mantenimiento de la expresión de los marcadores de troncalidad CD90, CD44 y CD13, con ligera disminución en la intensidad de los marcadores CD105 y CD73. Los marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34 fueron negativos en el $96.66\pm 2.13\%$ y $85.07\pm 15.03\%$ y el marcador endotelial CD31 fue negativo en un $73.18\pm 20.52\%$. Resultando en una posible población enriquecida con células mesenquimales, aunque no homogénea. Se efectuó la determinación de la capacidad adipogénica, resultando en la producción de adipocitos inmaduros, con presencia de depósitos de lípidos contrastados con Rojo oleoso-O, así como el aumento de la expresión de mRNA del marcador de diferenciación adiposa PPAR γ en los cultivos tratados con medio adipogénico. En los ensayos de diferenciación neural de las hWJMSCs se identificó al inductor Forskolina con un pretratamiento con FGF por 3 días como el mejor protocolo de diferenciación neural ya que inducía el cambio en la morfología a células tipo neurales, con disminución en la expresión de SOX2 a nivel de mRNA, manteniendo la expresión de Nestina y TUB- β III y con un notorio aumento en la expresión de MAP2 al finalizar el tratamiento neurogénico. La Inmunofluorescencia indirecta permitió identificar la expresión a nivel de proteína de los marcadores de diferenciación neural temprana TUB- β III, MAP2, y NF-L muy específico en las células con morfología tipo neural, además de la expresión de TH propio de las células neurales en un mayor grado de maduración.

Estas observaciones permiten situar a las hWJMSCs como una excelente opción alterna para el estudio de las propiedades de las células troncales humanas, por su fácil aislamiento de un tejido considerado de desecho, alta proliferación in vitro y potencial adipogénico. La propuesta de la selección celular con CD31-, CD34- y CD45- permitió el enriquecimiento de MSC de las células de la gelatina de Wharton (WJCs) y finalmente el protocolo con la preinducción con FGF por 3 días y Forskolina por 14 días resultó muy fácil y con buenos rendimientos para la obtención de células tipo neurales, ya que el interés clínico de las células troncales destaca en la reparación de tejidos; además son excelentes candidatas para formar modelos celulares para la investigación básica que permitan el entendimiento de los mecanismos involucrados en los procesos de proliferación y diferenciación de muchas enfermedades.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el interés en el uso de las células troncales ha ido en aumento, destacándose en áreas como terapia celular y medicina regenerativa (Zeddou et al., 2010), sin embargo, aún poco se conoce sobre su uso como modelos celulares para la investigación citotóxica o bien en enfermedades embrionarias, como defectos congénitos del sistema nervioso central, cardiopatías u otras embriopatías que puedan ser causadas por defectos en los mecanismos de diferenciación celular (Corrao et al., 2013), y de las cuales hasta la fecha no se han podido comprender los mecanismos celulares que las conllevan por la falta de modelos de estudio apropiados.

Las células troncales mesenquimales (MSC) pueden ser aisladas de diferentes matrices. De tejidos adultos se pueden aislar de médula ósea, sangre periférica y tejido adiposo; sin embargo, su potencialidad es limitada, y su obtención resulta de métodos invasivos; de tejidos asociados a recién nacidos se pueden aislar de diversas fuentes como son fluido amniótico, membrana amniótica, saco vitelino, placenta, y siendo la más utilizada el tejido del cordón umbilical humano (hUC) así como su sangre (Hass, Kasper, Böhm, & Jacobs, 2011). Recientemente los bancos de células troncales han optado por preservar las células del tejido de cordón umbilical (Grewal et al., 2003), ya que al ser obtenido durante la cesárea no requiere procesos invasivos y al ser un tejido considerado de desecho no genera consideraciones bioéticas. Del tejido de cordón umbilical humano se pueden obtener células mesenquimales, las cuales debido a su capacidad de autorenovación y su naturaleza indiferenciada multipotencial puede dar origen a diversas líneas celulares especializadas con gran potencial proliferativo (Zeddou et al., 2010). Las células troncales mesenquimales aisladas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano (hWJMSCs) destacan como una de las mejores opciones para su aislamiento debido a su alta capacidad proliferativa, baja respuesta inmune al trasplante, fácil aislamiento, buen rendimiento celular (Batsali, Kastrinaki, Papadaki, & Pontikoglou, 2013), y por su capacidad de diferenciación en linajes celulares de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo; además de que existe una gran cantidad de documentación que respalda su uso. Reportes recientes sugieren que estas células se han podido diferenciar en células neurales de manera *in vitro* e *in vivo* (Frausin et al., 2015). La diferenciación

neural se produce mediante inductores químicos y factores de diferenciación que propician el destino celular, simulando el ambiente donde se desarrollan. El presente trabajo tiene como propósito establecer el cultivo *in vitro* de las células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton analizando las condiciones óptimas de aislamiento, proliferación y cultivo, además de conocer los marcadores celulares que permitan caracterizar adecuada y eficazmente a las hWJMSC, así como seleccionar un protocolo de inducción neural que permita evaluar la multipotencialidad de estas células.

A. Antecedentes históricos de las células troncales

La historia de las células troncales es muy extensa al tener registros desde la antigua Grecia como lo es el viejo aforismo de Hipócrates, “lo semejante cura a lo semejante” el cual fue retomado y practicado por Paracelso en el siglo XVI, fundando así la idea básica de la terapia celular. Sin embargo, siendo estrictos los primeros trabajos de los cuales se tienen registros en el área de ingeniería de tejidos datan de hace más de 300 años, cuando el cirujano holandés Job-Van Meek'ren reportó en 1668 los primeros injertos óseos. Posteriormente en una serie de experimentos fueron realizados por Ollier en 1867 demostró la formación de nuevo hueso a partir del trasplante de periostio (Hernigou & Homma, 2012). Goujon en 1869 fue el primero en reportar el potencial osteogénico de la médula ósea, lo cual fue confirmado gracias a los experimentos de Tavassoli y Crosby hasta 1968 (Bianco, Robey, & Simmons, 2009). Estas aproximaciones en humanos permitieron vislumbrar la capacidad del cuerpo de repararse a sí mismo, pero por mucho tiempo no se conocieron los agentes celulares causantes. Fue en 1950 con el aislamiento de células de carcinoma embrionario (ECCs) de teratocarcinomas en ratones cuando se descubrió una población de células con la capacidad de diferenciación *in vitro* en todas las capas germinales (Yu and Thomson, 2008). En 1964 los investigadores Kleinsmith y Pierce demostraron que una sola ECC podía autorrenovarse y producir diferentes linajes celulares, definiendo así la existencia de las células troncales pluripotenciales dentro de las ECC, las cuales constituyen las bases intelectuales de las células troncales embrionarias de ratón y de humano. Estos trabajos permitieron dilucidar la existencia de células capaces de diferenciarse en diferentes líneas celulares de forma *in vitro*, por lo que diferentes grupos continuaron investigando modelos de desarrollo embrionario *in vivo*.

En 1980 Martin pudo conocer a las células homólogas humanas a las ECCs de los ratones, siendo conocidas como células de la masa interna del blastocisto (ICM), las cuales presentaban ventajas sobre las líneas de ECCs al no tener un potencial de diferenciación limitado, y la ocurrencia de aneuploidias era menor en comparación con las células provenientes de ratones quiméricos, por lo que se vio favorecido el uso de las ICM sobre las ECCs como modelo de desarrollo (Martin, 1980). A partir de aquí se desarrollaron líneas celulares troncales de origen embrionario derivadas de la ICM, el descubrimiento del factor inhibidor de leucemia (LIF) en 1988 permitió el mantenimiento celular en estado indiferenciado sin la necesidad de tener capas de cultivo fibroblásticas de origen embrionario. Como se aprecia en la FIGURA 1, el descubrimiento de la ICM inició el uso de las ESCs en la investigación con células troncales. A finales de los años 60's gracias a los trabajos realizados por Friednstein y colaboradores quienes utilizando modelos de roedores, describieron una población de células adherentes de médula ósea (MO), que formaba parte del estroma celular y daba origen al microambiente hematopoyético,

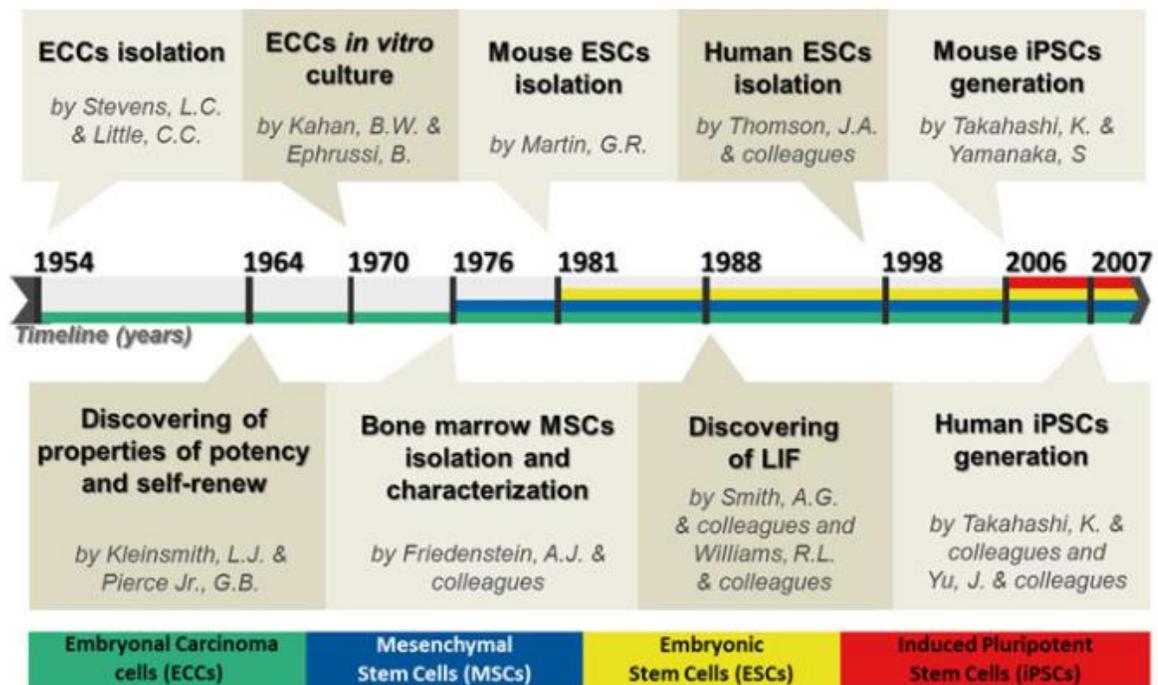


FIGURA 1. Línea del tiempo sobre la investigación en células troncales. Esquema temporal donde se destacan los eventos más representativos en la historia de la investigación con células troncales, desde su aislamiento de ECC en 1954, hasta el desarrollo de iPSC humanas en el 2007. (Olivera, Glaser, Ulrich, & Correa-Velloso, 2016).

nombrándolas en 1970 como CFU-Fs de sus siglas en inglés unidades formadoras de colonias de fibroblastos, las cuales mostraban habilidades de autorenovación (Flores-Figueroa, Montesinos, & Mayani, 2006). Posteriormente observaron que múltiples tejidos esqueléticos como hueso, cartílago, tejido adiposo y fibroso podía ser generado *in vivo*, a partir de la progenie de una sola célula del estroma de la médula ósea, a los cuales llamaron progenitores osteogénicos determinados y más tarde junto con Owen las denominaron células troncales osteogénicas o células troncales estromales de médula ósea (Owen & Friedenstein, 1988). Estos descubrimientos son la razón por lo cual se les atribuye a Alexander Friedenstein y colaboradores el descubrimiento de las MSC.

Arnold Caplan en 1991 desarrolló una metodología que permitía cultivar y trasplantar células mesenquimales de humanos adultos y obtener la formación de hueso, su método consistía en obtener MO de aspirados de cresta ilíaca de donadores sanos y células de la epífisis femoral, se separaban con un gradiente de Percoll, y se cultivaban, después de 3 días las células no adherentes eran removidas y las adheridas seguían proliferando *in vitro* (Caplan, 1991; Flores-Figueroa et al., 2006). Esta metodología permitió el avance en el estudio de las MSCs, permitiendo conocer sobre sus propiedades de plasticidad, y describiendo el proceso mesengénico el cual detalla la génesis de los tejidos mesodérmicos como lo muestra la FIGURA 2, donde las MSC se someten a eventos proliferativos, de diferenciación comprometida según su linaje celular y de maduración celular resultando en fenotipos definitivos como osteoblastos, condrocitos o mioblastos, que reparan los tejidos mesenquimales adultos (Caplan, 1994).

Inicialmente las implicaciones de estos descubrimientos fueron apreciadas solamente en hematología experimental, con relevancia científica en la biología y enfermedades relacionadas al tejido óseo. Las células troncales mesenquimales no hematopoyéticas fueron descritas con los trabajos de Dexter, Allen y cols. en 1978, bajo la noción de que las células madre hematopoyéticas (HSCs) son reguladas por su interacción física con el microambiente celular dentro de la MO, posteriormente Owen y Friedenstein revelarían un segundo tipo de células troncales presentes en el estroma de la MO, que serviría de soporte de la hematopoyesis (Bianco et al., 2009). El término de células troncales mesenquimales (MSC) fue propuesto como una alternativa para “estromal” o “osteogénicas”, el cual fue bien aceptado para referenciarse al modelo de células *ex vivo* diferentes a las ESCs y HSCs.

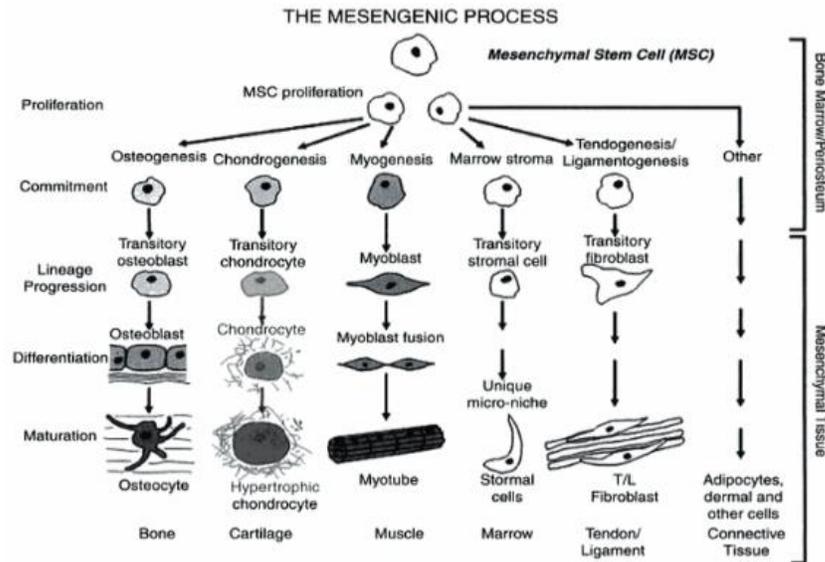


FIGURA 2. Proceso mesengénico. Representación jerárquica de las células progenitoras mesenquimales generando distintos linajes celulares que dan origen a los tejidos maduros mediante diversos procesos de proliferación, compromiso a un linaje celular, diferenciación y maduración celular. (Caplan, 1994).

El descubrimiento de las células troncales mesenquimales facilitó la investigación en células troncales debido a la facilidad de obtención, protocolos sencillos y situaron rápidamente a las HSCs como el referente preferente de comparación. Sin embargo, su principal limitación ha sido su bajo potencial de diferenciación debido a su origen, por lo que las ESCs siempre han sido buscadas por la comunidad científica, pero debido a las consideraciones bioéticas entorno al uso de embriones humanos se han desarrollado metodologías como la reprogramación de células somáticas por medio de la transfección con agentes virales de vectores específicos de pluripotencialidad. Dando origen así a las células troncales pluripotenciales inducidas (iPSCs), gracias a los trabajos del grupo Yamanaka (Takahashi et al., 2007).

En la actualidad la investigación con células troncales es muy variada, dependiendo la finalidad se prefiere emplear un modelo u otro, sin embargo hasta ahora lo más comercial para la terapia celular han sido las HSC, debido a su facilidad de obtención y buena respuesta al ser transferidas, aunque no se debe de subestimar el uso de las ESCs principalmente como modelos de investigación en biología del desarrollo, así como también las MSCs que han sido ampliamente utilizadas con fines clínicos, de investigación y pruebas farmacológicas.

B. Células troncales

Las células troncales (*Stem cells: SCs*) o igualmente conocidas como “células madre”, término popular más difundido erróneamente por medios de comunicación como sinónimos, a pesar de que la traducción del término en inglés “*stem*” significa tronco o progenitora más no madre, como bien lo menciona el Dr. Juan Ramón Lacadena, director de la Universidad Complutense de Madrid (Lacadena, 2003). Además de no existir registro del término “célula madre” en el diccionario de la Real Academia Española y aunque los esfuerzos que existen para adoptar un único lenguaje científico son grandes, aún existen sus ambigüedades como el uso indistinto de los términos: “células madre”, “células mágicas”, o inclusive “células pluripotenciales” como sinónimos de todas las SCs (Lopez Guerrero, 2004).

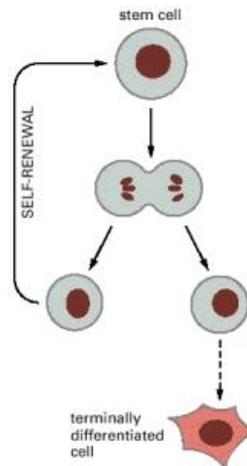


FIGURA 3. Definición gráfica de célula troncal (SC). Cada división de la SC produce una célula hija que mantiene su propiedad indiferenciada y otra que se diferencia a una estirpe celular determinada. (Alberts et al., 2002)

Este tipo particular de células se caracterizan por ser indiferenciadas, tener capacidad de autorrenovarse y, ante determinadas señales, aún poco conocidas, especializarse para realizar una función concreta. (Anzaldúa Arce et al., 2007). Las SCs constituyen la fuente para el desarrollo de los tejidos y órganos del feto y para el crecimiento y reparación del recién nacido y del adulto. Son células indiferenciadas (no especializadas), con propiedades únicas debidas a su capacidad de dividirse y multiplicarse manteniendo su estado indiferenciado (autoperpetuación) durante largos periodos de tiempo y que, bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, pueden dar lugar a células especializadas o diferenciadas (Alison, Poulosom, Forbes, & Wright, 2002), tal como lo simplifica la FIGURA

3, destacando que estas propiedades son propias de todas las células troncales independientemente de su origen. Estas células tienen roles muy importantes en una gran cantidad de tejidos, permitiendo la reparación y renovación tisular. La mayor parte del conocimiento sobre las células troncales se ha generado a partir de la investigación con modelos animales y el establecimiento de modelos de células troncales humanas (hSCs) permite generar conocimiento sobre su origen, implicaciones durante la embriogénesis, vías moleculares de desarrollo y nuevas posibilidades para su uso en diversas áreas de investigación, clínica e industria (Ribeiro et al., 2013).

C. Clasificación

La clasificación de las células troncales es variada, se pueden clasificar con base en origen, su nivel de especialización o plasticidad. La más común se fundamenta en la potencialidad que tienen para originar células de diferentes estirpes celulares tal como se aprecia en la FIGURA 4, lo cual está relacionado con su grado de diferenciación. Con base en lo anterior, existen células troncales totipotenciales, células troncales pluripotenciales, células troncales multipotenciales y células troncales de tejidos específicos (Anzaldúa Arce et al., 2007).

Células troncales totipotenciales se refiere a la capacidad funcional de una célula de dar lugar a un individuo complejo tras un proceso de desarrollo normal (Badran, 2016). Las células totipotentes de un embrión muy temprano tienen la capacidad de diferenciarse en membranas y tejidos extraembrionarios, en el embrión propiamente dicho y en todos los tejidos y órganos postembrionarios. En el embrión humano, parece ser que solamente son totipotentes los blastómeros hasta el estadio de mórula de 16 células (Shen & Qu, 2009).

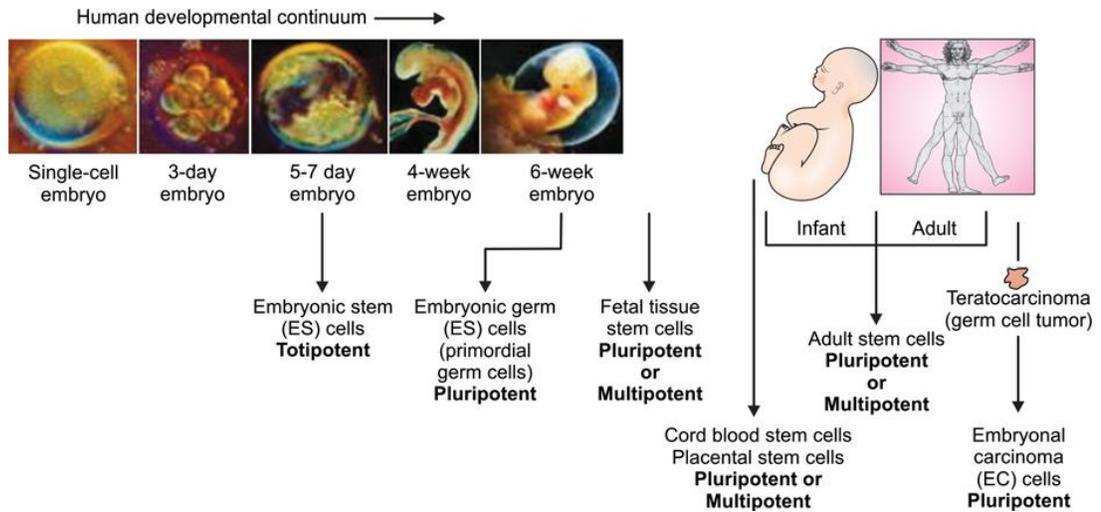


FIGURA 4. Clasificación de las células troncales humanas de acuerdo con su potencialidad y origen. Las SCs según la fuente de obtención tendrán diferente potencial de diferenciación por la pérdida de la plasticidad en función al grado de especialización y desarrollo humano, llegando hasta ser unipotentes depositadas en los órganos especializados. ES: Células troncales embrionarias; EC: Células embrionarias de carcinoma. (Thomson et al., 1998)

Las células pluripotenciales tienen la funcionalidad de dar lugar a varios linajes células o tejidos diferentes. Las células troncales embrionarias (ES) presentes en la masa celular interna del blastocisto humano son pluripotentes, pero no totipotentes, es decir, pueden originar todos los tejidos u órganos, pero no dar lugar al desarrollo completo de un embrión, porque no pueden producir las membranas y tejidos extraembrionarios necesarios para el proceso de gestación. Se pueden reconocer por su capacidad de división y renovación por varios periodos largos, capacidad de diferenciación limitada y reconocimiento de marcadores moleculares como Isozima de la fosfatasa alcalina, factor de transcripción Oct4 del dominio POU, elevada actividad telomerasa, y marcadores de superficie como: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, entre otros (Fong, Richards, Manasi, Biswas, & Bongso, 2007).

Las células multipotenciales tienen la capacidad de dar lugar a alguno, pero no todos, los linajes celulares; mientras que las células unipotenciales solo se pueden diferenciar a un solo tipo celular. Las células troncales también se pueden clasificar en dos grandes grupos: troncales embrionarias y troncales adultas (de origen somático) (Gepstein, 2002; Guerrero, 2004). Las células troncales adultas o somáticas están en cada tejido especializado, siendo escasas y difíciles de obtener, tienen un crecimiento lento y además no se replican indefinidamente en cultivo, por lo que su manipulación es difícil y rara vez se consiguen cantidades suficientes como para ser utilizadas en trasplantes con probabilidades de éxito (Young E. & Asa C, 2004). Por otra parte, su comportamiento es diferente según el tejido de origen, aunque tienen mayor potencial de diferenciación que las anteriores, se desconoce si pueden dar lugar a diferentes tipos de tejido por transdiferenciación o dediferenciación, por lo que la diferenciación dirigida no se controla bien. Estas células suelen presentar acortamiento de los telómeros (señal de envejecimiento) y si el paciente tiene una enfermedad genética o algún tipo de cáncer, evidentemente las células troncales extraídas del paciente pueden llevar la alteración genética, así como errores en el material genético acumulados por errores durante la replicación del ADN o al efecto de agentes medioambientales (Kørbling & Estrov, 2003). La FIGURA 5 muestra algunos ejemplos de células troncales clasificadas por su potencialidad e ilustra el aumento de la expresión de genes específicos del linaje celular conforme se pierde la potencialidad de las SC.

