

**DISEÑO DE UN PROTOCOLO PARA LA COLECTA DE CÉLULAS
MADRE A PARTIR DEL CORDÓN UMBILICAL DE NEONATOS
CANINOS.**

BOGOTÁ-COLOMBIA



Yuliet Paola Soto Vanegas

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Sede (Bogotá), Colombia

2022

**DISEÑO DE UN PROTOCOLO PARA LA COLECTA DE CÉLULAS
MADRE A PARTIR DEL CORDÓN UMBILICAL DE NEONATOS
CANINOS.**

BOGOTÁ-COLOMBIA



Yuliet Paola Soto Vanegas

Código estudiantil UAN: No. 10511821538

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de;

Médica Veterinaria

Yuliet Paola Soto Vanegas

Director

Dr. Orlando Alfredo Torres García - VMD, MSc, PhD

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Sede (Bogotá), Colombia

2022

**DISEÑO DE UN PROTOCOLO PARA LA COLECTA DE CÉLULAS
MADRE A PARTIR DEL CORDÓN UMBILICAL DE NEONATOS
CANINOS.**

BOGOTÁ-COLOMBIA

Yuliet Paola Soto Vanegas

TRABAJO DE GRADO APROBADO

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Sede (Bogotá), Colombia

2022

DEDICATORIA

Este trabajo de grado va dedicado a todos aquellos que de cierta manera estuvieron involucrados en hacerla posible. En especial a mis padres por siempre creer en mí y siempre apoyarme en mi proceso de estudiante.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a quienes de manera directa e indirecta fueron partícipes en su ejecución, doy gracias a mi director de grado, el profesor Orlando Alfredo Torres García VMD, MSc, PhD , que gracias a su conocimiento me acompañó en la realización de este proyecto teniendo la disposición y colaboración cuando así lo requerí ya que fueron fundamentales en la corrección y ajustes necesarios para la culminación del proyecto.

RESUMEN

Título: Diseño de un protocolo para la colecta de células madre a partir del cordón umbilical de neonatos caninos en Bogotá-Colombia

Autor: Yuliet Paola Soto Vanegas

Descripción:

Las células madre son indiferenciadas, inmaduras, autorrenovables y tienen la capacidad de producir uno o más tipos de células diferenciadas. Estas células pueden dividirse indefinidamente conservando siempre una población estable de células madre y diferenciarse hacia los distintos tipos de células especializadas de un organismo adulto. Existen varias fuentes de células madre, como sangre de cordón umbilical, médula ósea, sangre periférica, piel, dientes, placenta, embriones etc. (Evans y Kaufman 1981, Das y col 2008).

En Colombia se trabajan con células madre, sin embargo, aún en veterinaria no se cuenta con un protocolo establecido que sea el idóneo ofreciendo seguridad para su posterior uso puesto que, en los últimos 20 años, las células madre han recibido atención por parte de investigadores tanto en medicina humana como veterinaria por sus propiedades funcionales y potencial terapéutico en diferentes aplicaciones. Aunque la médula ósea representa una fuente abundante de células madre mesenquimales, la recolección de estas células es invasiva con un requisito estricto de edad del donante y una mayor morbilidad en el sitio donante, debido a esto la fuente de cordón umbilical es ideal porque es producto de desecho y no pone en riesgo al paciente su para su obtención. (Henao P. ,J., et al, 2005)

Para alcanzar el objetivo general: “Diseñar un protocolo para la colecta de células madre a partir del cordón umbilical de neonatos caninos” se realizó una búsqueda en la literatura de revistas científicas registrada en la base de datos PubMed, Medline y Google Scholar, con el planteamiento previo de la pregunta de investigación la cual fue: ¿Por qué se debe disponer y aplicar protocolos que garanticen la obtención, caracterización y criopreservación del material biológico (células madre de cordón umbilical) que garanticen la ética y eficacia del procedimiento y, por ende, las esperanzas de los propietarios? Los resultados obtenidos del trabajo aportan un protocolo para la obtención de células madre a partir de cordón umbilical que requiere validación en campo para la implementación formal y técnica para un protocolo estandarizado para el aislamiento, cultivo y diferenciación de CM a partir de cordón umbilical de neonatos caninos.