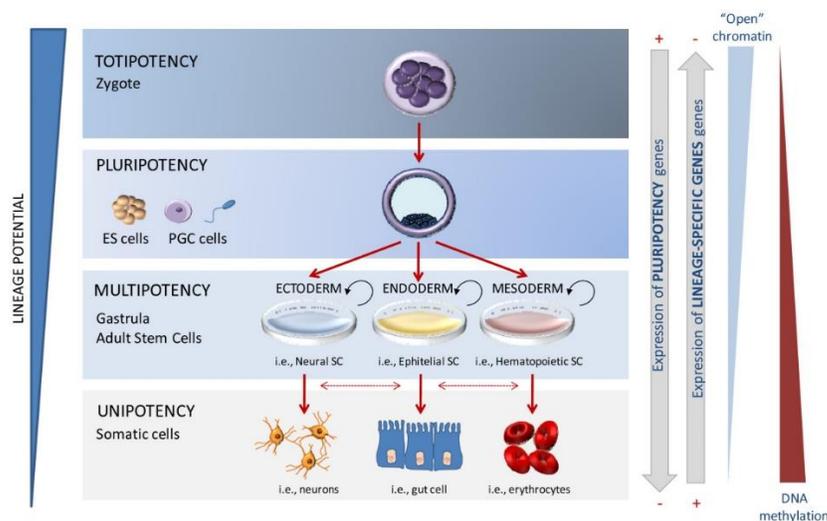


FIGURA 5. Potencia celular. Ejemplos de células troncales con base en su potencial de plasticidad. La expresión de genes pluripotenciales se restringe conforme el linaje celular se va especializando, favoreciendo la forma metilada del DNA y la expresión de genes específicos. (Berdasco & Esteller, 2011)

Las células troncales embrionarias son células pluripotentes que se pueden diferenciar en la mayoría de los tejidos del cuerpo humano, la principal limitación en el uso de estas células son las consideraciones bioéticas que suponen su uso debido a que son obtenidas de la masa celular interna del blastocito en etapas tempranas del embrión, resultado en su destrucción (Baldwin, 2009; Thomson et al., 1998). Otras limitaciones de su uso en la clínica son los riesgos de rechazo inmune y tumorigenesis. Las alternativas que existen para evadir la reacción inmune son las células troncales pluripotenciales inducidas humanas (hiPSc) las cuales transforman células somáticas del paciente, en células pluripotenciales transfiriendo genes pluripotenciales como OCT4, NANOG etc., sin embargo, se han reportado alteraciones genéticas durante la reprogramación celular, y se ha asociado la formación de teratomas en modelos animales (Laurent et al., 2011)

D. Fuentes de células troncales

Diversos tipos de células troncales han sido aisladas de una gran variedad de tejidos humanos incluyendo de embriones pre implantados, fetos, tejidos asociados a recién nacidos y órganos adultos. La clasificación de las células troncales de acuerdo al tejido de origen tiene fundamento en la evaluación de marcadores bioquímicos y genéticos dividiéndose en tres grandes rubros: células troncales embrionarias (ESC), células troncales mesenquimales (MSC) y células troncales hematopoyéticas (HSC) (Kim et al., 2013). Sin importar que se encuentren en tejidos con mayor grado de especialización estas células comparten las características esenciales que definen a las SC, como lo resume la Tabla 1.

Las células troncales hematopoyéticas tienen plasticidad limitada, al poder diferenciarse únicamente en linajes celulares sanguíneos y similares como leucocitos, eritrocitos y osteoblastos entre otros. Además, que el aislamiento es difícil al encontrarse las HSC en poca proporción en medula ósea y sangre de cordón umbilical (Rodríguez-Pardo, Fuentes-Lacouture, Aristizabal-Castellanos, & Hernandez, 2010).

La fuente de obtención de células troncales mesenquimales más común por muchos años han sido las células provenientes de medula ósea BM-MSCs, y aunque se han posicionado como el estándar de oro en la investigación con células troncales existen limitaciones en su uso debido a la poca cantidad de células aisladas del tejido medular, baja proliferación *in*

vitro y pérdida constante de sus propiedades troncales, así como la inducción de cambios cromosómicos y fácil contaminación durante el cultivo (Tsagias, Koliakos, Karagiannis, Eleftheriadou, & Koliakos, 2011). Otra alternativa han sido las células troncales derivadas de tejido adiposo, debido a que existen una mayor cantidad de MSC en estos tejidos, pero el procedimiento invasivo para su obtención es un factor que no beneficia la fácil colección de este tejido.

Tabla 1. Características que definen a las células troncales. Adaptado de (Anzaldúa Arce et al., 2007)

<i>Característica</i>	<i>Descripción</i>
<i>Auto-regeneración</i>	Las células son capaces de proliferar y producir células idénticas, regenerándose a sí mismas.
<i>Estado de indiferenciación</i>	Las células no están especializadas, siendo similares a las células provenientes de embriones tempranos.
<i>Pluripotencialidad</i>	Bajo condiciones específicas, pueden diferenciarse generando células comprometidas a diferentes rutas para posteriormente convertirse en células especializadas.
<i>Integración al embrión en desarrollo</i>	Pueden formar animales quiméricos al integrarse al embrión durante la fase de mórula o blastocito.
<i>Formación de teratomas</i>	Pueden producir tumores benignos (teratomas) cuando son inyectadas subcutáneamente o intraperitonealmente en ratones inmunosuprimidos.
<i>Potencial de proliferación en estado indiferenciado in vitro</i>	Bajo ciertos requerimientos, pueden dividirse y crecer en cultivos celulares generando células genéticamente estables no diferenciadas.
<i>Potencial de diferenciación in vitro</i>	Bajo ciertos estímulos por factores de diferenciación específicos o la remoción de citosinas en el cultivo celular pueden desencadenar en procesos de diferenciación celular a un linaje particular.

Las MSCs pueden ser obtenidas de tejidos extra embrionarios como lo son placenta, membrana fetal, cordón umbilical, sangre del cordón umbilical y líquido amniótico las cuales presentan características pluripotenciales similares a las MSCs de tejidos adultos, como se ilustra en la FIGURA 6. Debido al estrecho origen ontogenético que comparten con las ESCs, pero sin presentar muchos de los problemas inmunológicos de estas durante la práctica clínica (Marcus & Woodbury, 2008; Semenov et al., 2010). Las MSC asociadas a tejidos extraembrionarios poseen una amplia variedad de plasticidad y suelen proliferar más rápido que las MSCs de tejidos adultos (Pappa & Anagnou, 2009). Además de que pueden ser obtenidas sin generar problemas éticos, debido a que normalmente muchos de los tejidos extraembrionarios son desechados después del nacimiento.

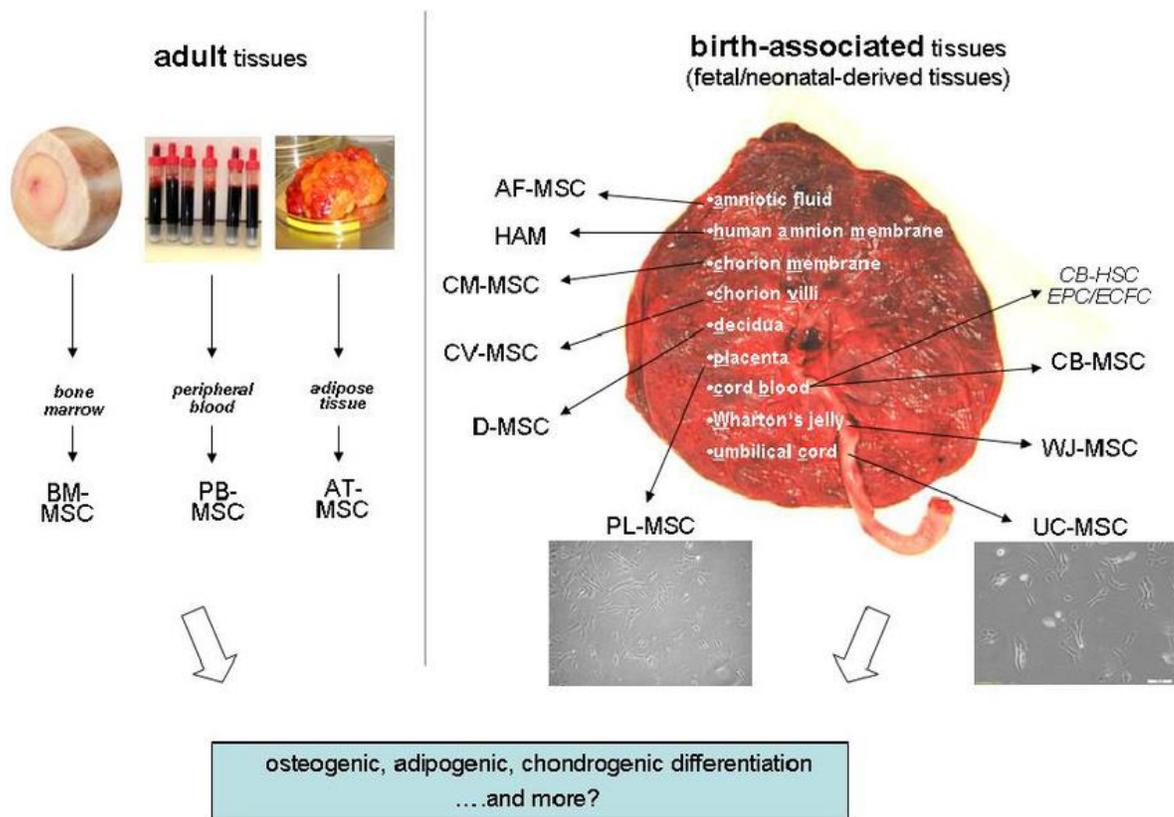


FIGURA 6. Principales fuentes de células troncales mesenquimales (MSC). Las fuentes pueden ser distinguidas entre tejidos adultos y tejidos asociados a recién nacidos. Las MSC provenientes de médula ósea (BM-MSC), sangre periférica (PB-MSC) y tejido adiposo (AT-MSC) destacan entre las fuentes de tejidos adultos. Los tejidos asociados a recién nacidos pueden ser fetales o de tejidos neonatales entre los que destacan líquido amniótico (AF-MSC), membrana amniótica (HAM), membrana coriónica (CM-MSC), cordón umbilical (UC-MSC), sangre del cordón umbilical (CB-MSC) y la gelatina de Wharton (WJ-MSC). (Hass et al., 2011)

E. El Cordón umbilical humano

Durante la gestación, el cordón umbilical establece el principal nexo entre el feto y la madre, comenzándose a formar desde la quinta semana del desarrollo embrionario producto del entrecruzamiento del anillo umbilical primitivo (línea de reflexión entre el amnios y el ectodermo embrionario), el pedículo de fijación (formado por mesodermo, membrana alantoidea, una vena y dos arterias umbilicales), el pedículo vitelino junto a sus vasos y el conducto de comunicación entre las cavidades celómicas intra y extraembrionaria. Estos tejidos se fusionan y debido al crecimiento gradual del embrión y el amnios, el saco vitelino y la membrana alantoidea se constriñen dando lugar al cordón umbilical primitivo el cual madura formándose como estructura embrionaria a la octava semana, a partir de la cual hasta la semana 36 de gestación experimentará un crecimiento de longitud y grosor (Kinare,

2008). Normalmente el cordón umbilical humano puede alcanzar longitudes entre 55 y 65cm, variando desde 20 a 120cm con un diámetro aproximado de 1 a 2 cm (Cunha Ferreira, Gallo Vallejo, Maria Ferlin, & Mauad Filho, 2010).

Citológicamente el cordón está constituido externamente por una capa de tejido epitelial amniótico, la cual conecta el revestimiento placentario con el feto. Bajo el epitelio se encuentra el tejido conjuntivo derivado del mesodermo extraembrionario, formado principalmente por una sustancia mixomatosa denominada gelatina de Wharton, el cual abundan componentes de la matriz extracelular tales como proteoglicanos y glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, condrotin sulfatos B y C, heparán sulfato y en menor cantidad decorina, biglicano y versicano), ácidos grasos libres insaturados, colesterol libre y esterios de colesterol. Todos los componentes embebidos en una matriz fibrilar de colágenos tipo I, II, III, IV, V, VI y VII, fibrilina y laminina (Danishefsky y Bella, 1966; Nanaev y cols., 1997; Gogiel y cols., 2003; Romanowicz y Bankowski, 2010). El colágeno tipo I es la principal sustancia proteica y el ácido hialurónico es el glicosaminoglicano más abundante (Gonzales, 2006).

Inmersas en el tejido en una proporción más baja que los componentes de la matriz extracelular se localizan las células de la gelatina de Wharton, de apariencia elongada y de distribución concéntrica a lo largo del cordón, junto a estas también se hallan en menor número algunos mastocitos dispersos por el tejido (Parry, 1970; McElreavey y cols., 1991). La gelatina de Wharton envuelve y protege a los vasos umbilicales, evitando que se produzcan compresiones, torsiones o plegamientos de estos. Los vasos sanguíneos del cordón umbilical humano son 3, dos arterias umbilicales que se comunican con el feto al nivel de las arterias ilíacas y transportan sangre desoxigenada y desechos fetales hasta la placenta, entrando en contacto con el sistema circulatorio materno. La vena umbilical, se origina en la placenta y atraviesa el cordón umbilical en su longitud y comunica con la vena cava inferior del feto mediante el ducto venoso (Takechi y cols., 1993), aportando sangre rica en oxígeno y nutrientes provenientes del sistema circulatorio materno.

F. Células troncales mesenquimales de cordón umbilical humano

La gelatina de Wharton es un tejido conectivo sumamente abundante en el cordón umbilical humano, anteriormente se conocía como el tejido matriz del cordón umbilical humano. La población celular predominante de este tejido son las células troncales mesenquimales tipo fibroblásticas multipotentes (Sabapathy, Sundaram, Vm, Mankuzhy, & Kumar, 2014). Anteriormente estas células eran conocidas como células troncales de la matriz del cordón umbilical (UCMSCs) distinguiéndolas solamente de las células aisladas del tejido endotelial de la vena (HUEVC), así como de las células troncales mesenquimales aisladas de la sangre del Cordón umbilical (UCB-MSCs). La función de las células de la gelatina de Wharton es la secreción de varias glicoproteínas, mucopolisacaridos, glicosaminoglucanos y proteínas de la matriz extracelular para formar la sustancia de fondo gelatinosa que previenen la estrangulación de los vasos sanguíneos del cordón umbilical humano durante la gestación (Joerger-Messerli et al., 2016).

Debido a la facilidad de obtención y variabilidad de fuentes las MSC se pueden aislar de múltiples tejidos, mediante un cultivo celular especializado que permita mantener a las células en un estadio indiferenciado pero que permita su replicación, la FIGURA 7 muestra la forma de identificar a las MSC una vez aisladas del tejido, donde incluye la evaluación de marcadores específicos, pruebas de pluripotencialidad, adherencia al plástico, y evaluación de la forma tipo fibroblástica (Nekanti et al., 2010; Sabapathy et al., 2014).

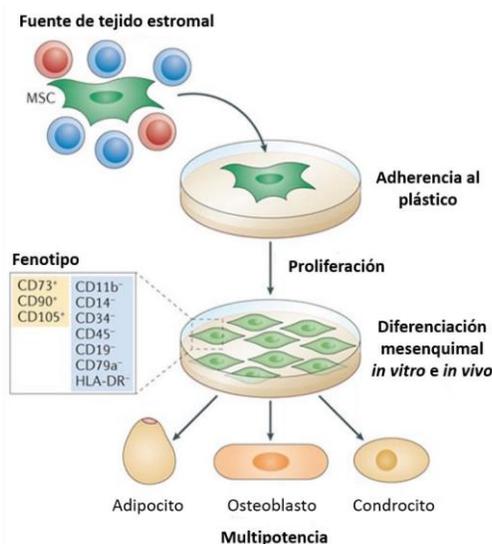


FIGURA 7. Caracterización de las MSC. En cultivo las MSC pueden ser aisladas de otros tipos celulares por su adherencia a las cajas plásticas, fenotipo y diferenciación *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos. (Aguilera C., 2015)

Actualmente no existe un protocolo universalmente aceptado para el aislamiento de las células de la gelatina de Wharton, pudiéndose obtener de por lo menos 6 diferentes sitios del cordón como la región intermaxilar, del sub-amion, así como de la zona perivascular, la zona intervascular y del sub-amion (Bongso & Fong, 2013). Algunos de los procedimientos de aislamiento se ilustran en la FIGURA 8, mencionando algunos métodos a continuación:

- i) cortando piezas de CU tubulares, se separan los vasos sanguíneos y rascan o exprimir el tejido gelatinoso con fórceps, donde se encontrarán las células troncales de la WJ (Seshareddy, K., Troyer, D., and Weiss, M., 2008).
- ii) Separación de la WJ sin la remoción de los vasos sanguíneos del cordón umbilical (Kikuchi-Taura, A., et al., 2012; Angelucci, S., et al. 2010).
- iii) Cultivar el CU completo con los vasos sanguíneos intactos, cortando explantes del CU en cultivo por un par de días, posteriormente las células que migran de los explantes son separadas y cultivadas como UC-MSC o MC-MSC (mezcla de cordón) (Bosch, J., et al., 2012).
- iv) Separando la región del sub-amion con una hoja de bisturí, cortando en piezas pequeñas como explantes de donde las células crecen, posteriormente se separan del resto de células sin la morfología propia de las WJCs y se cultivan aparte (Jeschke, M., et al., 2011).
- v) Se remueven los vasos sanguíneos del cordón umbilical, bloqueando ambos extremos del vaso sanguíneo, posteriormente son sumergidos en una solución enzimática para permitir que las células de la zona perivascular del CU puedan despegarse, una vez obtenidas se separan del tratamiento enzimático y son cultivadas para proliferarlas (Sarugaser, R., et al., 2005).
- vi) Cortando el CU abierto en segmentos, colocándolos de tal forma que la parte externa del CU quede en contacto con una solución enzimática que permite que solo las células de la membrana amniótica se despeguen y puedan ser cultivadas (Mihu, C., et al., 2009).

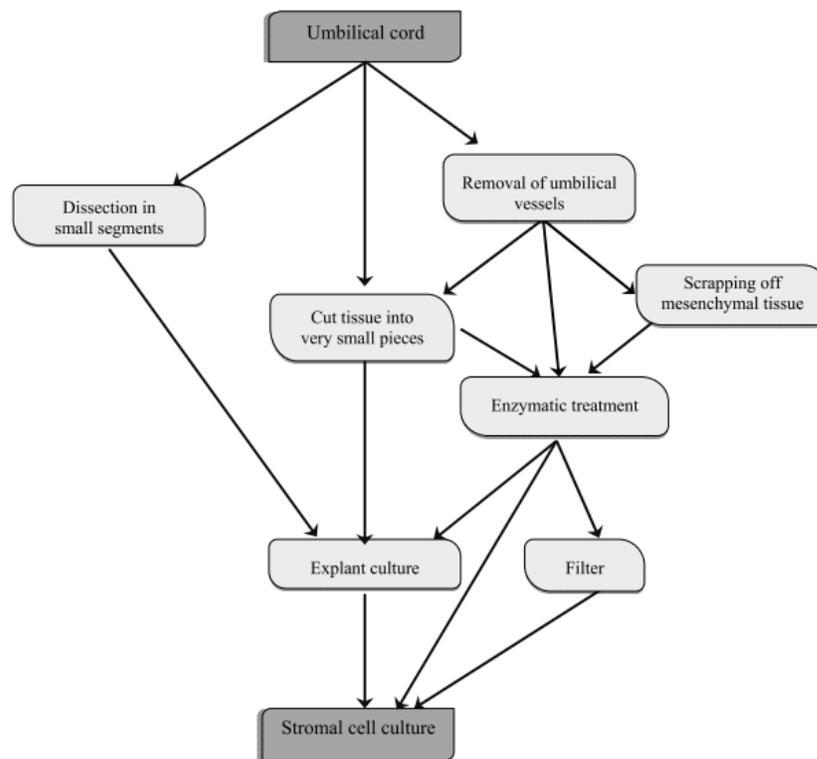


FIGURA 8. Tratamientos para el aislamiento de hWJMSCs. Representación esquemática de los diferentes enfoques empleados para el aislamiento de las células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton (hWJMSCs). (Batsali et al., 2013)

G. Diferenciación celular

Las células troncales son únicas debido a su propiedad de dividirse continuamente y regenerar nuevas células troncales para posteriormente especializarse. Este proceso de especiación celular es conocido como diferenciación celular y ocurren cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos en la célula como cambio en la forma, tamaño, actividad metabólica y activación y desactivación de genes, entre otras funciones celulares, que conllevan a promover características muy particulares a la célula especializada para poder efectuar procesos celulares específicos en su tejido correspondiente (Slack, 2013). Dependiendo del grado de especialización de las células diferenciadas pueden perder la capacidad de dividirse nuevamente, pero en general muchas mantienen la capacidad de continuar con la proliferación que es requerida para reemplazar las células en el tejido, ya sea por daños o muerte celular.

La proliferación celular es un balance cuidadoso entre la muerte celular y el constante mantenimiento del número de células de tejidos adultos y órganos. Las células de organismos adultos pueden ser agrupadas en tres categorías generales con base a su proliferación celular. Las primeras son aquellas células diferenciadas sin la capacidad de entrar en división celular, comúnmente estas células se producen durante el desarrollo embrionario, se diferencian en células especializadas y son retenidas en tejidos específicos por toda la vida del organismo. Ejemplo de estas son las células cardíacas musculares que por un infarto no pueden ser remplazadas nuevamente. En contraste, la mayoría de las células de animales adultos entran en el estado G_0 del ciclo celular, pero pueden continuar proliferando a medida que sea necesario remplazar células del tejido dañado (Liao & Zhao, 2015). Células de este tipo incluyen a los fibroblastos, células musculares, endoteliales de vasos sanguíneos, la mayoría de las células epiteliales de órganos internos como hígado, páncreas, riñón, pulmón y próstata. El último tipo de células diferenciadas generalmente tiene una corta vida media y deben ser remplazadas por una continua proliferación en tejidos adultos, se encuentran totalmente especializadas y no vuelven nunca a proliferar, ejemplos de estas incluyen a las células sanguíneas, células epiteliales de la piel y del epitelio gastrointestinal (Cooper, 2000). En estos tejidos el remplazo celular depende totalmente de la proliferación de células menos especializadas como las células troncales pluripotenciales o multipotenciales, que proveerán constantemente al tejido de células altamente especializadas para la renovación tisular y mantener su funcionalidad (Ulrich & Davidson Negraes, 2016). La diferenciación celular comienza durante el desarrollo embrionario humano desde el estadio de blastocisto (5-7 días después de la fertilización), con el desarrollo, la proporción de células troncales decrece en los distintos tejidos, disminuyendo también su habilidad para diferenciarse en diferentes tipos celulares.

En las MSC cultivadas *in vitro* se han apreciado sustancias químicas inductoras que propician la diferenciación de estas células tales como algunas quimiocinas, moléculas de adherencia, factores neurotróficos y otras sustancias químicas (Fu et al., 2006; Mikaeili Agah, Parivar, Nabiuni, Hashemi, & Soleimani, 2013; Zayed et al., 2016). La FIGURA 9 resume los principales genes involucrados en la diferenciación de las MSCs a sus respectivos linajes celulares como condrocitos, adipocitos, osteocitos y mioblastos.