Palabras claves: Células madre mesenquimales, cordón umbilical, protocolo, caracterización.

ABSTRACT

Title: Design of a protocol for the collection of stem cells from the umbilical cord of canine neonates in Bogotá-Colombia

Author: Yuliet Paola Soto Vanegas

Description:

Stem cells are undifferentiated, immature, self-renewing, and capable of generating one or more types of differentiated cells. These cells can divide indefinitely while always maintaining a stable population of stem cells and differentiate into different types of specialized cells of an adult organism. There are several sources of stem cells, such as umbilical cord blood, bone marrow, peripheral blood, skin, teeth, placenta, embryos, etc. (Evans and Kaufman 1981, Das et al 2008).

In Colombia they work with stem cells, however, even in veterinary medicine there is no established protocol that is ideal, offering security for its subsequent use since, in the last 20 years, stem cells have received attention from researchers both in human and veterinary medicine for its functional properties and therapeutic potential in different applications. Although bone marrow represents an abundant source of mesenchymal stem cells, the collection of these cells is invasive with a strict donor age requirement and increased donor site morbidity, due to this the umbilical cord source is ideal because it is the product waste and does not put the patient at risk for its collection. (Henao P., J., et al, 2005)

To achieve the general objective: "Design a protocol for the collection of stem cells from the umbilical cord of canine neonates", a search was carried out in the literature of scientific journals registered in the PubMed, Medline and Google Scholar databases, with the aim of prior approach to the research question, which was: Why should protocols be arranged and applied to guarantee the collection, characterization and cryopreservation of biological material (umbilical cord stem cells) that guarantee the ethics and efficacy of the procedure and, therefore, , the hopes of the owners? The results obtained from the work provide a protocol for obtaining stem cells from the umbilical cord that requires field validation for the formal and technical implementation of a standardized protocol for the isolation, culture and differentiation of BC from the umbilical cord of neonates. canines.

Keywords: Mesenchymal stem cells, umbilical cord, protocol, characterization.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen