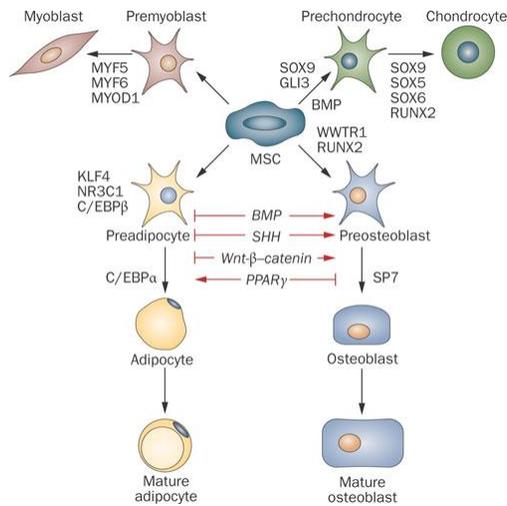


FIGURA 9. Genes reguladores de los procesos de diferenciación en las MSC. La expresión de diversos genes condrogénicos, adipogénicos, osteogénicos y miogénicos inducen en las MSC la diferenciación a precursores celulares encaminados a un linaje celular específico. (Takada, Kouzmenko, & Kato, 2009)

Así mismo, se ha estudiado el potencial de generar células tipo neurales propias del tejido del ectodermo, para lo cual se han observado diversos marcadores neurales como los que se resumen en la Tabla 2, para determinar la presencia de progenitores o estadios intermediarios al proceso neurogénico.

Tabla 2. Marcadores de células troncales de progenitores neurales durante desarrollo y diferenciación *in vitro*. Adaptado de (Martins, Roig-Lopez, & Gonzalez, 2016).

Objetivo	Marcadores (humano)	Referencia
Célula troncal neural célula progenitora neural	CD133+ (Prominin)	Uchida et al. 2000
	CD34- CD45-	
	Nestin GFAP	Tohyama et al. 1992
	Integrina subunidad α6 Integrina subunidad β1	Hall et al. 2006
	Pax-6 SOX-2 TRBR2 (EOMES)	Hansen et al. 2010
	Musashi-1	Dhara et al. 2008
Células progenitoras gliales	Nestin	Hansen et al. 2010
	CD133 radial glía	Pfenninger et al. 2007
Neuronas inmaduras	Tubulina βIII	Liu et al. 2010
	TYBR2 (EOMES)	Hansen et al. 2010
Neuronas maduras	Calbindin	Ericksson et al. 2010
	MAP2	Ancker et al. 2011
	Synaptophysin	Gingras et al. 2007

H. Criterios de la sociedad Internacional de terapia celular

Existen diversas entidades que buscan definir los criterios fenotípicos, bioquímicos, genéticos e inmunológicos de modelos celulares de MSC de la gelatina de Wharton, y debido a la gran cantidad de referencias que existen en la literatura para la caracterización de las hWJMSC, se decidió tomar como base los criterios cito-morfológicos, expresión de marcadores de membrana y la potencialidad de diferenciación específica de acuerdo a lo establecido por la *International Society for Cellullar Therapy* (ISCT).

La ISCT es una sociedad global de clínicos, reguladores, tecnólogos e industriales, que comparten la visión de traducir la terapia celular en terapias seguras y efectivas para la implementación en pacientes, en búsqueda de disminuir la variabilidad, entre los protocolos de aislamiento y expansión de las hMSC, encargaron al comité de células troncales mesenquimales y de tejidos adultos establecer los criterios estándar para definir a las células troncales mesenquimales humanas para investigaciones científicas basadas en estudios de laboratorio y estudios preclínicos (Horwitz et al., 2005). La primera característica que las define es su adherencia al plástico bajo condiciones estándar de cultivo *in vitro*, la mayor parte de la población debe de expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90, evaluado por citometría de flujo, adicionalmente debe de tener suprimida la expresión de CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-II, y como última característica las hMSC deben de poder diferenciarse en por lo menos osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de diferenciación *in vitro* y poder ser demostrado por tinciones específicas (Dominici et al., 2006), como lo resume la Tabla 3. Estos criterios mínimos constituyen las bases para la caracterización adicional de estas células permitiendo el avance más rápido en estudios preclínicos para su subsecuente desarrollo en terapias clínicas.

Tabla 3. Criterios de la ISCT para la identificación de células troncales mesenquimales. (Dominici et al., 2006).

1 Adherencia al plástico bajo condiciones estándar de cultivo celular.		
2 Fenotipo	Positivo ($\geq 95\%$)	Negativo ($\leq 2\%$)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 o CD11b
		CD79 α o CD19
		HLA-DR
3 Potencial de diferenciación <i>in vitro</i> : Osteoblastos, adipocitos, condroblastos (demostrado por tinciones específicas de los cultivos diferenciados)		

El propósito de este estudio es obtener una población enriquecida de hWJMSC mediante un protocolo de fácil aislamiento, seleccionando por FACS las células que expresen algunos marcadores de troncalidad y que no expresen marcadores hematopoyéticos ni endoteliales siguiendo los criterios establecidos por la ISCT. También comparamos diferentes protocolos de inducción de diferenciación neural y seleccionamos el más eficiente mediante el análisis de expresión de marcadores neurales por IF y RT-PCR.

Las células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton fueron aisladas de la matriz del cordón umbilical, seleccionando la zona perivascular, la cual fue disgregada mecánicamente y sembrada en diferentes medios de cultivo, evaluando el medio óptimo de proliferación. Una vez proliferadas las células se caracterizan por citometría de flujo con los marcadores de superficie CD13, CD31, CD34, CD45, CD73, CD90 y CD105 para establecer que proporción de células troncales se encuentran en la WJ. Se realizó la selección negativa de los marcadores CD31, CD34 y CD45 en las WJCs por FACS, obteniendo así un cultivo enriquecido con el fenotipo propio de las hWJMSC. Se evaluó el potencial adipogénico y se valoraron diferentes protocolos de diferenciación neural, estableciendo las condiciones óptimas de diferenciación neural para el modelo celular de las hWJMSC. Finalmente se determinó la expresión de los marcadores moleculares Nestina, SOX2, TUBBIII, NF-L, y TH a nivel de RNAm por RT-PCR y a nivel de proteína por IF para corroborar la diferenciación neural en el modelo de las hWJMSC.

El método de obtención de las WJCs a partir de la zona perivascular del CU, por la metodología de explantes resultó muy eficiente ya que a los 15 días de cultivo in vitro se obtenían grandes cantidades de células con la morfología fibroblástica, biespiculada y adherente al pastico característica de las WJCs. El medio CHANG demostró ser el medio óptimo para el aislamiento y proliferación, y la caracterización de las WJCs reveló que aproximadamente un 40% de las células presentaban el fenotipo establecido por la ISCT, al seleccionar negativamente aquellas que no expresaban CD31, CD34 y CD45 se obtuvo un enriquecimiento en la población de hWJMSCs. Estas células presentaron potencialidad adipogénica ya que al ser cultivadas con medio de diferenciación adipogénico lograron cambios morfológicos similares a adipocitos con depósitos intracitoplasmáticos que, al ser teñidos con rojo oleoso, se confirmaron como depósitos de lípidos. Al evaluar la diferenciación neural, se halló que una pre inducción con FGF por 3 días seguido de la

inducción neural con Forskolina 10uM producía una gran cantidad de células con morfología tipo neural, que expresaban a nivel de RNAm los marcadores de células progenitoras neurales como TUB β III y MAP2, además de la disminución de la expresión de Nestina y SOX2, sin embargo, no expresaban los marcadores de células tipo oligodendrocitos con OLIG2 ni de astrocitos con GFAP. A nivel de proteína también se comprobó la diferenciación neural ya que se halló la expresión de los marcadores TUB β III, MAP2 y TH, así como la disminución de la expresión de SOX2.

Siendo así que las hWJMSCs obtenidas de la región perivascular sin tratamiento enzimático para su aislamiento son una fuente excelente de células troncales mesenquimales ya que cumplieron con los criterios establecidos por la ISCT, además la forma de enriquecimiento mediante la selección negativa de las células con el fenotipo CD34-, CD31- y CD45-, permitió tener una población celular más homogénea y con mayor expresión de los marcadores de troncalidad CD103, CD90, CD73, CD44 y CD13. Aunque es necesario implementar más marcadores durante la separación celular y evaluar el mejor medio para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células. La evaluación de los diferentes medios de inducción neural permitió destacar al tratamiento con FGF por 3 días seguido de 14 días con forskolina 10 μ M, como el mejor medio de inducción neural debido a la transformación morfológica que presentaron las hWJMSC similares a células progenitoras neurales, corroborándolo con la expresión de los marcadores neurales y la disminución progresiva de la expresión de los marcadores de troncalidad.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Establecer las condiciones de aislamiento, caracterización y diferenciación neural de células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano (hWJMSCs) de recién nacidos.

B. Objetivos específicos

Estandarizar las condiciones óptimas de aislamiento, cultivo y proliferación *in vitro* de hWJMSCs, analizando su proliferación celular en los medios CHANG, DMEM y DMEM/F12 mediante curvas de proliferación celular para la determinación del tiempo de duplicación celular.

Determinar la caracterización de las hWJMSCs a partir del cultivo de las células de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano (hWJCs), mediante el análisis de marcadores de superficie de troncalidad (CD13, CD44, CD73, CD90 y CD105), y la ausencia o baja expresión de los marcadores endotelial (CD31) y hematopoyéticos (CD34 y CD45) por citometría de flujo.

Proponer una metodología de diferenciación neural *in vitro* de hWJMSCs, mediante el análisis del cambio en la morfología, expresión de genes de troncalidad y diferenciación neural por RT-PCR e Inmunofluorescencia indirecta.

III. METODOLOGIA

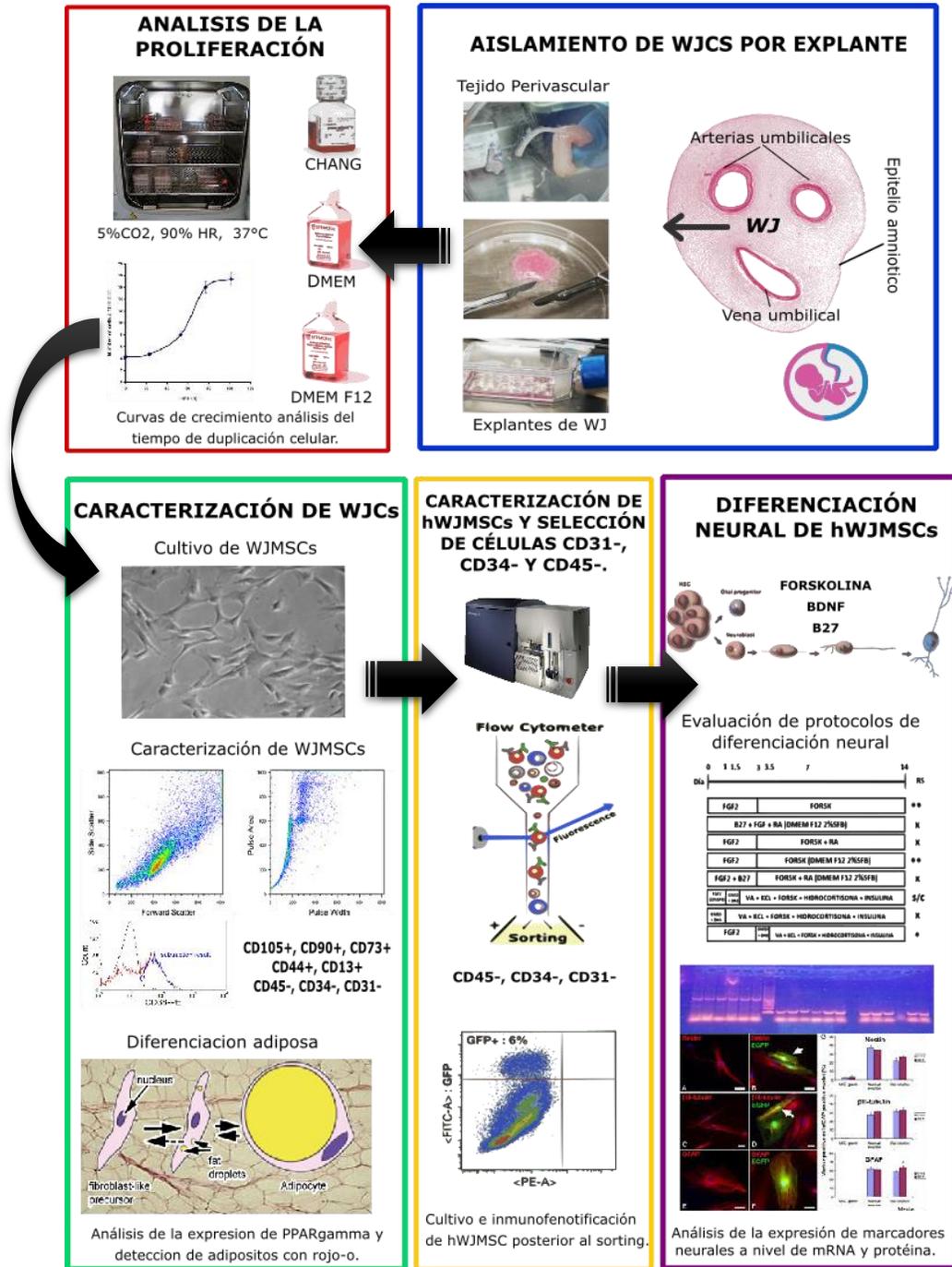


FIGURA 10. Resumen metodológico del proceso de aislamiento, proliferación, caracterización y diferenciación neural de las hWJMSCs. Las flechas indican el proceso que conduce a las MSC del cordón umbilical a establecerse como hWJMSCs por selección con FACS, para posteriormente determinar el mejor protocolo de inducción neural.

A. Aislamiento de células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano

Las muestras de cordón umbilical humano fueron obtenidas de pacientes gestantes sanas que acuden al INPer, y que bajo consentimiento informado permitieron la recolección del tejido durante la cesárea correspondiente, las muestras fueron proporcionadas por el departamento de genética y genómica humana, así como con el departamento de endocrinología del Instituto. El tejido fue recolectado en tubos cónicos de 50mL con solución Hanks para su procesamiento dentro de las 24 Hrs, después de la recolección.

Los cultivos primarios se realizaron de acuerdo con el protocolo de explante primario descrito inicialmente por Wharton, aunque se han propuesto modificaciones a dicho protocolo. El tejido fue lavado 3 veces con solución Hanks adicionada con 100 U/mL de penicilina, 100µg/mL de Estreptomicina y 250 µg/mL de Fungizona para evitar la contaminación de la muestra. De forma macroscópica se visualizan los 3 vasos sanguíneos del cordón umbilical y se generaban los explantes del tejido periférico a las dos arterias y la vena, dado a que reportes sugieren que esta zona es la más rica en células troncales mesenquimales. Se procedió a macerar el tejido con 500uL de medio CHANG hasta formar una sustancia gelatinosa, la cual se dispersó sobre la superficie de frascos de cultivo Falcon de cuello inclinado y tapa sellada, posteriormente se goteo meticulosamente de 1 a 1.5mL de medio CHANG y se incubaron en condiciones fisiológicas estándar (temperatura de 37°C, atmosfera al 5% CO₂ y humedad relativa de 95%).

Se cambió el medio de cultivo CHANG y se monitoreo la emersión de las colonias celulares primarias cada 3er día, a los 15 días se retiraron los explantes, el pase celular se realizó aproximadamente a los 20 días de su cultivo primario. Los pases celulares se realizaron al apreciar una confluencia próxima al 80-90%. Las colonias de células que crecen en monocapa adheridas al plástico se expandieron, despegando las células del plástico utilizando tripsina al 0.5% y sembrándolas en nuevos frascos de cultivo para los posteriores experimentos.

Se observaron las células en microscopio binocular invertido (Carl Zeiss Axiostar) en diferentes estadios de su migración y se controló su confluencia.

B. Análisis de la proliferación de células troncales mesenquimales aisladas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano

Una vez establecido el cultivo celular primario de hWJMSC, se estudiaron los patrones de proliferación mediante curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo celular. Se utilizaron células entre pase 2 y 3, se despegaron empleando tripsina al 0.5%, se centrifugaron a 1200RPM por 8min, se retiró el sobrenadante y fueron resuspendidas en DMEM 10% SFB, las células en suspensión fueron contadas en cámara de Neubauer empleando Azul de tripano en proporción (1:1) para evaluar la viabilidad celular. Las células fueron sembradas a una concentración de 2×10^4 células por mililitro, sembradas en placas de 12 pozos, con 1mL del medio celular correspondiente: CHANG, DMEM y DMEM F12. La proliferación celular fue evaluada a las 24, 48, 72, y 96 hrs. donde las células fueron despegadas y contadas como anteriormente se describió.

Con los datos de proliferación a los diferentes tiempos se construyeron curvas de proliferación celular y se determinaron los tiempos de duplicación celular, empleando la herramienta *doubling time computing*.¹

C. Caracterización de células troncales mesenquimales aisladas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano

Con base a los criterios establecidos por la ISCT y con previo conocimiento de los marcadores celulares que caracterizan a las hWJMSC, se realizó la caracterización de las células que fueron aisladas mediante explante. Se emplearon células entre el pase 1 o 2, sembradas a una concentración de 1×10^5 células/mL en 2 cajas Petri p60 en medio de cultivo CHANG, incubadas por 3 días a condiciones estándar, para obtener una cantidad aproximada de $1-2 \times 10^6$ células. Las células fueron inmunofenotipificadas por citometría de flujo utilizando los siguientes marcadores celulares previamente titulados y optimizados para su aplicación en este modelo, como se resume en la Tabla 4.

¹ Calculo del tiempo de duplicación celular (Roth, 2006).

Tabla 4. Especificaciones técnicas de los anticuerpos utilizados para la caracterización de las hWJMSCs por citometría de flujo.

Marcador de superficie ²	Fluoróforo	Isotipo	Dilución utilizada	Excitación de laser	Emisión máxima	Expresión en WJMSC ³
CD13 (APN)	APC/CY7	Mouse IgG1, κ	1uL/Test	Red Laser (633 nm)	785 nm	+
CD31 (PECAM-1)	APC	Mouse IgG1, κ	5uL/Test	Red Laser (633 nm)	660 nm	-
CD34 (Gp105-120)	PE/CY7	Mouse IgG1, κ	5uL/Test	Yellow-Green Laser (561 nm)	774 nm	-
CD44 (Hermes)	APC	Mouse IgG1, κ	1uL/Test	Red Laser (633 nm)	660 nm	+
CD45 (LCA)	PE/CY7	Mouse IgG1, κ	1uL/Test	Yellow-Green Laser (561 nm)	774 nm	-
CD73(Ecto-5'-nucleotidase)	FITC	Mouse IgG1, κ	5uL/Test	Blue Laser (488 nm)	525 nm	+
CD90 (Thy1)	PE/CY5	IgG1 ratón, κ	5uL/Test	Yellow-Green Laser (561 nm)	670 nm	+
CD105 (Endoglina)	PE	Mouse IgG1, κ	5uL/Test	Yellow-Green Laser (561 nm)	575 nm	+

APC: Alofocianina; CY7: Cianina 7; PE: Ficoeritrina; CY5: Cianina 5; FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

D. Protocolo de tinción de hWJCs para inmunofenotipificación por citometría de flujo

Los cultivos primarios de células de la gelatina de Wharton proliferados a una confluencia próxima del 80% al segundo pase celular, se utilizaron para caracterización. Las células fueron despegadas con 1.5mL de PBS/EDTA 10mM por 3.5min, se centrifugaron a 1200rpm por 8min, se decantaron y lavaron con PBS, se resuspendieron en PBS y se adicionó el volumen requerido de cada anticuerpo, la tinción se incubó por 15min a temperatura ambiente protegido de la luz, y se fijaron con 300µL de buffer incubándolas 10min, se añadió 1mL de PBS para lavar y se centrifugó a 1500rpm por 5 min para eliminar el exceso de

² Anticuerpos anti-human de distribuidora BioLegend.

³ Expresión de marcadores de membrana en hWJMSCs de acuerdo a (Dominici et al., 2006).

fijador, finalmente fueron resuspendidas en 100 μ L de PBS, para ser leídas en el citómetro de flujo. La inmunofenotipificación fue realizada en el departamento de Infectómica del INPer a cargo del Dr. Ismael Mancilla con el equipo BD FACSAria™ III (BD Bioscience Fisher). La autofluorescencia de las células se realizó pasando las hWJCs sin teñir, permitiendo establecer los límites de autofluorescencia para cada fluoróforo. Los análisis de las hWJCs previamente teñidas con los anticuerpos CD31, CD34, CD45, CD44, CD13, CD73, CD90 y CD105 fueron evaluados utilizando el software *Summit v4.3*, por marcajes sencillos y dobles, cuidando que no se interfirieran las señales de los fluoróforos, grabando 100,000 eventos por muestra para considerar una proporción representativa.

E. Selección de hWJMSC por FACS

De las células de la matriz del cordón umbilical humano se aislaron las células mesenquimales mediante tinciones dobles y selección negativa.

Se emplearon aproximadamente 2x10⁶ células las cuales fueron despegadas de la caja petri con 4mL de PBS/EDTA 10mM por 3.5 min., posteriormente fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 8 min., decantadas y resuspendidas en PBS adicionando el volumen del anticuerpo correspondiente a cada tubo.

- Autofluorescencia
- CD31, CD34, CD45
- Tubo de recolección de células (1mL de medio CHANG)

Las células fueron seleccionadas de forma negativa; es decir, que no expresen los marcadores CD31, CD34 ni CD45, el número de eventos realizados por el citómetro de flujo fue de 1x10⁴-1.5x10⁵ eventos, las células con el fenotipo de interés fueron recolectadas en medio Chang, centrifugadas y sembradas en frascos de cultivo a condiciones estándar, las células fueron proliferadas hasta alcanzar una confluencia cerca del 80% y caracterizadas con todo el set de anticuerpos de la siguiente manera.

- Auto fluorescencia
- CD34, CD13, CD44
- CD31, CD73, CD90, CD105, CD45

F. Selección de hWJMSCs utilizando kit de microperlas

Se probó una metodología alternativa para el enriquecimiento de una población de WJMSC CD31⁻ y CD34⁻ utilizando dos kits de microperlas: CD31 *MicroBead Kit (Miltenyi Biotec)* y *Human CD34 selection kit (EasySep)*. Se emplearon cultivos de WJMSC sin sorting entre pase 2 y 4 con una confluencia próxima al 80%, primero se realizó la selección negativa con el kit CD31, de acuerdo con lo descrito por el inserto, continuamente se realizó la selección de las células CD34⁻, con modificaciones en el protocolo para el correcto aislamiento. Las células fueron recolectadas en medio CHANG y sembradas en cajas petri p60, se dejaron proliferar lo necesario para poder caracterizarlas por citometría de flujo con los marcadores CD31, CD34, CD45, CD13, CD44, CD73, CD90, CD105.

G. Experimentos de diferenciación celular adiposa

Para corroborar que las células puedan diferenciarse en más de una estirpe celular, diferente del linaje mesénquimal. Se empleó el medio de diferenciación de células troncales mesenquimales a adipocitos (*Mesencult™ Adipogenic Differentiation Medium (Human)*, *Stem cell technologies*). El cual consta de medio basal de hMSC suplementado con 2 factores de diferenciación adipogénica. La preparación se realizó de acuerdo con lo establecido por el fabricante como lo especifica la Tabla 5. Se emplearon células previamente caracterizadas como hWJMSC entre el pase 3-5, y se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos a una confluencia de 1×10^5 cel/pozo, cuando alcanzaron una confluencia próxima al 90% se comenzó con la inducción mediante la adición del medio adipogénico. El cambio de medio se efectuó cada 3 días, durante 30 días. Las células fueron incubadas a 37°C, 5%CO₂.

Tabla 5. Ensayos de diferenciación adiposa comparando los diferentes procesos de enriquecimiento de hWJMSCs.

Protocolo de obtención de WJMSC	Ensayo	Pre inducción (β FGF 3 días en Mesencult basal)	Tratamientos	
			Mesencult basal	Mesencult adipogénico
Citometría de flujo	Ctrl neg	x	✓	x
	Dif 1	x	x	✓
	Dif 2	✓	x	✓
Perlas magnéticas	Ctrl neg	x	✓	x
	Dif 1	x	x	✓
	Dif 2	✓	x	✓

La diferenciación adipogénica se visualizó al teñir los depósitos vacuolares de lípidos característicos de los adipocitos mediante la tinción con rojo oleoso O (*Oil Red O solution*, *Sigma-aldrich*), visualizados en el microscopio invertido, de acuerdo con el inserto del fabricante. Además, se analizó la expresión de un marcador de diferenciación adiposa, el gen PPAR γ mediante RT-PCR.