Lista de figuras

Lista de tablas

Abreviaturas

Introducción

1. Capítulo 1

1.1. Planteamiento del problema

2. Capítulo 2

2.1. Justificación

3. Capítulo 3

3.1. Objetivos

4. Capítulo 4

4.1 Estado del arte

5. Capítulo 5

5.1. Marco teórico

5.1.1 Células madre

5.1.2 Células madre mesenquimales

5.1.3 Cordón umbilical

5.1.4 Células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical

5.1.5 Células madre hematopoyéticas

6. Capítulo 6

6.1 Metodología

6.1.1 Consentimiento informado

6.1.2. Recolección y transporte de la Sangre de Cordón Umbilical Canina (SCU)

6.1.3. Aislamiento

6.1.4. Laboratorio clínico

6.1.5. Exámenes de tamizaje

6.1.6. Cultivo

6.1.7. Caracterización y cuantificación de células sanguíneas de SCU

6.1.8. Almacenamiento y criopreservación

6.1.9. Descongelamiento

6.2. Selección

6.2.1. Seguimiento y monitoreo

7. Capítulo 7

7.1 Resultados

8. Capítulo 8

8.1 Discusión

9. Capítulo 9

9.1 Conclusión y recomendaciones

10. Referencias Bibliográficas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cordón umbilical canino

Figura 2: Cordón umbilical canino

Figura 3: Procesamiento de la muestra

ABREVIATURAS

- **CMM:** Células Madre Mesenquimales
- **CMH:** Células Madre Hematopoyéticas
- **MO:** Médula Ósea
- **CM:** Células Madre
- **SCU:** Sangre del Cordón Umbilical
- **CMA:** Células Madre Adulta
- **CME:** Células Madre Embrionarias
- **CMH:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- **CMP:** Células Madre Pluripotentes
- **CMEh:** Célula Madre Embrionaria humana
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonia
- **UFC-CMM:** Unidades Formadoras de Colonia de Células Madre Mesenquimales
- **CME:** Células madre embrionarias
- **VCM:** Volumen Corpuscular Media
- **HCM:** Hemoglobina Corpuscular Media
- **CHCM:** Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
- **CMEP:** Células madre embrionarias muy pequeñas
- **CMTN:** Células madre de transferencia nuclear
- **CMR:** Células madre reprogramadas
- **PSB:** Phosphate Buffered Saline - Tampón Fosfato Salino

INTRODUCCIÓN

Las células madre son las células "maestras" del cuerpo que se renuevan. Cada nueva célula tiene la posibilidad de seguir siendo una célula madre o convertirse en otro tipo de célula con una función más especializada y específica, como una célula muscular, un glóbulo rojo o una célula nerviosa. Estas células madre tienen una gran responsabilidad la cual es la reparación del cuerpo. Tienen el potencial de proporcionar células y tejidos, y pueden salvar la vida del individuo en muchas condiciones patológicas. Vieira et al. 2010; Martinello et al. 2011; Reich et al. 2012; Calloni et al. 2014).

Las CM del cordón umbilical canino además de venir de una fuente descartable, poseen características tales como amplia pluripotencialidad, tolerancia en trasplantes alogénicos, no tumorigenicidad y prolongada capacidad de diferenciación. Hay evidencia que sugiere que las CMM provenientes de la gelatina de Wharton, son efectivas en la recuperación estructural y funcional de varios órganos y/o tejidos dañados como la piel, miocardio, hígado y hueso, entre otros. (Rodríguez-Pardo, n.d.)

Cuando se realiza una administración o trasplante de CMM, ya sea por vía sistémica o local, se denomina trasplante autólogo si las células proceden del propio paciente (al que se le extrajeron previamente). Si el donante es otro sujeto de la misma especie, el trasplante es heterólogo o alogénico. Las células madre de mayor uso clínico son las células madre adultas, con las que se evita la destrucción de embriones animales reduciendo inconvenientes (problemas éticos y legales) para los investigadores, además del hecho de que los estudios con estas células tienen un mayor avance en comparación a las demás. A diferencia de las células madre embrionarias que tienen tendencia a la proliferación excesiva y a la generación de tumores (cuando son obtenidas de teratomas embrionarios), las células madre adultas no generan este tipo de problemas y nuevas investigaciones demuestran que tienen la misma plasticidad de las células madre embrionarias, lo cual es de gran importancia debido a que el factor de diferenciación celular es clave en los tratamientos médicos. (Menon et al., 2019)

El cordón umbilical brinda una gran variedad por volumen de células madre en las que se incluyen las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales, donde están presentes las células de Wharton y células Huvec y se ha identificado como una fuente alternativa ideal en términos de facilidad de acceso y reducción de la morbilidad, son más flexibles y pluripotentes que las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea.

Otra de las ventajas del cordón umbilical como fuente de células madre se debe a que permite el aislamiento rápido inicial de un gran número de células, eliminando la necesidad de varios subcultivos o pases evitando por tanto el daño potencial epigenético. (Riaño G et al., 2007) Las CMM se han aislado con éxito de especies veterinarias que incluyen: Cerdos, ganado bovino, cabras, caballos y caninos. La literatura revela que la eficiencia de aislamiento y expansión de CF-CMM difiere entre especies y laboratorios.

El tipo de investigación del trabajo de grado es de tipo descriptiva consecuentemente se realizó una búsqueda en la literatura de revistas científicas registrada en la base de datos

PubMed, Medline y Google Scholar y los criterios de selección de artículos fue sin restricción en idioma, periodo de publicación y tipo de estudio por lo tanto se aplicaron las estrategias de búsqueda en la base de datos de PubMed como lo son las palabras claves, se excluyeron todos aquellos artículos que no se ajustaran a las temáticas a desarrollar.