H. Protocolos de diferenciación neural

Se evaluaron diferentes protocolos de diferenciación neural previamente reportados en la literatura, para determinar el protocolo más eficiente. Se utilizaron células hWJMSC previamente seleccionadas como CD34-, CD31-, CD45- por citometría de flujo, entre el pase 3 al 5. Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 12 pozos a una densidad de 2×10^4 cel/pozo en medio de cultivo CHANG a 37°C, 5%CO₂ y 95% de húmeda relativa.

Los protocolos empleados se diseñaron como se resume en las Tabla 6 y Tabla 7 de acuerdo a ensayos previos reportados, empleando protocolos combinados utilizando las siguientes sustancias: 10uM de Forskolina (Sigma-Aldrich), 1% de DMSO (Sigma-Aldrich), 10ng/mL de β FGF (Preprotech), 10ng/mL de BDNF (Preprotech), B-27 (Thermo Fisher Scientific), 20uM de Ácido retinoico. Cada factor fue preparado, alicuotado y almacenado de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Tabla 6. Factores neurotróficos y de crecimiento para diferenciación neural.

Ensayo	Pre inducción ⁴ (DMEM 2% SFB 3días)	Tratamientos (DMEM 1% SFB)		
		Forskolina ⁵	BDNF ⁶	B-27 ⁷
Control negativo	x	x	x	x
Control DMSO	x	DMSO 1%		
Diferenciación 1	x	✓	x	x
Diferenciación 2	✓ β FGF	✓	x	x
Diferenciación 3	✓ FGF	✓	✓	x
Diferenciación 4	✓ FGF + B27	✓	x	x
Diferenciación 5	✓ FGF + B27	✓	✓	x

⁴ Pre inducción con β FGF en DMEM 2%, propuesta con base al protocolo (Paldino et al., 2014b)

⁵ Modificado del protocolo de (Lim et al., 2008)

⁶ Modificado del protocolo de (Brewer, Torricelli, Evege, & Price, 1993).

⁷ Modificado del protocolo de (Faghihi et al., 2015)

Diferenciación 6	✓ FGF + B27	x	✓	x
Diferenciación 7	x FGF	x	✓	x
Diferenciación 8	x FGF	x	✓	✓
Diferenciación 9	x FGF	✓	✓	x
Diferenciación 10	x FGF	✓	✓	✓

Tabla 7. Factores químicos en diferenciación neural.

<i>Ensayo</i>	<i>Pre inducción</i> (DMEM 2% SFB 3días)	<i>Tratamientos (DMEM 1% SFB)</i>		
		Forskolina	B-27	RA
Control negativo	x	x	x	x
Control DMSO	x	DMSO 1% cada 3er día.		
Diferenciación 1	✓ FGF	✓	x	x
Diferenciación 2	✓ FGF	✓	x	✓
Diferenciación 3	✓ FGF en DMEM F12	✓	x	x
Diferenciación 4	✓ FGF en DMEM F12	✓	x	✓
Diferenciación 5 ⁸	✓ FGF en DMEM F12	x	✓	✓
Diferenciación 6(Kolf, Cho, & Tuan, 2007)	1 día con FGF en DMEM 20% SFB; 5horas con 200uM BHA, 2%DMSO en DMEM 2% SFB; 11 días con: 25mM KCl, 2mM ácido valproico, 10uM Forskolina, 1mM Hidroxicortisona, 5ug/mL Insulina.			
Diferenciación 7	5horas con 200uM BHA, 2%DMSO en DMEM 2% SFB; 11 días con: 25mM KCl, 2mM ácido valproico, 10uM Forskolina, 1mM Hidroxicortisona, 5ug/mL Insulina.			
Diferenciación 8	✓ FGF	5horas con 200uM BHA, 2%DMSO en DMEM 2% SFB; 11 días con: 25mM KCl, 2mM ácido valproico, 10uM Forskolina, 1mM Hidroxicortisona, 5ug/mL Insulina.		

Se seleccionaron los protocolos que de acuerdo con la literatura mostraban una morfología tipo neural, de los cuales se realizó un conteo de células diferenciadas por protocolo y se tiñeron para ser analizadas por inmunofluorescencia.

⁸ Modificado del protocolo de (Woodbury et al., 2000).

I. Evaluación de diferenciación neural por epifluorescencia indirecta

Se evaluó la diferenciación neural a nivel de la expresión de proteína mediante Inmunofluorescencia indirecta, empleando las células diferenciadas del cultivo con el tratamiento de FGF 3 días y Forskolina 14 días sembradas sobre cubreobjetos de vidrio tratados, los cubres fueron fijados con paraformaldehído por 15 minutos, permeabilizados con Triton X-100 por 20 minutos, y bloqueados con solución de BSA al 2%, realizando lavados con PBS entre cada procedimiento. El anticuerpo primario fue adicionado de acuerdo con la dilución de la Tabla 8 y fue incubado toda la noche.

Tabla 8. Lista de anticuerpos empleados para inmunofluorescencias indirectas.

Anticuerpo primario ⁹	Isótipo	Dilución	Anticuerpo secundario ¹⁰	Dilución
Anti-beta III Tubulin (TUJ1)	Mouse IgG _{2a}	1:2000	Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488	1:200
Anti-NF-L	Mouse IgG1, κ	5µg/mL		
Anti-Nestin	Rabbit Polyclonal	1:200	Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	1: 150
Anti- SOX2	Rabbit Polyclonal IgG	1:150		
Anti-MAP2	Rabbit Polyclonal	1:1000		
Anti-TH	Rabbit	1:300		

Posterior a los de lavados con PBS, se adicionó el anticuerpo secundario correspondiente anti-mouse IgG-Alexa 488 o anti-rabbit IgG-Alexa 594 y se incubaron 1 hora protegidos de la luz lavándolos con PBS. Finalmente, las preparaciones fueron montadas con Vectashield proporción (1:1) con DAPI y sellados con esmalte transparente. Las preparaciones fueron examinadas en el microscopio de fluorescencia Olympus Ix2-UCB acoplado a la cámara digital Orca-flash 2.8 Hamamatsu con el software de análisis *Image and visión computing*.

⁹ Distribuidores de Anticuerpos primarios Covance Biolegend: Anti-TUB, Anti-NES, Anti- SOX2, Anti-MAP2; Santa-Cruz Biotech: Anti-NF-L, Anti-TH.

¹⁰ Distribuidor de anticuerpos secundarios Thermo Fisher.

Así como el foto-microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axiostar, con software de análisis ISIS v.5.0. El procesamiento de las imágenes se realizó con el software imageJ.

J. Evaluación de diferenciación neural por expresión de genes

1) Extracción de RNA

Se plantearon 4 cultivos celulares para la obtención de células que fueron empleadas para la extracción de RNA, para esto se confrontó a diferentes tiempos el protocolo más eficaz que fue bFGF 3 días en medio DMEM al 2%SFB y después 14 días con Forskolina en DMEM 1%SFB.

Se aisló el RNA de 4 ensayos: 1) sin inducción (control), 2) preinducción (3 días bFGF), 3) Inducidas por 4 días (3días bFGF + 4 días con forskolina) y 4) Inducidas por 14 días (3 días bFGF + 14 días con forskolina) mediante la técnica de TRIzol Reagent (ThermoFisher), añadiendo 500µL por pozo, realizando lavados para lizar y homogenizar las células, el lisado fue separado en fases con 100µL de Cloroformo (Sigma) y centrifugándolo a 12,000rpm por 15min a 4°C, esta técnica permite la separación del DNA, RNA y proteínas gracias a la formación de un gradiente de concentración, donde el RNA se ubica en la fase acuosa incolora, se recolectó la fase acuosa y se prosiguió con el aislamiento del RNA utilizando 500µL de isopropanol (Sigma), centrifugándolo a 12,000rpm por 10min formando un pellet gelatinoso correspondiente al RNA. Posteriormente se lavó el RNA con etanol al 75%, se secó el pellet y se resuspendió en 30µL de agua.

Una vez hidratado el RNA se cuantificó en NanoDrop para estimar la concentración y pureza de RNA en la muestra.

2) Síntesis de cDNA

El DNA complementario de cadena sencilla (cDNA) fue sintetizado utilizando el kit *transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche)*, utilizando 2-6µg de RNA total. La reacción consiste en dos pasos en los cuales primero se realiza una desnaturalización del RNA con *los random hexamer primers* diluidos en agua, asegurando la desnaturalización de estructuras secundarias de RNA al calentarlo por 10min a 65°C en el Termociclador (*Master cycler gradient, Eppendorff*). El segundo paso es la síntesis con la enzima

transcriptasa reversa, el buffer de reacción, el protector del inhibidor de la RNAsa, la mezcla de deoxinucleotidos y la reacción anterior con el RNA desnaturalizado en frío. La reacción de síntesis se lleva a cabo a 25°C por 10min, seguido por 60min a 50°C, inactivando a la enzima transcriptasa a 85°C por 5 min.

3) Diseño de primers para RT-PCR

Los oligonucleótidos específicos humanos para RT-PCR fueron diseñados utilizando el software PrimerBlast, a partir de la búsqueda de la secuencia de mRNA del gen de interés en la base de datos de NCBI, se buscó que los primers reconocieran una parte de la secuencia donde se unan dos exones y se pidió que los primers estuvieran separados por lo menos un intrón correspondiente al DNA genómico, esto para asegurar la expresión a nivel de mRNA, así mismo se permitió la amplificación de la mayoría de las variantes de procesamiento alternativo de los mRNAs reportadas en la base de datos. Los primers se sintetizaron comercialmente por Integrated DNA Technologies.

Tabla 9. Set de primers diseñados para la identificación de genes de troncalidad y diferenciación neural.

Gen	RefSeq	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del producto (PB)
β-actin	NM_001101.3	F: TTGTAACCAACTGGGACGATATGG R: GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG	763
GAPDH	NM_002046.5	F: AAATCAAGTGGGGCGATGCT R: TGGTTCACACCCATGACGAA	160
TUB-βIII	NM_006086.3	F: GGGGCCTTTGGACATCTCTTC R: ACCACATCCAGGACCGAATC	125
MAP2	NM_002374.3	F: CCGAGGAAGCATTGATTGGG R: CCTGCAACTATTCAAGGAAGTGG	129
NESTIN	NM_006617.1	F: CGCACCTCAAGATGTCCCTC R: CAGCTTGGGGTCCTGAAAGC	128
SOX2	NM_003106.3	F: CGGAAAACCAAGACGCTCAT R: TGTGCGCGTAACTGTCCAT	148
OLIG2	NM_005806.3	F: CCCTAAAGGTGCGGATGCTT R: AGGGGAAGATAGTCGTCGCA	160
GFAP	NM_002055.4	F: AGGACCTGGCCACTGTGA R: TTCCCGAACCTCCTCCTCGT	194
PPARγ	NM_138712.3	F: TGCTTGTGAAGGATGCAAGGGTT R: GCCTGTGGCATTGCCCCAAA	186

Las secuencias fueron obtenidas de NCBI como lo resume la Tabla 9, utilizando las secuencias de RNAm completo y validado para cada molécula; igualmente los primers fueron diseñados para la amplificación de la mayor cantidad de variantes reportadas y con la inclusión de un intrón entre cada cebador para confirmar que no se amplifique la secuencia genómica. Los primers fueron analizados con Oligoanalyzer para la búsqueda de posibles interferencias homodiméricas y heterodiméricas.

K. Expresión relativa de genes de troncalidad y diferenciación neural por RT-PCR

Una vez sintetizado el cDNA, se amplificó el gen de interés utilizando los primers del gen correspondiente y los reactivos del kit HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen). Se utilizaron 2µL de la muestra de cDNA sintetizada de cada muestra, junto con la Taq DNA polimerasa, cloruro de magnesio, forward y reverse primers, agua grado PCR para efectuar la reacción en el termociclador, con una temperatura de desnaturalización de 95°C por 15 min, posteriormente 94°C por 30 segundos, seguido de la temperatura de alineamiento de 59°C por 30 segundos, y extendiéndose a una temperatura de 72°C por 30 segundos, repitiéndose de 23-32 ciclos, y finalizando con 72°C por 10 min para la extensión de los amplicones. Al finalizar se almacenaron a 4°C y se visualizaron en un gel de agarosa al 2% previamente teñidos con Gel Red (Biotium) y con el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Thermo Fisher). Las muestras fueron estandarizadas utilizando un gen housekeeping (Actina o GAPDH) como referencia, para normalizar la cantidad de cDNA necesario.

Los geles fueron observados en el fotodocumentador con filtro UV, y las fotografías exportadas en formato TIF, se analizaron con el software ImageJ, utilizando la opción de cuantificación de banda. La señal de los genes de interés se normalizo con respecto a la señal de la banda de Actina o GAPDH y se estimó el porcentaje de expresión respecto al control.

L. Extracción de DNA de gel de agarosa y secuenciación

Se comprobó que la amplificación del RNA mensajero de cada gen fuera específica para el gen de interés mediante la extracción del DNA de la banda del gel de agarosa utilizando el

Kit *Zymoclean gel DNA recovery* (Zymo research), siguiendo las instrucciones del fabricante hasta obtener el DNA en el buffer de elución donde se cuantificó y evaluó su pureza. Se diluyeron para tenerlos a una concentración de 15 ng/μL para realizar la reacción de secuenciación con el kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Thermo Fisher), se realizó la mezcla de reacción que contiene el buffer de secuencia 5X, el *BigDye terminator V3.1*, el DNA correspondiente a los genes y los primers de interés a una concentración de 10 μM. Se efectuó la reacción de secuenciación con el siguiente programa: 95°C 2 minutos, 96°C 10 segundos, 50°C 5 segundos, 60°C 4 minutos, repitiendo el ciclo 25 veces. Terminando a 4°C. La secuencia se purificó utilizando columnas *Centri-Sep™ Spin Columns* (Thermo Fisher) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, una vez purificados se desecaron en la consola CentriVap (Labconco). Las muestras fueron resuspendidas en formamida y leídas en el secuenciador automatizado. El análisis se efectuó utilizando el software *Sequencing analysis 5.3.1* y *Bioedit sequence alignment editor*. Con la secuencia FASTA resultante de la secuenciación de los genes, se realizó un nucleotideBlast utilizando la plataforma de NCBI, para identificar similitud e identidad a nivel de secuencia de nucleótidos.

IV. RESULTADOS

A. Aislamiento y cultivo celular *in vitro* de hWJMSC

Una vez colocados los explantes de tejido en las cajas Petri, comienza la adhesión del tejido a la superficie de la caja, los explantes que se logran adherir al fondo al cabo de 5 días aproximadamente comienzan a presentar irregularidades en la periferia del tejido donde posteriormente emergen células tipo fibroblásticas próximas al tejido como se muestra en la FIGURA 11, apartado A. De forma gradual, las colonias emergentes incrementan de tamaño mediante la interacción entre células propagándose por toda la superficie de la caja de cultivo, con las propiedades de crecer en monocapa, con morfología en su mayoría de tipo fibroblastoide, doblemente espiculadas, que en confluencia adquieren distribución radial; lo anterior ocurría indistintamente el medio de cultivo empleado. Sin embargo, era muy notorio que en el medio CHANG las células emergían entre los 5 a los 7 días, mientras que en los medios DMEM y DMEM F12 las células emergían hasta las 2 semanas y con una menor cantidad de colonias.

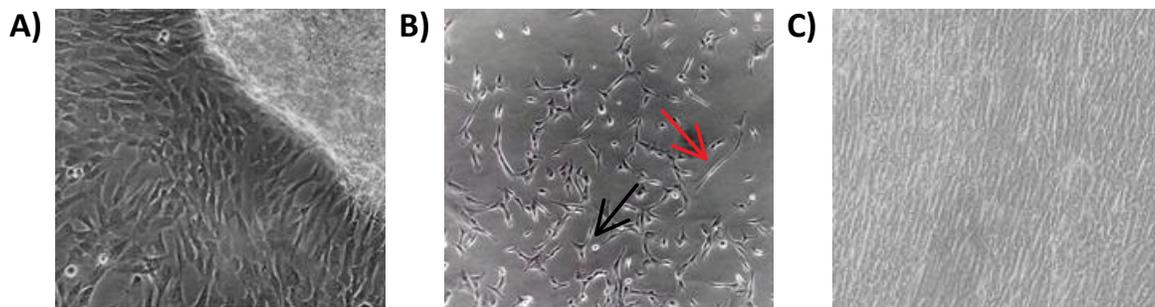


FIGURA 11. Morfología de células mesenquimales aisladas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano, cultivados en medio Chang suplementado con 1% Antibióticos y fungizona, incubadas a 37°C, 5%CO₂ y 95% de humedad relativa. A) Migración espontánea de hWJCs desde los explantes de la gelatina de Wharton al soporte de plástico del frasco de cultivo. B) Cultivo primario de hWJCs a 1 semana de que fueron retirados los explantes, se aprecian dos tipos de morfología, la flecha roja señala el tipo fibroblastoide bi-espiculadas y la flecha negra las células tipo romboides. C) hWJCs en una confluencia del 90%, se aprecia el crecimiento en monocapa, con organización tipo fibroblastoide.

Cabe destacar que los cultivos primarios de las hWJCs son heterogéneos morfológicamente, pero con alta prevalencia del tipo fibroblasto, aunque también se aprecia una proporción menor de células con características romboides y células redondas no adheridas al plástico, que conforme avanza el tiempo de proliferación se van disminuyendo

y no son observables frente a la abundancia de células con morfología fibroblástica bi-espiculadas (Figura 11, apartado B).

B. Curvas de proliferación para la estandarización del mejor medio de cultivo celular

Fueron evaluados 2 medios previamente reportados para el aislamiento de las hWJCs que son el DMEM 10% SFB y DMEM/F12 10% SFB; así mismo, se empleó medio CHANG debido a su particular uso en cultivos primarios de células de líquido amniótico y a pesar que no existen reportes previos en la literatura específicos para las MSCs, resultó ser el medio donde se adaptan más rápidamente al cultivo celular *in vitro* (FIGURA 12), presentando curvas de proliferación con tendencia exponencial a diferencia de los otros medios de cultivo.

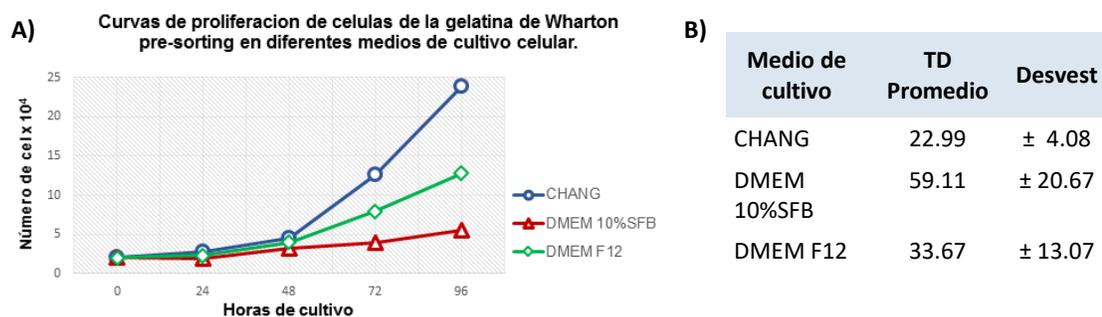


FIGURA 12. Proliferación de las hWJCs en cultivo *in vitro*. A. Curvas de proliferación de hWJCs en diferentes medios de cultivo celular, cuantificadas por exclusión con Azul de Tripán. En rojo se señala el medio de cultivo DMEM 10%, en verde el medio DMEM F12 y en Azul el medio CHANG. Se aprecian comportamiento exponencial en todos los medios de cultivo, pero con diferencia notoria a partir de las 72hrs, donde el medio CHANG destaca como el mejor medio de proliferación seguido por el DMEM F12 10% SFB, y con prácticamente nula proliferación en DMEM 10% SFB. B. Tabla comparativa de los tiempos duplicación celular de las hWJCs en diferentes tipos de cultivo celular.

Los medios DMEM y DMEM/F12 no permitieron a las hWJCs una óptima proliferación celular, además de que las células cultivadas en dichos medios mostraron un menor número de células viables para proliferación durante la exclusión con Azul de Tripán y en general los cultivos se hacían senescentes más rápido que en medio CHANG.

Los tiempos de duplicación celular nos hablan sobre el tiempo que tarda un cultivo celular en duplicar su número de células. Como se observa en la tabla comparativa el medio Chang resulta tener el menor TD, significando en promedio que cada 23 horas duplica su población celular. El medio DMEM/F12 tiene un aumento del 46% en el tiempo de duplicación celular,

mientras que el medio DMEM 10%SFB presenta un letargo del 160% comparados con el medio de cultivo Chang. La elección del medio Chang, permitió tener los cultivos en buenas condiciones, logrando 8 pases celulares antes de observar envejecimiento en el cultivo celular.

C. Caracterización de células de la matriz de cordón umbilical por citometría de flujo

La inmunofenotipificación por citometría de flujo del cultivo de hWJCs con marcadores de células troncales mesenquimales (CD13, CD44, CD73, CD90 y CD105), hematopoyéticos (CD34 y CD45) y endotelial (CD31), permitió esbozar el fenotipo de estas células. Durante el análisis al no ser una población celular bien caracterizada se definieron los parámetros de homogeneidad celular en tamaño y complejidad (imagen no mostrada). Al analizar las hWJCs del cultivo primario con cada marcador (FIGURA 13), comprobamos que se presentaba marcaje positivo para los marcadores asociados a células troncales mesenquimales según los criterios de la ISCT, destacando positividad para CD13, CD44, CD90 con promedios mayores al 90% de expresión y en menor medida, aunque dentro del margen positivo para los marcadores CD73 y CD105, con promedio de expresión mayores al 85%.

Así mismo se aprecia la expresión disminuida o nula del marcador endotelial (CD31), y del marcador hematopoyético (CD45), significando que más del 95% de la población de hWJCs no expresan ambos marcadores; sin embargo, existen dentro de la población dos poblaciones no bien identificadas que difieren en la expresión de los marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45).

Las tinciones múltiples permitieron la identificación de subpoblaciones dentro de las hWJCs que coexpresen marcadores particulares. Se efectuó un análisis para determinar qué población era más predominante, si las que expresaban los marcadores hematopoyéticos o las que no los expresaban, considerando una población heterogénea se identificaron 2 poblaciones distinguibles por la complejidad y la expresión de los marcadores hematopoyéticos (

FIGURA 14) donde la población CD34+, CD45+ representaba el 40.3%, y la población CD34-, CD45- era aproximadamente del 56.1%.