En cualquier caso, en la actualidad la oferta comercial existe y cualquier clínico veterinario puede ofrecer a sus pacientes un tratamiento con CM como alternativa cuando las terapias convencionales no son eficaces. No obstante, además de las esenciales garantías de bioseguridad, es necesario conocer protocolos que garanticen la obtención, caracterización y criopreservación del material biológico (CM) que garanticen la ética y eficacia del procedimiento. Los resultados obtenidos del trabajo aportan finalmente una propuesta que requiere validación en campo para su implementación formal y técnica de un protocolo estandarizado para el aislamiento, cultivo y diferenciación de CM de SCU de neonatos caninos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Por qué se debe disponer y aplicar protocolos que garanticen la obtención, caracterización y criopreservación del material biológico (células madre de cordón umbilical) que garanticen la ética, eficacia del procedimiento y, por ende, las esperanzas de los propietarios?

Existe una importante necesidad en la clínica veterinaria de disponer de terapias más eficaces para diferentes enfermedades que padecen los caninos y que pueden ser solucionadas con células madre, que existen en todos los tejidos animales y su representación central en la homeostasis y reparación natural de los mismos, la investigación biomédica ha dirigido un importante foco de atención hacia su potencial terapéutico.

En los últimos años se ha variado en gran manera el tipo de enfoque que se le dio en algún momento a las CM; estas han pasado de ser sólo una posibilidad lejana de tratamiento a convertirse en una alternativa real para el manejo de varias patologías dentro de las cuales destacan las de índole autoinmune, hematológicas y leucemias. La obtención de estas no debe ser motivo de controversia en nuestro país, ya que por métodos que no involucran embriones, es posible recolectarlas de fuentes particulares y accesibles como lo es el cordón umbilical, médula ósea y tejido adiposo (Ringe J., Kaps C. n.d.)

En medicina veterinaria, debido en parte a la laxitud de la legislación en este campo, la terapia celular ha logrado mucha más difusión clínica como alternativa terapéutica usando las CM indiscriminadamente sin tener la garantía de que esas células tengan un correcto protocolo de caracterización y criopreservación para la eficacia del procedimiento. (Volk SW, Theoret C.-2013;21: 382-394).

La práctica médica actual, incluyendo la veterinaria, se apoya en protocolos terapéuticos basados en evidencia científica. Sin embargo, en el caso de terapia con células madre es importante la ejecución de estudios de protocolos debido a que hay muchos factores que pueden afectar el resultado como por ejemplo contaminación de los cultivos celulares con microbios, en bancos de células madre se realizan pruebas de contaminación viral con regularidad, pero estas pruebas no son una práctica común para los laboratorios de investigación individuales lo que conlleva a que los tratamientos sean poco efectivos o nulos. (Volk SW, Theoret C. 2016;34:1709-29).

En cualquier caso, en la actualidad la oferta comercial existe y cualquier clínico veterinario puede ofrecer a sus pacientes un tratamiento con CM como alternativa cuando las terapias convencionales no son eficaces. No obstante, además de las esenciales garantías de bioseguridad, es necesario conocer ¿Por qué se debe disponer y aplicar protocolos que garanticen la obtención, caracterización y criopreservación del material biológico (células madre) que garanticen la ética y eficacia del procedimiento y, por ende, las esperanzas de vida de los animales de compañía?

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

El trasplante de CM obtenidas de médula ósea se ha convertido en el tratamiento de elección para diferentes desórdenes patológicos en medicina humana; no obstante, en la práctica médica veterinaria en Colombia apenas es un procedimiento que empieza a tomar relevancia. Sin embargo, la obtención de CM a partir de MO presenta dificultades, que pueden mejorarse con el uso de sangre del cordón umbilical, fuente importante de CM de rápida disponibilidad, fácil obtención, inofensivo para el donante, alta plasticidad, menor restricción de histocompatibilidad, mínimo rechazo y menor transmisión de enfermedades infecciosas. (Volk SW, Theoret C. 2016;34:1709-29).