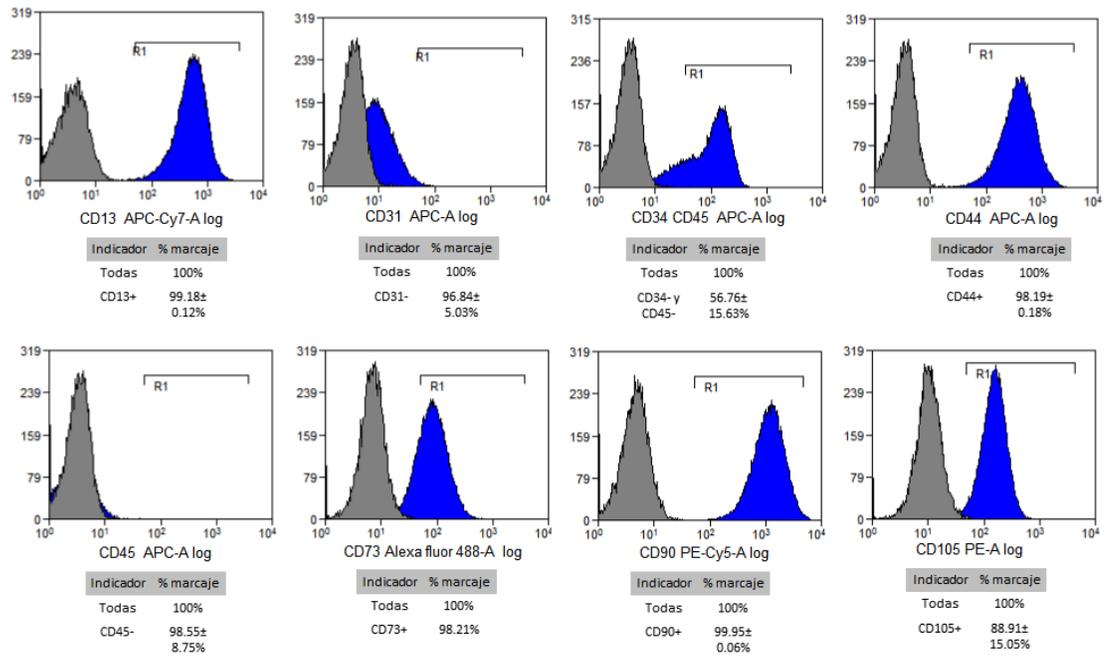


FIGURA 13. Caracterización con tinción sencilla de hWJCs por marcadores de superficie por Citometría de flujo. El histograma en gris muestra la Autofluorescencia de las células correspondiente al fluoróforo empleado, y en azul se destaca la emisión de fluorescencia del anticuerpo correspondiente, la región R1 de cada gráfico indica el margen propuesto para tomar como positivo el marcaje sencillo. Los gráficos indican un marcaje positivo en los marcadores CD13, CD44, CD90 y ligeramente menos intenso para CD73 y CD105. Así como un marcaje disminuido o nulo de CD31 y CD45. Y se aprecia una población dividida entre la expresión de los marcadores CD34 y CD45. Las tablas indican el promedio de expresión y desviación estándar del marcador correspondiente. n=3, número de eventos 100,000.

Al evaluarlos frente a los otros marcadores de troncalidad se observó que la subpoblación que no expresa los marcadores hematopoyéticos presenta una mayor intensidad media de fluorescencia (IMF) en los marcadores de troncalidad CD44, CD73, CD90 y CD105, excepto el marcador CD13 donde se apreció una mayor IMF en la población CD34⁺. Con lo anterior se determinó que el fenotipo más representativo de las hWJCs de cultivo primario es CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD73⁺, CD90⁺ y CD105⁺, concordando con los criterios reportados para las células troncales mesenquimales, a pesar de ser una población muy heterogénea con alta contaminación de células de origen hematopoyético.

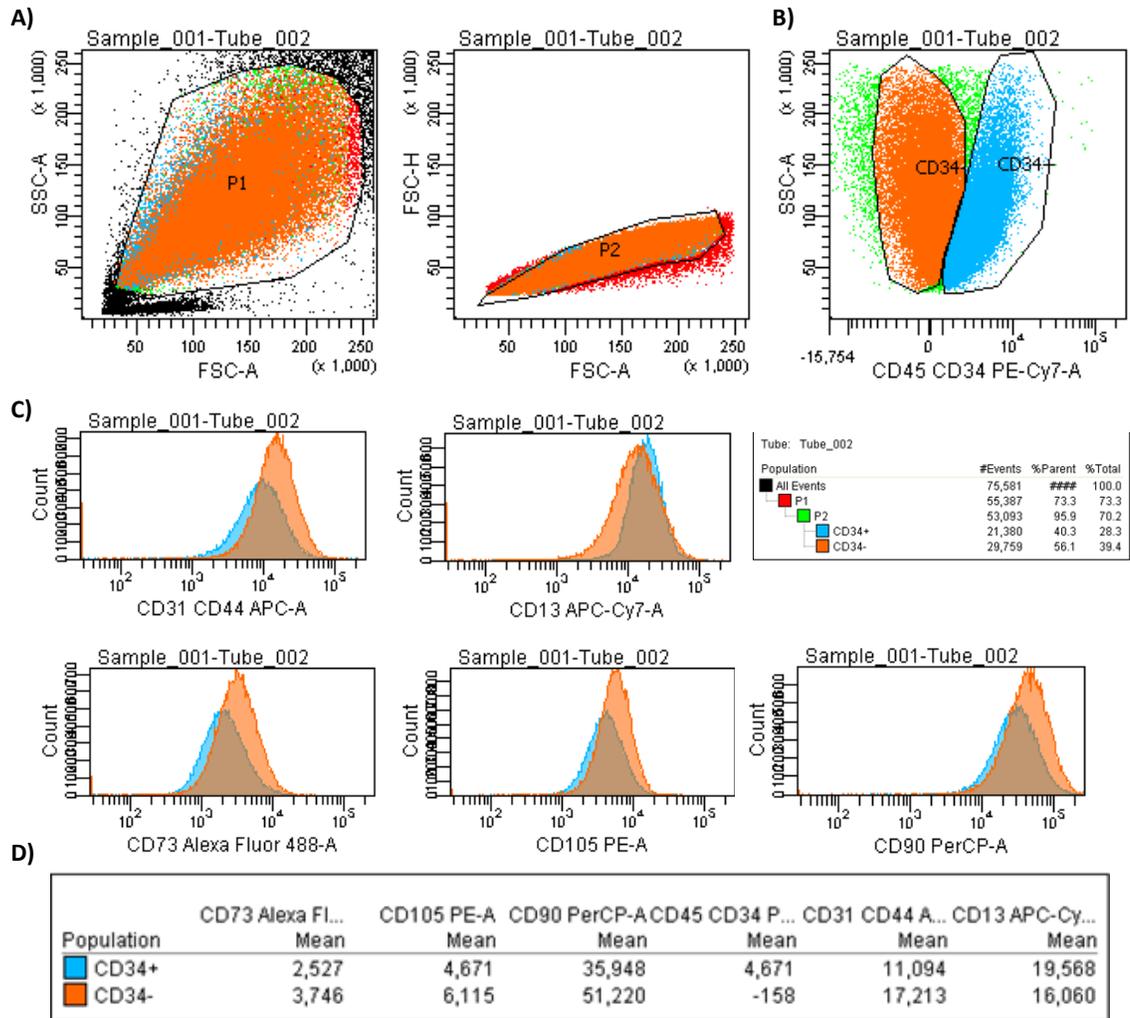


FIGURA 14. Caracterización de dos poblaciones identificadas en las células de la gelatina de Wharton. A. Selección de la población celular y homogeneidad de la población celular en tamaño y complejidad. B. Identificación por marcaje doble con CD34 y CD45 de la presencia de poblaciones celulares coexistentes CD34+ (56%) y CD34- (40%), tomado a partir de la región P2. C. Caracterización de las regiones marcadas como CD34+ y CD34-, con los marcadores positivos CD13, CD73, CD90 y CD105. D. Expresión positiva de marcadores de células troncales mesenquimales CD73, CD105, CD90 de la población CD34-, en comparación con la población CD34+.

D. Enriquecimiento de hWJMSCs por FACS

Al ser la población del cultivo primario de hWJCs muy heterogénea y poseer una subpoblación que coexpresa los marcadores hematopoyéticos, se planteó una selección negativa de las células que no expresan los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 ni el marcador endotelial CD31, ya que los marcadores de troncalidad son similarmente expresados en ambas poblaciones.

El equipo de citometría de flujo (FACS Aria III, BD Bioscience) permitió la separación y/o selección de las células que no expresan CD31, CD34 ni CD45, con una eficiencia mayor al 98% (FIGURA 15), las cuales representaban aproximadamente un 20% de la población original, a estas células seleccionadas se les dio el nombre de células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton (hWJMSCs) debido a que cumplen los criterios de expresión de marcadores de troncalidad así como la ausencia de los marcadores hematopoyéticos y endoteliales propuestos de la ISCT (FIGURA 16).

Las células de la gelatina de Wharton que fueron seleccionadas por la ausencia de CD31, CD34, y CD45, fueron sembradas y proliferadas a condiciones estándar, su caracterización mostro alta expresión de los marcadores de troncalidad CD13, CD44 y CD90, así como una ligera pérdida de expresión de CD73 y CD105; igualmente, los marcadores CD31 y CD45 no se expresaban en más del 73% de la población celular, diferente del marcador hematopoyético CD34, quien continuaba expresándose a pesar de la previa selección negativa (FIGURA 16), además de segmentarse en dos poblaciones, una que expresa débilmente el marcador y otra que lo expresa con mayor intensidad, situación similar a las células sin la selección negativa por FACS.

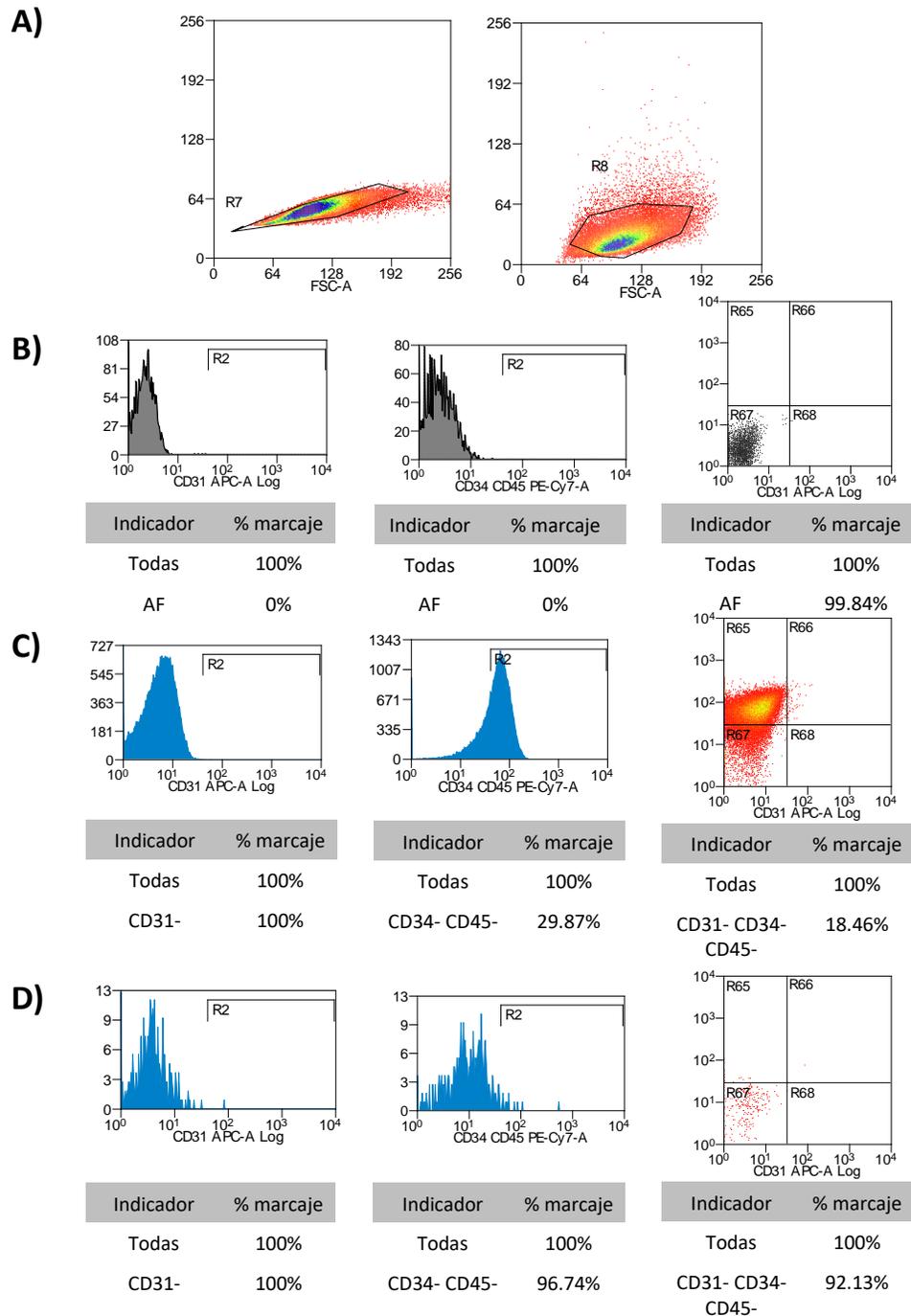


FIGURA 15. FACS para el enriquecimiento de WJMSc con fenotipo CD31-, CD34-, y CD45-. A. Selección de la población celular y homogeneidad de la población celular en tamaño y complejidad de 100,000 eventos. B. Autofluorescencias en marcaje sencillo y doble de los marcadores CD31, CD34 y CD45. C. Células de la gelatina de Wharton presorting con alta expresión de marcadores CD34 y CD45, aunque casi nula expresión de CD31, la población de interés que se selecciona es aproximadamente el 20%. D. Selección triple negativa por FACS, de hWJCs sin la expresión de CD31, CD34 ni CD45, estas células se cultivaron y fueron nombradas como población enriquecida o hWJMScs.

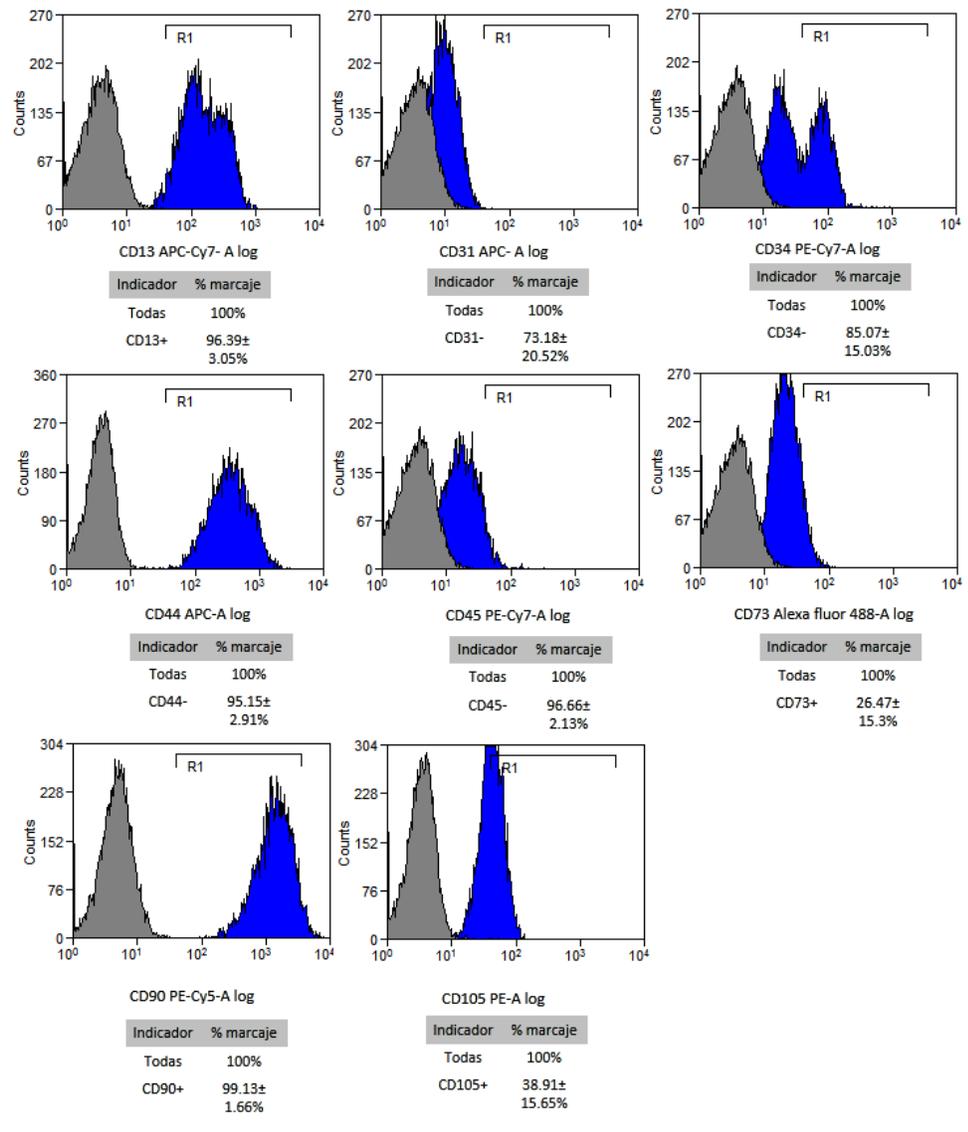


FIGURA 16. Caracterización de la población celular enriquecida con hWJMSCs, después de la selección negativa de CD31, CD34 y CD45. Las campanas en gris muestran la autofluorescencia de las células con respecto a cada fluoróforo. En azul se aprecia la señal de fluorescencia para cada marcador de superficie, la región R1, es el límite que define el marcaje positivo para cada marcaje. Las células de la gelatina de Wharton previamente seleccionadas como CD31-, CD34- y CD45-, expresan fuertemente los marcadores CD13, CD44 y CD90, con menor intensidad se expresan los marcadores CD73 y CD105. También se destaca la poca expresión de los marcadores CD31 y CD45, sin embargo, la expresión del marcador hematopoyético CD34, se encuentra dividida entre unas que lo expresan débilmente y otras que lo expresan fuertemente.

Las hWJMSCs en cultivo se aprecian morfológicamente más homogéneas, con forma bi-espiculada con la distribución tipo fibroblástica, al evaluar la proliferación de las hWJMSCs en los diferentes medios de cultivo se observó una proliferación mayor en el medio CHANG (FIGURA 17), comparado con los medios DMEM y DMEM F12, siendo los tiempos de duplicación de 23.5, 48.9 y 30.05 hrs en los medios de cultivo Chang, DMEM y DMEM/F12 respectivamente.

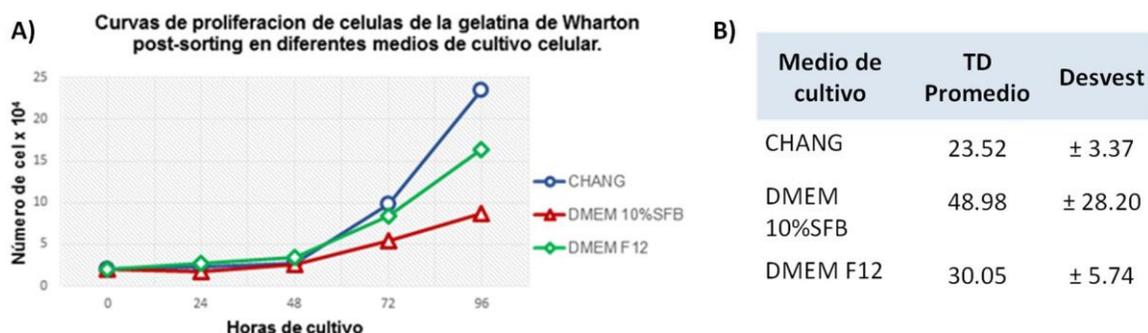


FIGURA 17. Proliferación de las hWJMSCs post sorting, con población enriquecida CD31-, CD34- y CD45- A. Curvas de proliferación de hWJMSCs en diferentes medios de cultivo celular. En verde se señala el medio de cultivo DMEM F12 con una tendencia exponencial pero no tan buena como el medio Chang señalado en azul, el medio DMEM 10%SFB es el medio con menor tasa de duplicación celular. B. Tabla comparativa de los tiempos de duplicación celular de las hWJMSCs. Se aprecia que el medio Chang continúa siendo el medio con menor tiempo de duplicación y por lo tanto mayor tasa de duplicación para las hWJMSCs, el medio DMEM F12 presenta un retardo del 27% con respecto al Chang, mientras que el DMEM 10%SFB duplica el TD respecto al medio Chang.

E. Diferenciación adiposa de hWJMSCs

Los ensayos de diferenciación adipogénica resultaron morfológicamente visibles a partir de los 20 días con inducción del *Mesencult Adipogenic Medium*, donde la organización radial de las células (FIGURA 18) se vio alterada, las células se comenzaron a agrandar y se formaron vacuolas diminutas que conforme aumentaban los días de inducción se agrupaban hasta formar vacuolas de gran tamaño de aspecto oleoso como se observa en la Figura 18B, la tinción con rojo oleoso permitió identificar estas vacuolas intracelulares como depósitos de lípidos, característicos de los adipocitos primarios (Figura 18C).

Mediante RT-PCR semicuantitativo se evaluó la expresión del factor de transcripción PPAR γ , una molécula ampliamente usada como marcador de diferenciación adiposa. El resultado muestra un claro aumento en la expresión de este gen en las células inducidas a diferenciación adiposa con respecto al control de las células no inducidas (Figura 18D). Se

realizó la cuantificación de la expresión relativa del gen PPAR γ , utilizando como referencia el gen β -Actina ya que se expresa constitutivamente en las células sin diferenciación y las células tratadas, evidenciando el aumento significativo de la expresión del marcador adiposo al término de la inducción adipogénica (Figura 18E).

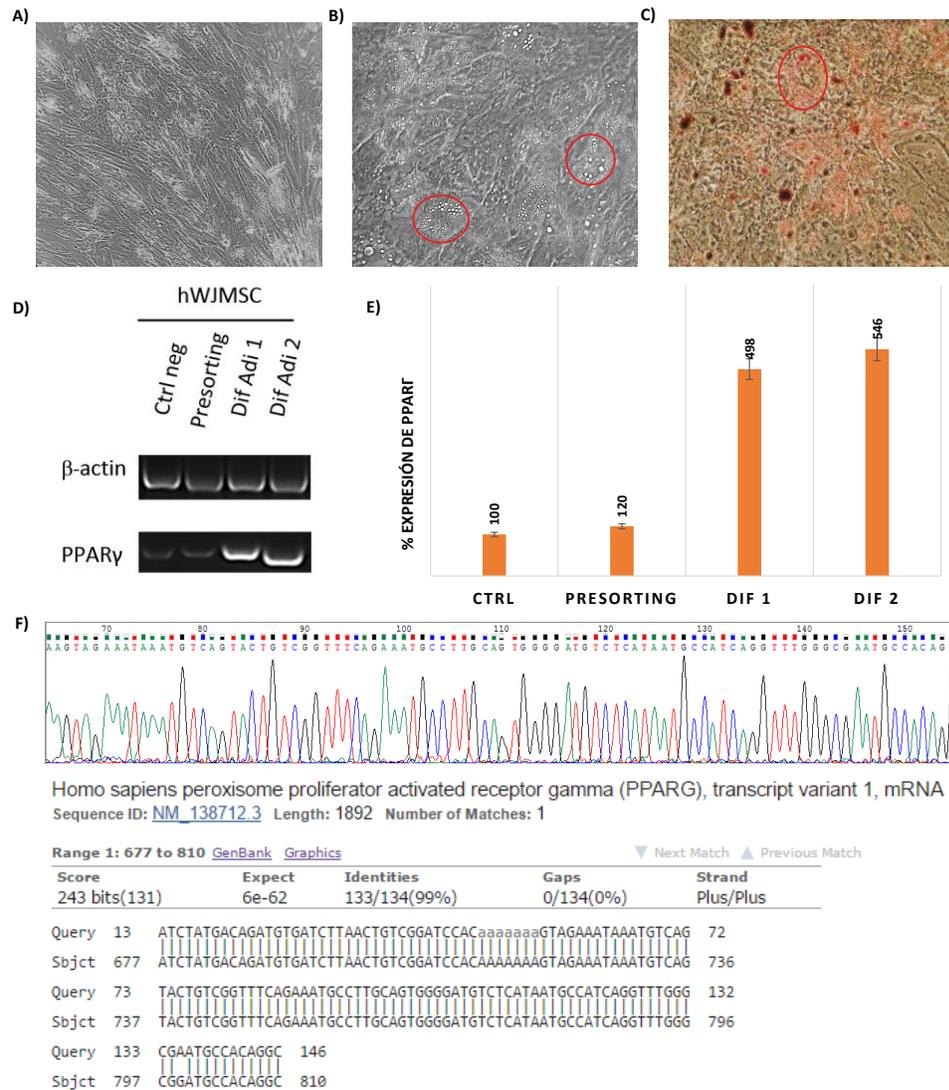


FIGURA 18. Resultados del ensayo de diferenciación adiposa de las WJMSC. A. Células en medio Mesencult basal, no se observa un cambio en la morfología de las células. B. WJMSC en medio de diferenciación adipogénico, se destacan en círculos rojos los depósitos de lípidos característicos de los adipocitos. C. Tinción con rojo oleoso del cultivo celular con diferenciación adiposa, se destaca en rojo los depósitos de lípidos teñidos de rojo. D. Aumento de la expresión de PPAR γ por RT-PCR semicuantitativo, como marcador de diferenciación adiposa en los cultivos tratados con medio de adipogénico. E. Gráfico del aumento de la expresión relativa de PPAR γ por RT-PCR semicuantitativo, los cultivos tratados muestran un evidente aumento de su expresión. E. Secuenciación de la banda correspondiente al gen PPAR γ , para asegurarse que se evidencia la expresión de dicho gen a nivel de mRNA. Nucleotide Blast con similitud para muchas variantes del gen PPAR γ .

La secuenciación de la banda correspondiente al gen de interés PPAR γ esclarece la identidad del gen, comprobado al efectuar un alineamiento con BLAST de la secuencia obtenida experimentalmente contra la secuencia del RNA mensajero del gen, asegurando así, que se esté efectuando un incremento a nivel de expresión (Figura 18F). Lo anterior mencionado conlleva a definir que las hWJMSCs, tienen la capacidad de diferenciación adipogénica, al poder diferenciarse en células tipo adiposas.

F. Diferenciación tipo neural de las hWJMSCs

Se realizaron experimentos preliminares para determinar el mejor medio de inducción neural, realizando variaciones del medio de cultivo en las hWJMSCs, exponiéndolas a diferentes compuestos químicos, para identificar aquel tratamiento que promueva la mejor inducción tipo neural basándonos en el cambio de morfología. De acuerdo con los protocolos evaluados, las diferencias fueron evidentes a diferentes tiempos, y con morfologías muy diversas. En la FIGURA 19 se aprecian etiquetados con un asterisco aquellos tratamientos donde se observa algún cambio en la morfología celular, el número de asteriscos es indicativo de más células transformadas por tratamiento.

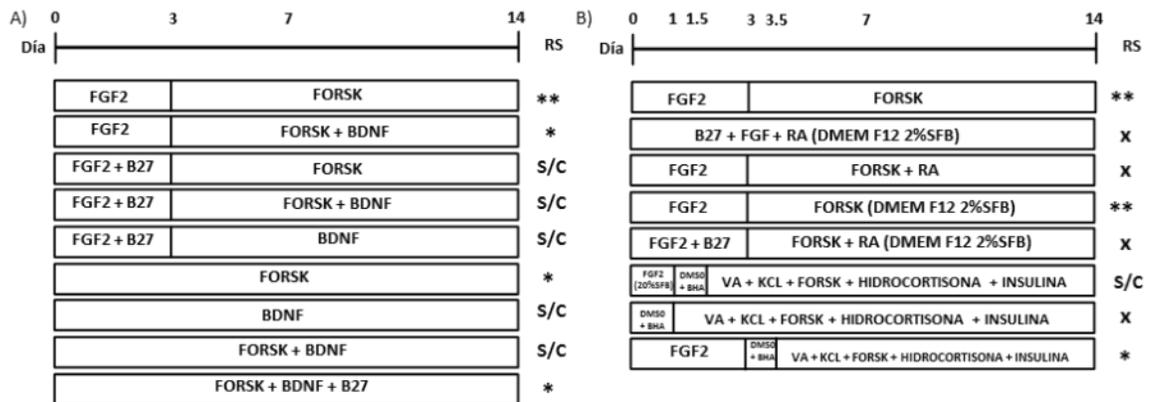


FIGURA 19. Resumen de los diferentes tratamientos de inducción de diferenciación neural ensayados en las hWJMSCs. A. Esquema de tratamientos con factores de diferenciación neural (BDNF, Forskolina, B27) con y sin pre inducción con β FGF, (**) la mayor evidencia de cambios morfológicos se observó aplicando un pretratamiento con β FGF por 3 días, seguido la adición de Forskolina hasta los 14 días. B. Esquema de tratamientos alternativos utilizando agentes químicos de proliferación neural. La X, significa cultivos celulares que murieron por el tratamiento, especialmente con RA. Se aprecia en general al tratamiento con Forskolina como el mejor inductor de células con morfología tipo neural.

Después de los 14 días de inducción con los diferentes tratamientos, las hWJMSCs tratadas con Forskolina mostraron cambios en estructura, tamaño y composición celular, como se aprecia en la FIGURA 20, perdiendo su forma plana fibroblástica a células con cuerpo celular redondeado y refractante bajo microscopia óptica además de características prolongaciones provenientes del cuerpo celular propias de las células tipo neurales (FIGURA 21). También perdieron la organización tipo radial al organizarse de forma más dispersa con escasa interacción intracelular, estos cambios fueron comparados con respecto al control que son las células no tratadas.

El tratamiento con FGF por 3 días fue elegido debido a que aumentó el número de células diferenciadas con morfología tipo neural, no se evidencio que los cambios morfológicos fueran reversibles, ni efectos citotóxicos a diferencia de los otros tratamientos de inducción, especialmente con el Ácido retinoico y el BHA.

Una vez seleccionado el protocolo de inducción más apropiado, se prosiguió a evaluar la diferenciación neural por marcadores moleculares indicativos de troncalidad como SOX2 y Nestina, y marcadores de precursores de células neurales como MAP2 y TUB- β III, realizando el seguimiento de la expresión del mRNA de dichos genes a diferentes días de inducción neural por RT-PCR y secuenciación de Sanger.

A nivel de expresión de mRNA, los marcadores de troncalidad y de diferenciación neural estaban presentes inclusive en los cultivos no tratados, cuestión que se mantuvo durante la pre-inducción con FGF por 3 días, después de la inducción con Forskolina, al 7mo día el marcador Nestina comenzó a disminuir, así como SOX2, la expresión de TUB- β III se mantenía y la de MAP2 aumentaba. Al finalizar el tiempo de la inducción neural (14 días) el marcaje de Nestina disminuyó notoriamente, igualmente se apreció el aumento en el tamaño de banda y grosor correspondiente a un aumento en la expresión de MAP2 (

FIGURA 22).

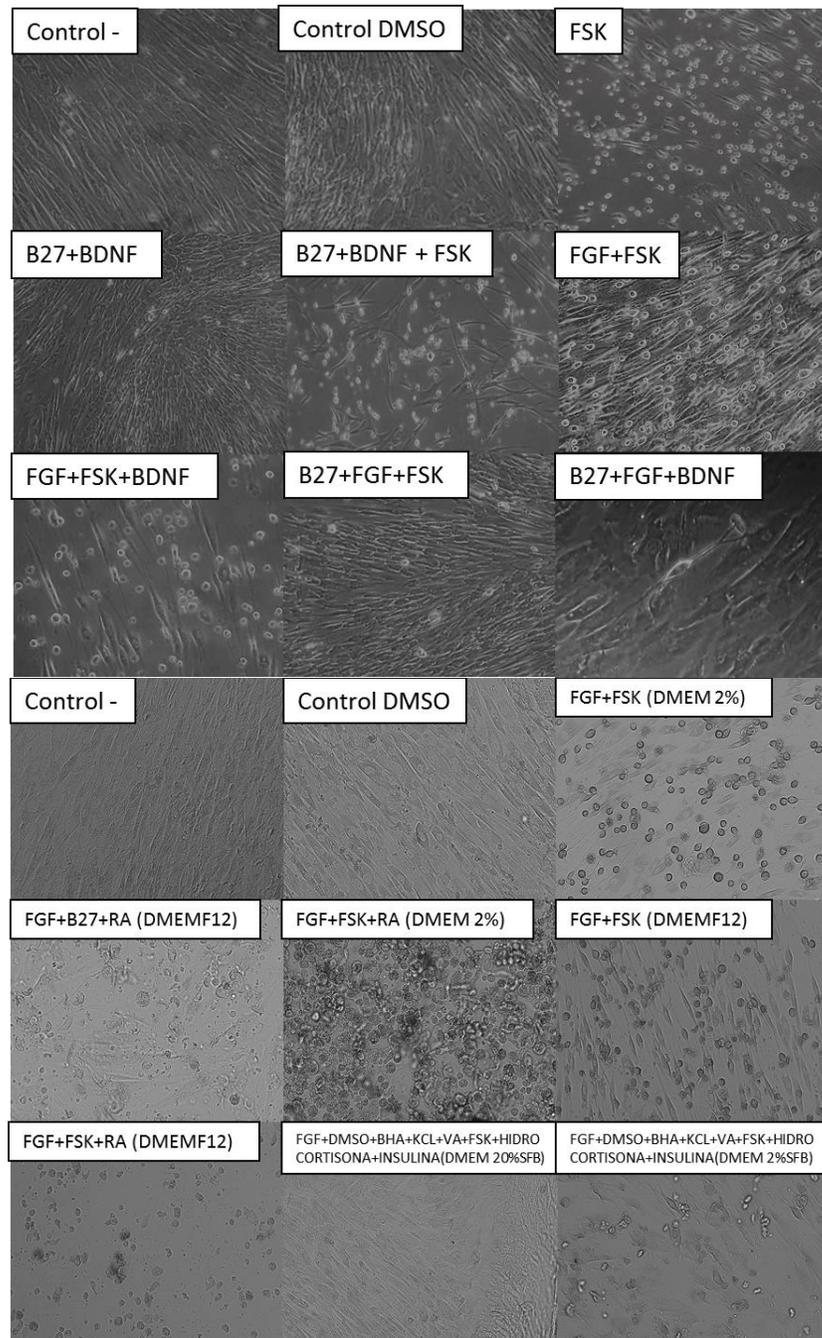


FIGURA 20. Resumen de los cambios en la morfología celular de las hWJMSCs de acuerdo con los protocolos de inducción neural, por microscopía óptica. Se destacan los cambios producidos por los tratamientos con Forskolina donde aparecen células con cuerpo celular redondeado, sin organización tipo fibroblástica y con prolongaciones que salen del cuerpo celular y se ramifican, similares a células tipo neurales. Los protocolos con pretratamiento con bFGF y Forskolina mostraron una mayor cantidad de células con la morfología tipo neural a comparación con el tratamiento sencillo con Forskolina.

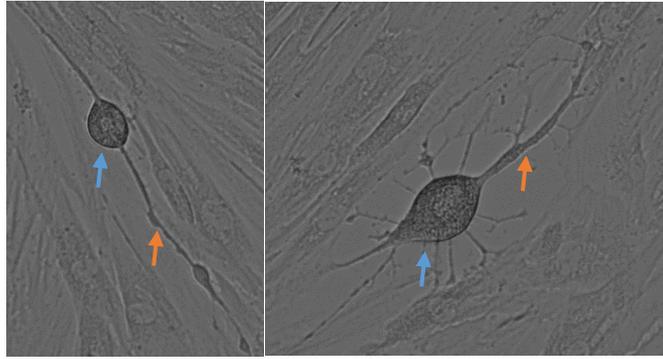


FIGURA 21. Microscopia óptica de hWJMSCs mostrando la morfología tipo neural después de 14 días con el tratamiento de inducción neural (FGF2 3d, Forskolina 11d). Se destaca en azul la reducción del cuerpo celular, con forma tipo bulbar que refracta la luz, y en naranja las prolongaciones intracitoplasmáticas delgadas que se ramifican en las extremidades.

Al realizar la cuantificación relativa de cada gen con respecto a β -Actina se observó una tendencia donde los marcadores de troncalidad disminuían mientras que el marcador MAP2 aumentaba, como se muestra en la FIGURA 22B. Además, se evaluó la expresión a nivel de RNAm del gen OLIG2 y GFAP que son marcadores de oligodendrocitos y astrocitos, pero no se presentaron en las hWJMSCs diferenciadas (datos no mostrados). La secuenciación permitió corroborar que se evaluó a nivel de expresión genética dichos marcadores al empatar la secuencia experimental con la secuencia del RNAm correspondiente por BLAST (

FIGURA 22, apartado C).

Asimismo, se realizó la evaluación de la expresión de marcadores celulares específicos a las células troncales y a las células tipo neurales, empleando Inmunofluorescencia por marcaje indirecto.

Las hWJMSCs sin tratamiento de inducción neural mostraron fuertemente la expresión de los marcadores de troncalidad SOX2 y Nestina (FIGURA 23), sin embargo, la expresión de TUB β III fue controversial, al coexistir en el mismo cultivo poblaciones que expresan fuertemente el marcador de células neurales tempranas y otro que no lo expresa a nivel de proteína, como se sugiere en la FIGURA 23 A y B. Cabe destacar que el marcador TUB β III es específico para la identificación de células tipo neurales, a nivel de microtúbulos.

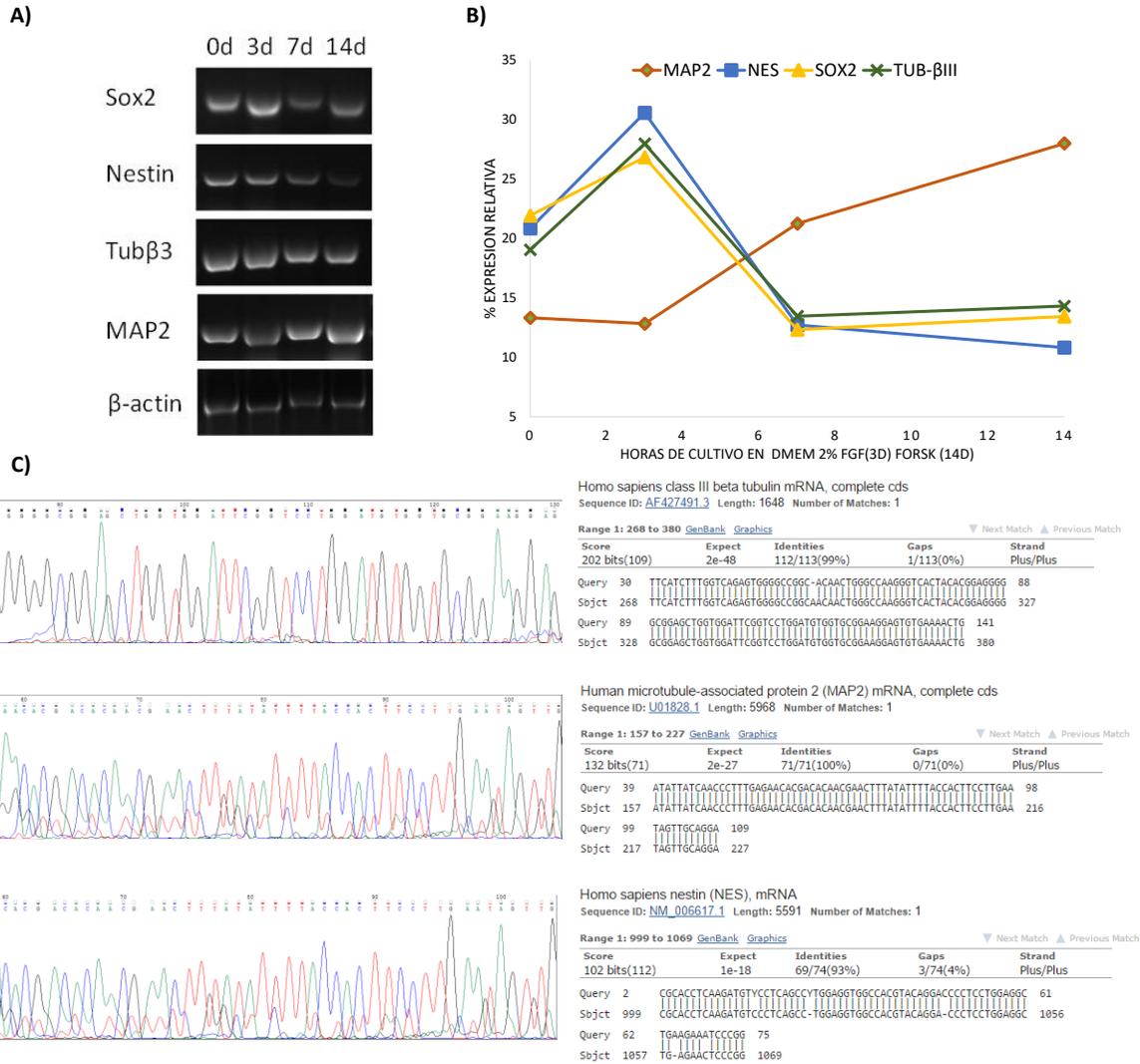


FIGURA 22. Análisis con marcadores de troncalidad y diferenciación neural temprana por RT-PCR de las hWJMSC diferenciadas con FGF 3 días y 14 días Forsk. A. Expresión de genes mensajeros de troncalidad SOX2 y Nestina evidenciada principalmente en los primeros días de cultivo de diferenciación neural; se observa la expresión de TUB BIII y MAP2 antes y durante el tratamiento de diferenciación neural. B. Curva de expresión relativa de genes de troncalidad y diferenciación neural temprana, se aprecia la tendencia de disminuir de los marcadores SOX2 y Nestina y TUB BIII. La expresión de MAP2 tiende a aumentar conforme la inducción neural. C. Secuenciación de las bandas correspondientes a los genes Nestina, Tubulina beta III, y MAP2. Para segura la expresión a nivel de mRNA, identificación por nucleotideBLAST de NCBI.

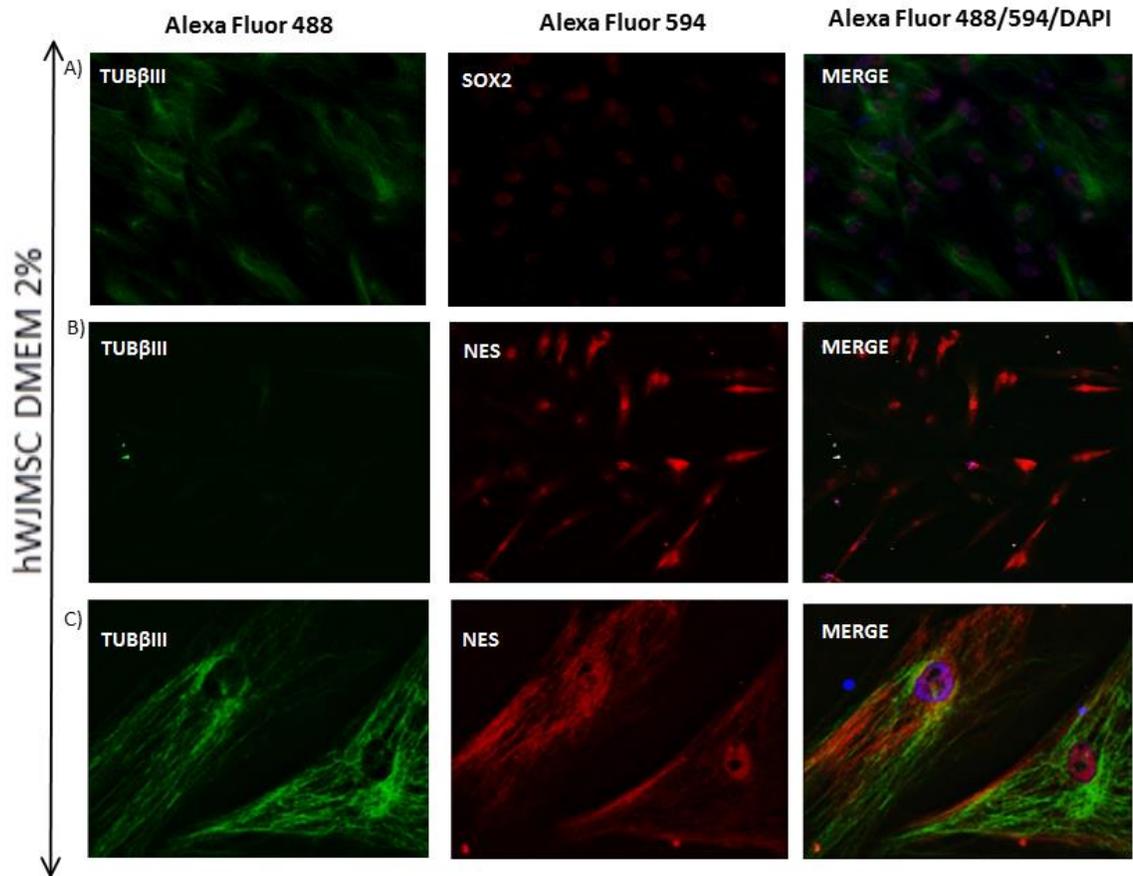


FIGURA 23. Inmunofluorescencia indirecta para la identificación de marcadores neurales en el cultivo de hWJMSC sin tratamiento de diferenciación neural. A. Expresión de Tubulina beta III en el citoesqueleto de las WJMSC, la marca de SOX2 se observa de color rojo a nivel de núcleo. B. Marcaje positivo para TUB- β III y Nestina en verde y rojo respectivamente. C. Células sin diferenciar con aumento de 1000x, se aprecia el marcaje verde específico de TUB- β III y Rojo de Nestina en diferentes secciones de microtúbulos. Se destaca la presencia de dos poblaciones una que expresa fuertemente TUB- β III y otra que prácticamente no lo expresa.

Las células tratadas con FGF2 por 3 días y Forskolina por 11 días con morfología tipo neural mostraron la ausencia del marcador SOX2, aunque la expresión de Nestina continuó a pesar de estar en proceso de diferenciación (FIGURA 24, A y B panel central). El marcador TUB β III se continúa observando tanto en las células con morfología tipo neural, y de igual forma en las células sin dicha morfología que se encuentra en el fondo, pero si se destaca un aumento de la intensidad en las células con la morfología tipo neural que continúa siendo específica para los microtúbulos y las prolongaciones intracitoplasmáticas. Se evidenció también la expresión de marcadores indicativo de células tipo neurales, como lo son MAP2 y TH (FIGURA 24, C y D panel central) que son marcadores ampliamente utilizados para la identificación de neuronas maduras.

La vista de las sobreposiciones de imágenes (*Merge*), resultan muy útiles ya que, al figurar los marcajes dobles, permite respaldar la afirmación de que las células con la morfología tipo neural son las que expresan fuertemente los marcadores MAP2, TUB β III, y TH, al igual que el mantenimiento de Nestina y la ausencia de SOX2 indicativo de propiedades de troncalidad (FIGURA 24 paneles derechos).