El cordón umbilical brinda una gran variedad por volumen de células madre en las que se incluyen las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales, como las células de Wharton y células Huvec, se han identificado como una fuente alternativa ideal en términos de fácil de acceso y reducción de la morbilidad, son más flexibles y pluripotentes que las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. Otra de las ventajas del cordón umbilical como fuente de células madre se debe a que permite el aislamiento rápido inicial de un gran número de células, evitando la necesidad de varios subcultivos o pases evitando por tanto el daño potencial epigenético. Además, poseen potenciales de expansión y proliferación más altos que las de médula ósea. (Riaño G et al., 2007)

Un excelente protocolo de células madre es realmente necesario para optimizar y estandarizar tal procedimiento, tras la colecta de las células madre de cordón umbilical de caninos. Lo ideal es que en laboratorio se realizan pruebas de contaminación viral con regularidad en laboratorios de investigación individuales. La tipificación previa, y su correcto protocolo de criopreservación permitirá donaciones a caninos no relacionados, pero compatibles. La carencia de redes de donación de médula ósea de caninos en el país y la gran cantidad de nacimientos anuales, generan la necesidad y oportunidad de un protocolo para la colecta de SCU para uso veterinario, inicialmente canino con la posibilidad de incluir otras especies a mediano plazo.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Diseñar un protocolo para la colecta de células madre del cordón umbilical de neonatos caninos

2. Objetivos específicos

- Elaborar un protocolo de selección, seguimiento y monitoreo a las madres gestantes, evaluando la nutrición, número de cachorros y preñez para programar el parto.
- Realizar protocolo de estudio clínico a las madres gestantes de enfermedades virales, transmitidas verticalmente al feto que impidan tener células madre del cordón umbilical de buena calidad.
- Desarrollar un protocolo para el aislamiento, transporte, caracterización, congelamiento y descongelamiento de células madre del cordón umbilical.

CAPÍTULO 4

ESTADO DEL ARTE

Las primeras células madre fueron descritas por los Dres. James A. Till y Ernest A. McCulloch en la Universidad de Toronto en Canadá en 1961. Descubrieron que las células madre derivadas de células de la médula ósea de ratón tenían la capacidad de diferenciarse en una variedad de tipos de células y, por lo tanto, se denominaron células madre pluripotentes (CMP). Varias décadas más tarde, en 1996, Keith Campbell, Ian Wilmut y sus colegas del Instituto Roslin de la Universidad de Edimburgo en Escocia clonaron a la oveja Dolly, lo que demostró la validez de la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS). Luego, en 1998, las primeras células madre embrionarias humanas (CMEh) fueron aisladas por James Thomson en los EE. UU. En 2012 Shinya Yamanaka (Universidad de Kyoto, Japón e Institutos Gladstone, EE. UU.) y John Gurdon (Instituto Gurdon, Cambridge, Reino Unido) fueron co-receptores del Premio Nobel de Fisiología o Medicina por su descubrimiento de que las células maduras podrían reprogramarse en un estado pluripotente. Hasta la fecha, se han propuesto cinco categorías básicas de células madre tras la revisión sistemática de la investigación con células madre:

- Células madre embrionarias (CME)
- Células madre embrionarias muy pequeñas (CMEP)
- Células madre de transferencia nuclear (CMTN)
- Células madre reprogramadas (CMR)
- Células madre adultas (CMA)

Solo se han utilizado CMTN para generar un organismo completo: Se cultivaron monos a partir de CMTM en China en 2018. Por otro lado, CME, CM y las que nos compete para el protocolo de las CMA donde se han utilizado para generar tejidos y órganos. En los últimos años, y especialmente en la última década, la investigación con células madre se ha convertido en un campo emocionante y prometedor. Las células madre, especialmente las CME y las CM, han mostrado una gran promesa de aplicación en cuatro campos principales:

- Medicina regenerativa y de trasplantes
- Modelado de enfermedades
- Cribado de descubrimiento de fármacos
- Biología del desarrollo humano

Por lo tanto, la evolución de la medicina regenerativa continúa, desde las primeras descripciones tempranas de las células madre hasta sus aplicaciones clínicas en expansión en la actualidad. Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G. (2020).