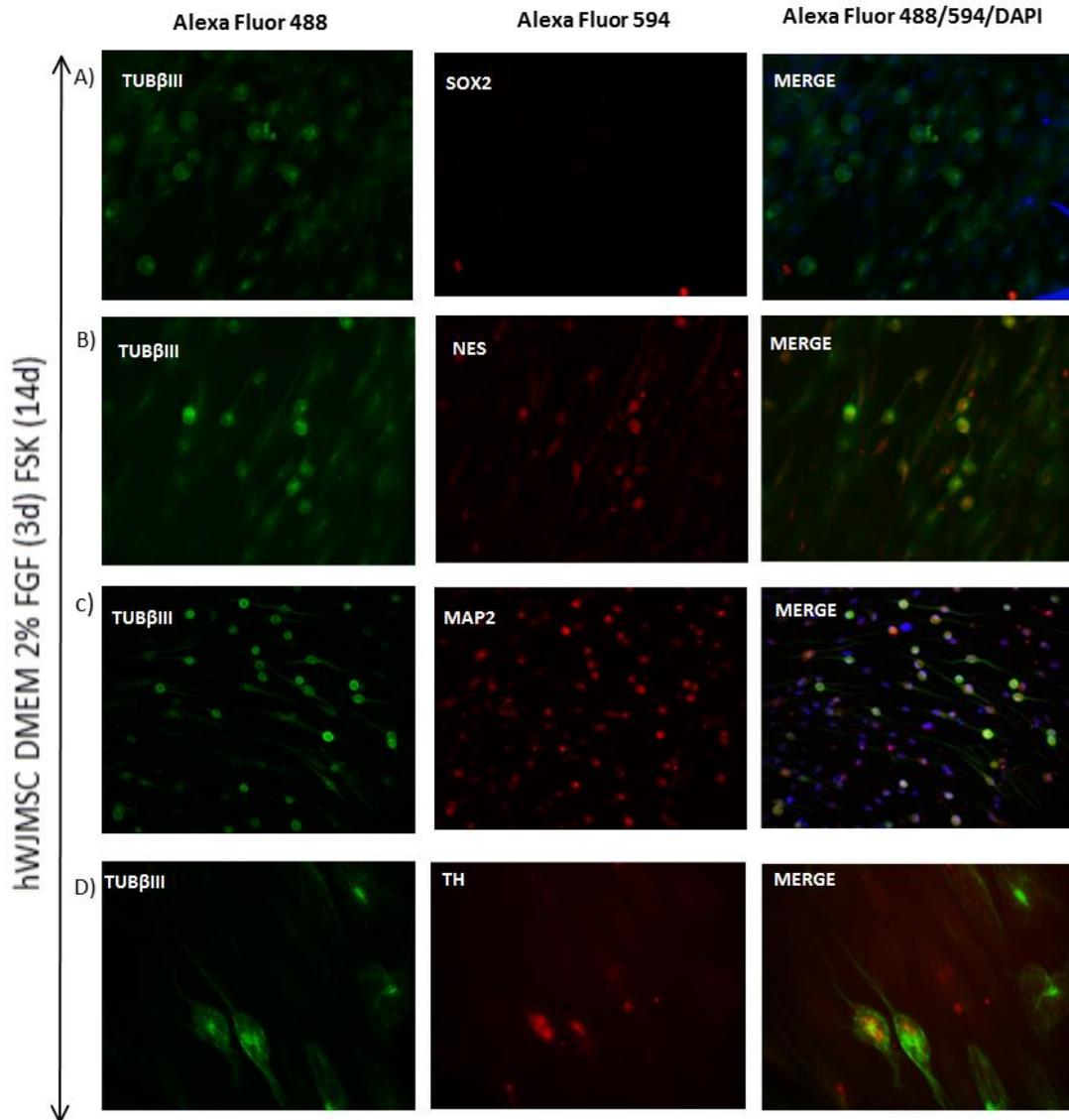


FIGURA 24. Identificación de marcadores de troncalidad y diferenciación neural temprana en cultivo de hWJMSCs posterior a la inducción neural con FGF 3 días y Forskolina 14 días. A. Expresión de TUB β III en células diferenciadas y no diferenciadas, aunque se aprecia un marcaje más fuerte en las células con morfología tipo neural, así como nula expresión de SOX2. B. Expresión de NES a nivel nuclear en células con morfología tipo neural. C. Expresión de TUB β III y MAP2 en células con morfología tipo neural, se observa igualmente que solo una proporción del cultivo se diferencia. D. Expresión positiva de TH (rojo) y selectiva en células con morfología tipo neurales, el marcaje doble no se observa en las células no diferenciadas.

V. ANALISIS DE RESULTADOS

El interés biológico y clínico de las células troncales se ha incrementado potencialmente en las últimas dos décadas, ampliando el número de equipos de investigación dedicados al estudio de estas células, lo que produce una aceleración de la información generada en este campo, pero también muchas ambigüedades e inconsistencias. Una de las fuentes de células troncales son las células troncales de origen mesénquimal (MSCs: *Mesenchymal Stem Cells*), debido a su fácil aislamiento de diversos tejidos adultos, así como su capacidad multipotente de diferenciación (Batsali et al., 2013), las MSCs aisladas de cordón umbilical humano presentan una serie de ventajas que lo sitúan como una de las mejores fuentes tanto para investigación como para ensayos clínicos, debido a que el cordón no requiere técnicas invasivas para su obtención, la manipulación de este tejido no supone grandes consideraciones bioéticas debido a su naturaleza extraembrionaria, es considerado como un tejido de desecho durante el proceso del parto, y por su fácil obtención y bajo costo (Weiss y Troyer, 2006). Aun así, se deben de considerar que existen una gran cantidad de protocolos de aislamiento de células troncales del cordón umbilical humano, por lo que la estandarización de este proceso es fundamental para que en un futuro se puedan plantear aplicaciones con fines de investigación utilizando a las hWJMSC como modelo celular.

La gelatina de Wharton resulta uno de los tejidos extraembrionarios más prometedores para el aislamiento de las células troncales mesenquimales alternativas a las HSCs debido al gran reservorio de células multipotentes presentes en el cordón umbilical, y aunque su uso ya ha sido ampliamente utilizado no se han acordado las condiciones óptimas de aislamiento, cultivo *in vitro*, proliferación, caracterización y diferenciación que permitan reproducir el modelo celular con fines de investigación o clínicos. El método de explantes de células troncales de la gelatina de Wharton ubicado en la zona perivascular del cordón umbilical humano, en medio de cultivo CHANG presentó una proliferación mucho mayor que en medios previamente reportados en la literatura como DMEM y DMEM F12, manteniendo a las células con la morfología fibroblástica, doblemente espiculada, con crecimiento en monocapa y con adherencia al plástico que ha caracterizado morfológicamente a las WJCs durante el cultivo *in vitro* (Subramanian, Fong, Biswas, & Bongso, 2015). Las WJCs aisladas del cultivo primario de cordón umbilical humano,

mostraban dos fenotipos diferentes en etapas iniciales del cultivo primario, se asume que las diferencias celulares son debidas a la naturaleza heterogénea de los explantes, que pueden incluir algunas células, de regiones intravasculares y de regiones sub-amionicas (Karahuseyinoglu, Kocaefe, Balci, Erdemli, & Can, 2008), igualmente se identificó la presencia de células sanguíneas que fueron descartadas al no ser adherentes al plástico. La FIGURA 25 muestra un estudio del cultivo WJCs en medio de cultivo de células troncales embrionarias (hESC) con una morfología tipo fibroblastoide y distribución en confluencia radial similar a nuestras observaciones (Fong et al., 2007).

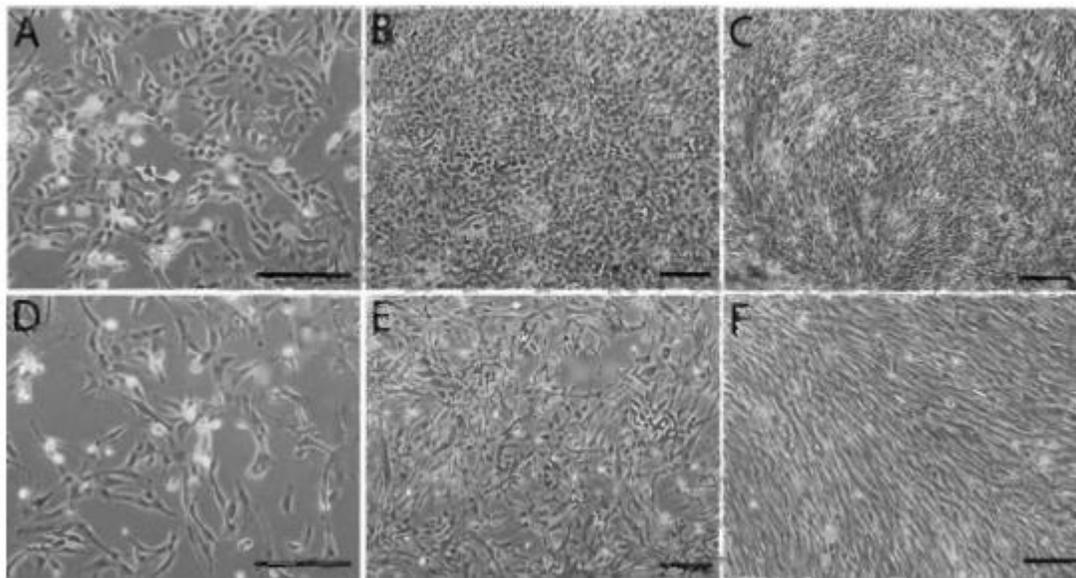


FIGURA 25. Comportamiento morfológico de WJSC cultivadas in vitro. Las figuras A, B y C muestran la morfología y distribución de las células cultivadas en el medio hESC. A) Crecimiento en islas epiteliales; B) Día 12 del cultivo primario; C) Primer pase, y cambio morfológico de tipo epitelial a fibroblástico. Las figuras D, E y F fueron WJCs cultivadas en una matriz de células troncales del cordón umbilical. D) Día 3 del cultivo primario, pequeñas células tipo fibroblásticas; E) Día 8, células con morfología fibroblástica más alargadas; F) Primer pase celular y se mantiene la morfología fibroblástica con distribución radial en confluencia. Tomada de (Fong et al., 2007).

La mayor ventaja del método de asilamiento es que no requiere de tratamientos enzimáticos adicionales y que al separar los vasos sanguíneos disminuimos la contaminación con células no troncales como las endoteliales y sanguíneas, estudios previos han reportado un 27% de expresión del marcador CD40+, en la zona perivascular y la gelatina de Wharton mientras que en otras zonas como el subamión, membrana del epitelio amniótico y saco vitelino la expresión de los marcadores de células troncales mesenquimales CD103, CD70 y CD90 es menor (Subramanian et al., 2015).

Son frecuentes en metodologías donde se emplean el cordón umbilical completo (Batsali et al., 2013) o requieren digestión con colagenasas, donde han observado que la digestión enzimática colagenasa tipo I induce modificaciones en el tamaño y granularidad celular y el número de células mesenquimales obtenidas se reduce considerablemente (Margossian et al., 2012). El medio de cultivo CHANG no solo fue ideal para el aislamiento de las WJCs, también para su proliferación ya que mantuvo a las células con la morfología descrita, permitiendo la expansión *in vitro* mucho más rápido debido a que su tiempo de duplicación celular es menor en comparación con los otros medios de cultivo de las WJCs previamente reportados (Karahuseyinoglu et al., 2007). Sin embargo, no se conoce evidencia previa de uso en células troncales, comúnmente el medio CHANG es empleado en los servicios de genética perinatal para los cultivos primarios de células de líquido amniótico para uso en cariotipo y pruebas prenatales (Irvine Scientific, 2017). Por su constitución doblemente enriquecida con suero fetal bovino y suero fetal de cabra, el medio CHANG (TD: 22.99±4.08) mejoró la duplicación celular un 160% más en comparación con el DMEM 10%SFB (TD:59.11±20.67) debido al mayor aporte de factores de crecimiento y hormonas que estimulan la proliferación. El DMEM 10%SFB debido a su constitución como medio basal no contiene proteínas o agentes que promocionan el crecimiento celular, pero contiene los requerimientos básicos para el mantenimiento de las células, la adición de suero fetal bovino favorece la adhesión celular y provee de factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular. El medio CHANG fue mejor que el medio DMEM F12 al aumentar un 44% la duplicación celular, el DMEM F12 es un mezcla 1:1 entre el DMEM y el F-12 de Ham por lo que es un medio extremadamente rico y complejo especialmente utilizado en investigación en cáncer y experimentos con células de mamíferos en general (Arora, 2013). El mantenimiento hasta 8 pases celulares de las WJCs es debido a los reportes que existen sobre la modificación en la expresión de genes después del 4 y el pase 12 de la expansión *in vitro*, donde se promueve la sobre-expresión de genes transcritos relacionados con respuesta inflamatoria, estrés celular, proliferación, maduración celular y apoptosis (Gatta et al., 2013), por lo que es indispensable la búsqueda del medio de cultivo óptimo que mantenga las propiedades de plasticidad propias de las MSC.

La caracterización de las WJCs determinó la expresión de los marcadores moleculares típicamente expresados por células troncales, siendo positivos para CD13, CD44, CD73,

CD90 y CD105, en cambio también expresan algunos marcadores como CD31, conocido como PECAM-1 que corresponde a una molécula de adhesión propia de las células endoteliales (Abelda, S., et al., 1991; Secco, M., et al., 2009); y los marcadores hematopoyéticos, CD34 que corresponde a un glicoproteína situada en la superficie celular que actúa como molécula de adhesión y se expresa selectivamente en células troncales hematopoyéticas (Satterthwaite, A., et al., 1992), el marcador CD45 correspondiente a la proteína Tirosina fosfatasa presente en todos los leucocitos (Michael, G., 2003). La presencia de estos marcadores indica la filtración de células endoteliales y hematopoyéticas de acuerdo con los criterios de la ISCT (Horwitz E., et al., 2005). La caracterización reveló que solo un 45% de las células son las que mantienen exclusivamente los marcadores de las MSCs. Debido a esto, resulta conveniente un protocolo que permitiera enriquecer la cantidad de hWJMSC excluyendo aquellas que expresen los marcadores hematopoyéticos y el marcador endotelial, por lo que la selección negativa de los marcadores CD31, CD34 y CD45 por FACS resulta una buena técnica de enriquecimiento, permitiendo llegar a un enriquecimiento de hWJMSC aproximadamente del 80%. La caracterización de las células cultivadas del post-sorting seleccionadas por FACS con el fenotipo CD31, CD34 y CD45 negativos, destaca una fuerte expresión de los marcadores de troncalidad, con la notoria disminución en la intensidad de marcaje de CD105 y CD73, además la separación notoria de una población dividida entre CD34+ y CD34-, podría indicar que las células que fueron eliminadas durante la selección expresan fuertemente los marcadores CD105 y CD73; esto nos lleva a pensar en una propuesta que trata de situar al marcador CD34 como constitutivo de las células WJSCs (Bunting K., 2002). En cuanto a la proliferación de las células post-sorting, el medio óptimo de crecimiento continúa siendo el medio CHANG aunque con una ligera disminución en su capacidad proliferativa ($TD\ CHANG=23.52\pm 3.37$) en comparación con las WJSC.

La sociedad internacional de terapia celular dicta las características que deben de mantener las células del cultivo para poder ser nombradas como hWJMSCs, por lo que el potencial adipogénico de estas células fue evaluado para corroborar su capacidad de diferenciarse en por lo menos 2 linajes celulares diferentes. La presencia de los depósitos de lípidos en el citoplasma posterior al tratamiento de inducción adiposa al cabo de 40 días, comprueba el potencial adipogénico de las hWJMSC (Karahuseyinoglu, Kocafe, Balci, Erdemli, & Can, 2008). La FIGURA 26 muestra los estadios celulares que conllevan a la diferenciación

adiposa y ósea, con la participación destacada del gen PPAR γ en las células progenitoras adiposas. El cambio en la morfología de las células es debido a que la adipogénesis modifica la estructura celular como la pérdida de moléculas de adhesión y el aumento del tamaño celular por la acumulación de lípidos (Smas & Sul, 1995). Así como del aumento de factores de transcripción necesarios para la conducción de la programación adiposa.

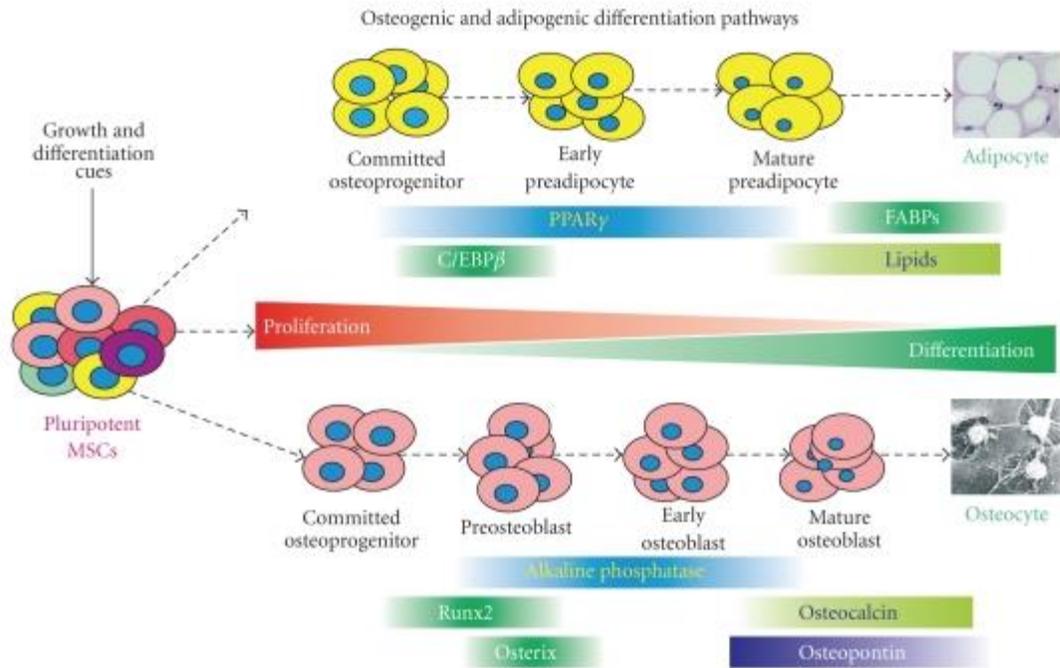


FIGURA 26. Diferenciación Adiposa y Osteogénica de MSCs. Los genes involucrados en la adipogénesis y osteogénesis son compartidos en muchas partes de la vía de diferenciación, entre ellos destaca la inducción por el gen PPAR γ el cual está presente en los osteoprogenitores comprometidos hasta los preadipocitos maduros.

Los agentes responsables de la inducción adiposa en las MSC no están claros aún, la Tabla 10 detalla la composición química de medios de inducción no comerciales de diferenciación adiposa. Pero *el Mesencult adipogenic differentiation médium* está compuesto por agonistas de PPAR γ que incluyen a los derivados de tiazolidinediones o también llamados glitazonas los cuales se une a PPAR γ sensibilizando a las células grasas a la insulina necesaria para la síntesis de lípidos intracelulares.

Tabla 10. Formulación sugerida para diferenciación Adipogénica. Adaptado de (Scott, Nguyen, Levi, & James, 2011)

	FBS (%)	Insulin (nM)	Dexametazona (nM)	Indometacina (μM)	IBMX (μM)
BMSCs ratón	10	5000	100	0	0
BMSCs Humano	10	0	175	50	0
ASC ratón	10	320	1000	0	0
ASC humano	10	393	100	0	0

BMSCs: Células trocales mesenquimales de medula ósea; ASC: Células troncales mesenquimales derivadas de adipocitos.

La diferenciación adiposa comienza al unirse los derivados de glitazonas al receptor de PPAR γ , donde efectúan la doble acción de sensibilizar a la célula a la insulina y es necesario para el transporte del 9-cis ácido retinoico a la membrana nuclear para la síntesis de lípidos (Jawerbaum & Capobianco, 2011). El gen PPAR γ es uno de los reguladores centrales de la adipogénesis como lo muestra la FIGURA 27, su expresión es considerado un factor inicial de la diferenciación adiposa (Rosen, Walkey, Puigserver, & Spiegelman, 2000), en conjunto con C/EBP α y C/EBP β (Rosen et al., 2002).

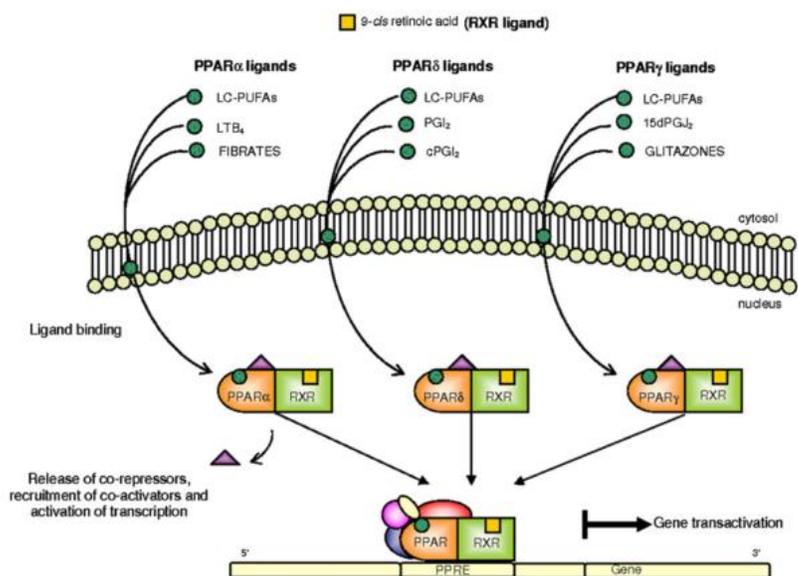


FIGURA 27. Representación esquemática de las principales vías de activación de PPAR γ . Al unirse PPAR γ activa la transcripción de genes como heterodímeros con el *retinoid X receptor (RXR)*, transfiriendo el 9-cis ácido retinoico endógeno del citosol a la membrana nuclear, donde se efectúa la síntesis de eicosanoides.

Aunque se corroboró el potencial adipogénico de las hWJMSCs es a considerar que falta corroborar el potencial condrogénico y osteogénico para confirmar su identidad como MSCs de acuerdo a los criterios de la ISCT (Frausin et al., 2015).

Reportes han sugerido que bajo adecuados estímulos las hWJMSCs pueden diferenciarse en células tipo neural de forma *in vitro* (Greber et al., 2011) como lo sugiere la FIGURA 28, el linaje tipo neural no es parte de la diferenciación típica de las células mesenquimales, la posibilidad de diferenciación de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) se ha estado investigando continuamente, por lo que los protocolos de inducción neural en estas células no están finamente establecidos existiendo muchos procedimientos diferentes. Para la diferenciación de células tipo neurales se han involucrado diferentes agentes como el FGF2, BHA, Forskolina, ácido valproico, KCl, hidrocortisona y DMSO (Woodbury, Schwarz, Prockop, & Black, 2000). Con el fin de encontrar el mejor protocolo de inducción neural se realizaron estudios preliminares que consistieron en cambios del medio de cultivo, número de células y la inducción con diferentes compuestos químicos. Entre los protocolos evaluados el agente químico común que participaba en la producción de células con morfología tipo neural fue la Forskolina a una concentración de 10uM por un periodo de 14 días.

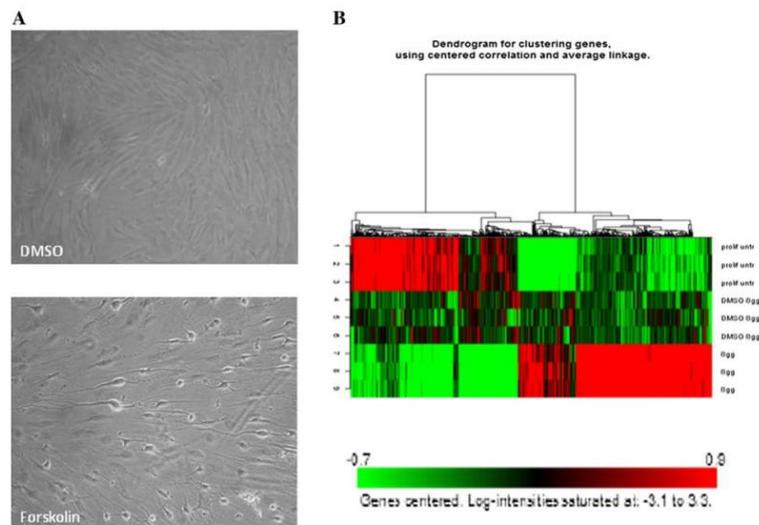


FIGURA 28. Reporte de Inducción neural de hWJMSC. A. Se aprecian las diferencias morfológicas entre el cultivo no tratado y el condicionado con Forskolina por 15 días, destacando las células redondeadas con prolongaciones intracitoplasmáticas. B. Microarreglo descrito para la predicción de genes modulados posterior a la inducción neural con Forskolina. (Paldino et al., 2014a)

La forskolina produjo cambios morfológicos notorios después de 1 semana de tratamiento mostrando cuerpos celulares retractiles con elongaciones que salen del cuerpo celular y se ramifican, muy similares a reportes previos (Paldino et al., 2014b).

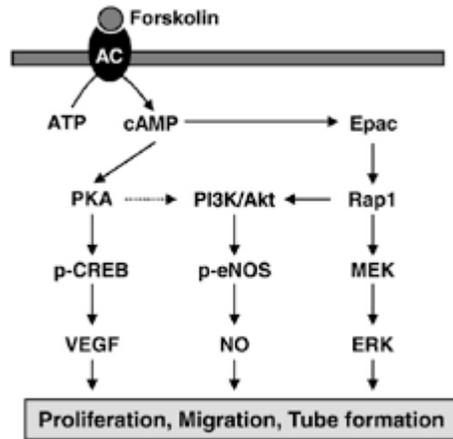


FIGURA 29. Vías de señalización inducidas por Forskolina. Ambas promueven la elongación de neuritas y la viabilidad celular.

La Forskolina es un activador de adenilil ciclasa que efectúa la degradación de AMP a cAMP, resultando en un incremento intracelular de cAMP el cual funciona como segundo mensajero y mediador intracelular (Shahbazi et al., 2016), para diferentes vías de señalización como en la expresión de las cinasas CREB y MAP. CREB es un factor de transcripción que por la fosforilación en el residuo 133 de serina incrementa los niveles de cAMP, como se aprecia en la FIGURA 29. Así mismo se continúa estudiando la activación de ERK 1/2 por la Forskolina, lo cual se traduce en aumento de la proliferación celular, síntesis de proteínas de migración y la formación de microtúbulos. Se han asociado una gran cantidad de genes modulados después al tratamiento con Forskolina, los que destacan son los factores de transcripción neuronal, neurotransmisores y sus receptores, transportadores neurales, moléculas implicadas en la transmisión sináptica y factores solubles vinculados a la neurogénesis, como se aprecia en la Tabla 11.

Tabla 11. Genes neuronales modulados en las hWJMSC después del tratamiento con Forskolina. La tabla muestra genes en células neurales inducidas con Forskolina y clasificados de acuerdo con la categoría funcional de la señalización neural.

Functional category	Official full name	Official symbol	Fold change	P-value	
Neuronal transcription factors	Forkhead box protein A1	FOXA1	+3	1 < E-07	
	Forkhead box protein O1A	FOXO1	+4	1 < E-07	
	Nuclear receptor subfamily4 group A member 2	NR4A2	+3.12	1 < E-07	
	LIM homeobox transcription factor 1 alpha	LMX1A	+1.56	1 < E-07	
Neurotransmitter and receptors	Neuronal-specific transcription factor DAT1	LMO3	+5.93	1 < E-07	
	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1	GABRB1	+3.8	1 < E-07	
	Glutamate decarboxylase 1 (brain, 67 kDa)	GAD1	+1.93	1 < E-07	
	HtrA serine peptidase 1	HTRA1	+3.8	1 < E-07	
	HtrA serine peptidase 2	HTRA2	+3.77	1 < E-07	
	HtrA serine peptidase 3	HTRA3	+1.98	1 < E-07	
	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1	GRIK1	+2	1 < E-07	
	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 2	GRIK2	+2	2E-07	
Neural transporters	Dopamine receptor	DRD1	+3.03	1 < E-07	
	Kinesin family member 1B	KIF1B	+2.67	1 < E-07	
	Kinesin family member 1C	KIF1C	+2	1 < E-07	
	Synapsin I	SYN1	+2.57	1E-07	
	Synapsin II	SYN2	+2.21	1 < E-07	
Synaptic transmission	Actin binding LIM protein 1	ABLIM1	+1.56	1 < E-07	
	Vesicle-associated membrane protein 7	VAMP7	+2.58	7E-07	
	Potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	KCND2	+5.72	1 < E-07	
	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	KCNJ8	+2.24	1 < E-07	
	Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1	KCNG1	+0.49	1 < E-07	
	Potassium channel, subfamily K, member 2	KCNK2	+5.63	1 < E-07	
	Potassium channel, subfamily K, member 3	KCNK3	+4.79	1 < E-07	
	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M	KCNMA1	-0.41	1 < E-07	
	Synaptosomal associate protein 25 kDa	SNAP25	+3.7	1 < E-07	
		SLC16A4	+4	1 < E-07	
		SLC16A10	-0.3	1E-05	
	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	SLC40A1	+3.04	1 < E-07	
	Solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 3	SLC22A3	+3.14	1 < E-07	
	Solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter)	SLC22A4	+2.69	1 < E-07	
	Solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3	SLC37A3	+2.56	1 < E-07	
	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 1	SLC9A3R1	+2.37	1 < E-07	
	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	SLC39A8	+2.28	1 < E-07	
	Solute carrier family 26, member 6	SLC26A6	+1.95	2E-07	
	Solute carrier family 35, member F3	SLC35F3	+1.94	2E-07	
	Solute carrier family 44, member 1	SLC44A1	+1.93	1 < E-07	
	Solute carrier family 43, member 3	SLC43A3	+1.88	1 < E-07	
	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	SLC40A1	+1.77	1 < E-07	
	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system)	SLC7A1	-0.55	3E-07	
		SLC24A3	-0.35	3E-07	
		SLC2A5	-0.32	5E-07	
	Soluble factors	Solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	SLC2A5	-0.32	5E-07
		Transforming growth factor, beta receptor III	TGFBR3	+3.57	1 < E-07
Growth differentiation factor 15		GDF15	+2.79	1 < E-07	
GDNF family receptor alpha 1		GFRA1	+3.37	1 < E-07	
Bone morphogenetic protein 6		BMP6	+2.3	1 < E-07	
Wingless-type MMTV integration site family, member 5A		WNT5A	+4.7	1 < E-07	
Neuropeptide Y		NPY	+15.87	1 < E-07	
Brain-derived neurotrophic factor		BDNF	+3.4	1 < E-07	

La diferenciación neural por Forskolina resultó muy apropiada para las hWJMSCs, pero adicionalmente se probó una preinducción con el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), el cual es conocida en la investigación con células troncales por lograr un mantenimiento en estadio indiferenciado de las HSCs y NSC. (Streit, Berliner, Papanayotou, Sirulnik, & Stern, 2000). Su uso como preinducción desató una mayor cantidad de células diferenciadas comparado con los que solo fueron tratados con forskolina.

La evidencia de diferenciación neural a nivel de mRNA y proteína en las células tratadas con forskolina y FGF destacó la disminución de los marcadores de troncalidad SOX2 y

Nestina propios de células que conllevan un proceso de diferenciación celular; sin embargo la producción de Nestina y el aumento de TUB- β III son indicativos de células progenitoras neurales y al obtener la marca tan específica en los cuerpo celulares redondeados con prolongaciones podemos decir que la Forskolina está produciendo un aumento en la producción de microtúbulos intracelulares necesarios para la formación de dendritas, axones de la dendrita (Mitchell et al., 2003), la evidencia de MAP2 en las células transformadas sugiere que las hWJMSC inducidas se encuentran en proceso de maduración a neuronas. (Zhang et al., 2012).

Cabe destacar que en las inmunofluorescencias de los cultivos no tratados con forskolina se evidencio a nivel de mRNA y proteína la presencia de TUB- β III, lo que sugiere que desde antes de promover cualquier tipo de diferenciación celular, las hWJMSCs ya expresan algunos marcadores neurales, esto lo han visto diferentes equipo de investigación y se está suponiendo que una subpoblación de las MSCs del cordón umbilical ya están encaminadas a producir progenitores neurales (Chen et al., 2016; Oppliger et al., 2016).

Finalmente, la investigación con hWJMSCs es muy amplia y sus utilidades parecen ser ilimitadas. Desde la búsqueda de mejores fuentes de obtención de MSCs para usos clínicos en medicina regenerativa como en la diabetes mellitus tipo 1 y 2, donde pacientes se transfieren las WJMSCs con el fin de disminuir la dosis diaria de insulina, también se ha visto una notable disminución de moléculas proinflamatorias como IL-1B e IL-6, se continúa investigando su uso en el lupus eritematoso sistémico, así como en la cistitis hemorrágica. (Kalaszczynska, Ferdyn, Kalaszczynska, & Ferdyn, 2015)

VI. CONCLUSIONES

Las hWJMSC aisladas por explante resulta un método de fácil obtención, barato, rápido y sin consideraciones bióticas que impidan el desarrollo de su investigación, además cumplen con la mayoría de los criterios morfológicos, inmunofenotípicos, potencial de diferenciación evaluado a nivel de expresión de mRNA y proteína establecidos por la ISCT para definir las como MSCs. El medio de proliferación óptimo de las células resultó ser el CHANG superando por mucho los medios tradicionalmente empleados en el área como DMEM y DMEM/F12.

Las hWJMSC aisladas por explante de la zona perivascular mostraron la expresión de marcadores de troncalidad, aunque existe filtración de células hematopoyéticas, así mismo se debe de considerar la posibilidad de que el marcador CD34, sea positivo para el modelo de las hWJMSCs.

La pre inducción con FGF por 3 días y la posterior inducción con forskolina por 14 días es el mejor protocolo para la obtención de células tipo neurales que expresen los marcadores de células progenitoras neurales a nivel de mRNA y proteína.

Finalmente se deben de considerar a estas células como “excelentes” candidatas para la obtención de células troncales mesenquimales para la aplicación clínica debido a su facilidad de obtención, gran potencial de proliferación, potencial de plasticidad de las 3 capas embrionarias, y baja respuesta inmune al trasplante.

VII. PERSPECTIVAS

Se podrían implementar otros métodos de enriquecimiento como el uso de microperlas, con marcadores específicos positivos como la selección de poblaciones CD73+, CD105+, CD90+ y la exclusión de CD34, y CD31 con una población previamente enriquecida por FACS para observar si hay mejoras en la homogeneidad de la población celular.

Faltaría determinar exactamente los pases máximos que soportan las hWJMSCs bajo condiciones de cultivo *in vitro*; así como el recorte de telómeros e inclusive un cariotipo para corroborar que no se han sufrido modificaciones genómicas por el cultivo. También es necesario determinar la proliferación celular por metodologías más precisas como cuantificación de BRDU o por citometría de flujo.

Se necesitan realizar la determinación del potencial condrogénico y osteogénico bajo las mismas condiciones de cultivo celular para corroborar los criterios de la ISCT.

La diferenciación neural y adiposa se podría probar sobre una matriz tridimensional para evitar la pérdida de células con morfología neural producidas por efectos durante la manipulación.

Se deben de prolongar los periodos de inducción neural con forskolina para asegurar la máxima cantidad de células diferenciadas.

VIII. REFERENCIAS

- Aguilera C., A. (2015). *Evaluación del potencial de trasndiferenciación neural en células estromales mesenquimales de médula ósea*.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
- Alison, M. R., Poulsom, R., Forbes, S., & Wright, N. A. (2002). An introduction to stem cells - Alison - 2002.pdf, 2001(August 2001), 419–423.
- Anzaldúa Arce, S. R., Juárez Mosqueda, M. de L., Cornejo Cortés, M. Á., Ríos Mas, M. C., Villaseñor Gaona, H., & Meraz, M. A. (2007). Que son las células troncales o células madre ? *Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia*, 38(1), 81–104.
- Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*, 3. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.175>
- Badran, S. (2016). *Stem Cells in Neuroendocrinology*. (P. Donald & C. Yves, Eds.) (Springer). Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41603-8>
- Baldwin, T. (2009). Morality and human embryo research. Introduction to the Talking Point on morality and human embryo research. *EMBO Reports*, 10(4), 299–300. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.37>
- Batsali, A. K., Kastrinaki, M.-C., Papadaki, H. a, & Pontikoglou, C. (2013). Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 8(2), 144–55. <https://doi.org/CSCRT-EPUB-20121231-1> [pii]
- Berdasco, M., & Esteller, M. (2011). DNA methylation in stem cell renewal and multipotency. *Stem Cell Research & Therapy*, 2(5), 42. <https://doi.org/10.1186/scrt83>
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2009). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell*, 2(4), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>.Mesenchymal
- 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.*, 9, 226–240.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., & Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research*, 35(5), 567–76. <https://doi.org/10.1002/jnr.490350513>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641–50. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Caplan, A. I. (1994). The mesengenic process. *Clinics in Plastic Surgery*, 21(3), 429–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7924141>
- Chen, S., Zhang, W., Wang, J.-M., Duan, H.-T., Kong, J.-H., Wang, Y.-X., ... Song, J. (2016). Differentiation of isolated human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural stem cells. *International Journal of Ophthalmology*, 9(1), 41–7. <https://doi.org/10.18240/ijo.2016.01.07>
- Cooper, G. M. (2000). Cell Proliferation in Development and Differentiation. *The Cell: A Molecular Approach*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9906/>
- Corrao, S., La Rocca, G., Lo Iacono, M., Zummo, G., Gerbino, A., Farina, F., & Anzalone, R. (2013). New frontiers in regenerative medicine in cardiology: the potential of Wharton's jelly

- mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 8, 39–45. <https://doi.org/CSCRT-EPUB-20121231-2> [pii]
- Cunha Ferreira, A., Gallo Vallejo, M., Maria Ferlin, R., & Mauad Filho, F. (2010). cordón umbilical y membranas. In *ginecología y obstetricia* (2nd ed., p. 177). Retrieved from <http://www.amolca.com.co/images/stories/amolca/medicina/ginecologia-y-obstetricia/ultrasonografia-ginecologia-obstetricia-2da-ed-t1/pag177.pdf>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. F. ., Krause, D. S. D., ... Horwitz, E. E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Faghihi, F., Mirzaei, E., Ai, J., Lotfi, A., Sayahpour, F. A., Barough, S. E., & Joghataei, M. T. (2015). Differentiation Potential of Human Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells into Motor Neuron-Like Cells in Two- and Three-Dimensional Culture Systems. *Molecular Neurobiology*, 10(3), 923–938. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9129-y>
- Flores-Figueroa, E., Montesinos, J. J., & Mayani, H. (2006). Células troncales mesenquimales: Historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigacion Clinica*, 58(5), 498–511.
- Fong, C. Y., Richards, M., Manasi, N., Biswas, a, & Bongso, a. (2007). Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reproductive Biomedicine Online*, 15(6), 708–718. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60539-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60539-1)
- Frausin, S., Viventi, S., Verga Falzacappa, L., Quattromani, M. J. lenia, 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), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.005>
- Fu, Y.-S., Cheng, Y.-C., Lin, M.-Y. A., Cheng, H., Chu, P.-M., Chou, S.-C., ... Sung, M.-S. (2006). Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons In Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism. *Stem Cells*, 24(1), 115–124. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0053>
- Gatta, V., D'Aurora, M., Lanuti, P., Pierdomenico, L., Sperduti, S., Palka, G., ... Stuppia, L. (2013). Gene expression modifications in Wharton's Jelly mesenchymal stem cells promoted by prolonged in vitro culturing. *BMC Genomics*, 14(1), 635. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-635>
- Gepstein, L. (2002). Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circulation Research*, 91(10), 866–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433831>
- Greber, B., Coulon, P., Zhang, M., Moritz, S., Frank, S., Müller-Molina, A. J., ... Schöler, H. R. (2011). FGF signalling inhibits neural induction in human embryonic stem cells. *The EMBO Journal*, 30(24), 4874–4884. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.407>
- Guerrero, V. (2004). Células troncales: La controversia. *¿cómoves?*, (62). Retrieved from <http://www.comoves.unam.mx/assets/revista/62/celulas-troncales-la-controversia.pdf>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hernigou, P., & Homma, Y. (2012). Tissue bioengineering in orthopedics. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 9(1), 21–23.
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., ... Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular

- Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393–395.
<https://doi.org/10.1080/14653240500319234>
- Jawerbaum, a., & Capobianco, E. (2011). Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: Implications in maternal diabetes. *Placenta*, 32, S212–S217.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.12.002>
- Joerger-Messerli, M. S., Marx, C., Oppliger, B., Mueller, M., Surbek, D. V., & Schoeberlein, A. (2016). Mesenchymal Stem Cells from Wharton’s Jelly and Amniotic Fluid. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 31, 30–44.
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006>
- Kalaszczynska, I., Ferdyn, K., Kalaszczynska, I., & Ferdyn, K. (2015). Wharton’s Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Future of Regenerative Medicine? Recent Findings and Clinical Significance. *BioMed Research International*, 2015, 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2015/430847>
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. O., ... Can, A. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319–331. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0286>
- Karahuseyinoglu, S., Kocaefe, C., Balci, D., Erdemli, E., & Can, A. (2008). Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(3), 682–91. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0738>
- Kim, D.-W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.-D., & Borlongan, C. (2013). Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11692–11712. <https://doi.org/10.3390/ijms140611692>
- Kinare, A. (2008). Fetal environment. *Indian Journal of Radiology and Imaging*, 18(4), 326. <https://doi.org/10.4103/0971-3026.43848>
- Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 9(1), 204. <https://doi.org/10.1186/ar2116>
- Kørbling, M., & Estrov, Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *The New England Journal of Medicine*, 349(6), 570–82. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022361>
- Lacadena, J.-R. (2003). Células troncales humanas : aspectos científicos y éticos. Presentación. *Anal. Real Acad. Nal. Farm*, (69), 4.
- Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., ... Loring, J. F. (2011). Dynamic Changes in the Copy Number of Pluripotency and Cell Proliferation Genes in Human ESCs and iPSCs during Reprogramming and Time in Culture. *Cell Stem Cell*, 8(1), 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.003>
- Liao, L., & Zhao, R. C. (2015). Mesenchymal Stem Cells and Their Immunomodulatory Properties. In *Stem Cells: Basics and Clinical Translation* (pp. 67–83). https://doi.org/10.1007/978-94-017-7273-0_3
- Lim, J. Y., Park, S. I., Oh, J. H., Kim, S. M., Jeong, C. H., Jun, J. A., ... Jeun, S.-S. (2008). Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *Journal of Neuroscience Research*, 86(December 2007), 2168–2178. <https://doi.org/10.1002/jnr.21669>
- Lopez Guerrero, J. A. (2004). *Celulas madre : la madre de todas las celulas*. Editorial Helice.
- Marcus, A. J., & Woodbury, D. (2008). Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard.

Cell. Mol. Med., 12, 730–742.

- Margossian, T., Reppel, L., Makdissy, N., Stoltz, J.-F., Bensoussan, D., & Huselstein, C. (2012). Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: Comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 22, 243–254. <https://doi.org/10.3233/BME-2012-0714>
- Martins, A. H., Roig-Lopez, J. L., & Gonzalez, M. N. (2016). Neural Differentiation of Rodent Neural Progenitor Cells and Isolation and Enrichment of Human Neural Progenitor/Stem Cells. In H. Ulrich & P. Davidson Negraes (Eds.), *Working with Stem Cells* (Springer, pp. 57–77). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30582-0_4
- Mikaeili Agah, E., Parivar, K., Nabiuni, M., Hashemi, M., & Soleimani, M. (2013). Induction of Human Umbilical Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Toward Oligodendrocyte Phenotype. *Journal of Molecular Neuroscience*, 51(2), 328–336. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0094-5>
- Mitchell, K. E., Weiss, M. L., Mitchell, B. M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., ... Medicetty, S. (2003). Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia. *STEM CELLS*, 21(1), 50–60. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-1-50>
- Nekanti, U., Mohanty, L., Venugopal, P., Balasubramanian, S., Totey, S., & Ta, M. (2010). Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Research*, 5(3), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.08.005>
- Olivera, Á., Glaser, T., Ulrich, H., & Correa-Velloso, J. (2016). Stem cells: Principles and applications. In H. Ulrich & P. Davidson Negraes (Eds.), *Working with stem cells* (Springer). Switzerland.
- Oppliger, B., Joerger-Messerli, M. S., Simillion, C., Mueller, M., Surbek, D. V., & Schoeberlein, A. (2016). Mesenchymal stromal cells from umbilical cord Wharton's jelly trigger oligodendroglial differentiation in neural progenitor cells through cell-to-cell contact. *Cytotherapy*, (March). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.03.075>
- Owen, M., & Friedenstein, A. J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium*, 136, 42–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3068016>
- Paldino, E., Cenciarelli, C., Giampaolo, A., Milazzo, L., Pescatori, M., Hassan, H. J., & Casalbore, P. (2014a). Induction of Dopaminergic Neurons From Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell by Forskolin. *Journal of Cellular Physiology*, 229(2), 232–244. <https://doi.org/10.1002/jcp.24442>
- Paldino, E., Cenciarelli, C., Giampaolo, A., Milazzo, L., Pescatori, M., Hassan, H. J., & Casalbore, P. (2014b). Induction of dopaminergic neurons from human Wharton's jelly mesenchymal stem cell by forskolin. *Journal of Cellular Physiology*, 229(2), 232–44. <https://doi.org/10.1002/jcp.24442>
- Pappa, K. I., & Anagnou, N. P. (2009). Novel sources of fetal stem cells: Where do they fit on the developmental continuum? *Regen. Med.*, 4, 423–433.
- Ribeiro, J., Gartner, A., Pereira, T., Gomes, R., Lopes, M. A., Gonçalves, C., ... Maurício, A. C. (2013). *Perspectives of employing mesenchymal stem cells from the wharton's jelly of the umbilical cord for peripheral nerve repair. International Review of Neurobiology* (Vol. 108). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410499-0.00004-6>
- Rodríguez-Pardo, V. M., Fuentes-Lacouture, M. F., Aristizabal-Castellanos, J. A., & Hernandez, J. P. V. (2010). Aislamiento y caracterización de células "stem" mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Universitas Scientiarum*, 15(3), 224–239. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC15-3.iaco>
- Rosen, E. D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., & Spiegelman, B. M.

- (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma : a unified pathway. *Genes & Development*, *16*(1), 22–26. <https://doi.org/10.1101/gad.948702>
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development*, *14*(11), 1293–307. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837022>
- Sabapathy, V., Sundaram, B., Vm, S., Mankuzhy, P., & Kumar, S. (2014). Human Wharton ' s Jelly Mesenchymal Stem Cells Plasticity Augments Scar-Free Skin Wound Healing with Hair Growth, *9*(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093726>
- Scott, M. A., Nguyen, V. T., Levi, B., & James, A. W. (2011). Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, *20*(10), 1793–804. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0040>
- Semenov, O. V., Koestenbauer, S., Riegel, M., Zech, N., Zimmermann, R., Zisch, A. H., & Malek, A. (2010). Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: Critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, *(202)*, 191–193.
- Shahbazi, A., Alikarami, F., Kargozar, S., Asadi, M. H., Joghataei, M. T., Soleimani, M., & Safa, M. (2016). Rapid Induction of Neural Differentiation in Human Umbilical Cord Matrix Mesenchymal Stem Cells by cAMP-elevating Agents. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine (IJMCM)*, *5*(3), 167–177. Retrieved from <http://www.ijmcm.org/article-1-540-en.html>
- Shen, J., & Qu, C. (2009). Embryonic Stem Cells, *430*(1cm), 103–118. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0421>
- Slack, J. M. W. (Jonathan M. W. (2013). *Essential developmental biology*. Wiley.
- Smas, C. M., & Sul, H. S. (1995). Control of adipocyte differentiation. *The Biochemical Journal*, *309* (Pt 3), 697–710. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7639681>
- Streit, A., Berliner, A. J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., & Stern, C. D. (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature*, *406*(6791), 74–78. <https://doi.org/10.1038/35017617>
- Subramanian, A., Fong, C.-Y., Biswas, A., & Bongso, A. (2015). Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*, *10*(6), e0127992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127992>
- Takada, I., Kouzmenko, A. P., & Kato, S. (2009). Wnt and PPARγ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nature Reviews Rheumatology*, *5*(8), 442–447. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.137>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblast by defined factors. *Cells*, 861–872.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. ., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *(282)*, 1145–1447.
- Tsagias, 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. *Transfusion Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2011.01076.x>
- Ulrich, H., & Davidson Negraes, P. (2016). *Working with Stem Cells*. Springer. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30582-0>
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., & Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow

- stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 61(4), 364–370. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000815\)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C) [pii]
- Young E., H., & Asa C, B. (2004). Adult stem cells. *The Anatomical Record*, 276A(1), 75–102. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10134>
- Zayed, S., Gaafar, T., Samy, R., Sabry, D., Nasr, A., & Maksoud, F. A. (2016). Production of endothelial progenitor cells obtained from human Wharton’s jelly using different culture conditions. *Biotechnic & Histochemistry*, 91(8), 532–539. <https://doi.org/10.1080/10520295.2016.1250284>
- Zeddou, M., Briquet, A., Relic, B., Josse, C., Malaise, M. G., Gothot, A., ... Beguin, Y. (2010). The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biology International*, 34(7), 693–701. <https://doi.org/10.1042/CBI20090414>
- Zhang, L., Tan, X., Dong, C., Zou, L., Zhao, H., Zhang, X., ... Jin, G. (2012). In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton’s jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 30(6), 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.05.006>