Uno de los primeros modelos experimentales empleados para conocer la interacción entre las poblaciones celulares de la médula ósea, fue el canino; para lo cual utilizaron células madre derivadas de médula ósea adherentes a superficies plásticas, formadoras de colonias y CD34-, cultivadas con factores inductores de hematopoyesis. A los 14 días de cultivo, las células cambian su fenotipo a CD34+ (marcador típico de linaje hematopoyético), conservando aún su característica de adherencia. Luego fueron inoculadas de forma autóloga por vía hematogena al perro, previamente sometido a irradiación total. Transcurridos 23 días el

organismo del animal recuperó el conteo normal de células de la sangre demostrando así la posibilidad de reponer poblaciones celulares diferentes. (Huss et al., 2000)

El uso de SCU como fuente de CMH trasplantables y progenitoras, fue sugerido por Hal Broxmeyer en una reunión privada con el difunto Edward A. Boyse y Judith Bard en 1982. Boyse sintió que descartar la SCU después del nacimiento de un bebé es un desperdicio. Broxmeyer creía que la SCU descartada podría usarse mejor, no como sugirió Boyse como fuente de células maduras para transfusión, sino como fuente de CMH. Esta reunión condujo a la formación de Biocyte Corporation, una empresa SCU fundada por Boyse, Bard, Lewis Thomas, Broxmeyer, Harvey Cantor, Rodman Rockefeller y George Strong. (Rodríguez Linárez, J. 2017).

La SCU nunca antes se había utilizado en humanos, pero se había demostrado que las células de MO criopreservadas eran seguras y eficaces. La SCU se consideraba un producto de desecho, aunque ahora está regulado como un producto terapéutico en la mayoría de los países. El primer receptor de un trasplante de sangre de cordón umbilical fue un paciente con anemia de Fanconi que recibió una unidad de sangre de cordón umbilical de su hermano idéntico al antígeno leucocitario humano (HLA) en octubre de 1988 en New York. El paciente se injertó completamente con células del donante y ha permanecido en remisión hematológica completa durante más de 20 años, sin enfermedad de injerto contra huésped.

Se reportó por primera vez el aislamiento de células fibroblastoides a partir de la gelatina de Wharton del cordón umbilical en 1991. Varios estudios han propuesto que las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton poseen propiedades únicas frente a otras CMM. Las CMM se han aislado con éxito de especies veterinarias que incluyen: Cerdos, ganado bovino, cabras, caballos y caninos. La literatura revela que la eficiencia de aislamiento y expansión de CF-CMM difiere entre especies y laboratorios. La falta de reproducibilidad es una fuente de preocupación en el campo de las MSC. (T. Nagamura-Inoue-2014).

CAPÍTULO 5

MARCO TEÓRICO

1. Células Madre (CM)

Las CM se pueden clasificar de acuerdo con su potencialidad, en: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. También, se puede clasificar de acuerdo al tejido de donde se pueden obtener, es decir de acuerdo a su origen, en CME proveniente del embrión y CMA o postnatales procedente de adultos y cachorros. Dentro de las CMA se engloban células con potencialidad variable pudiendo distinguir 2 subtipos: Las CMA inmaduras o fetales, proveniente de los tejidos fetales antes del nacimiento, y las CMA maduras, que proceden de los órganos o tejidos de un individuo tras el nacimiento. Las multipotentes o también designadas pluripotentes pueden originar células de varios tipos de tejidos de una de las capas embrionarias: CMH y CMM. (Gonzales Becerril, L. 2019)

2. Células Madre Mesenquimales (CMM)

Las CMM se originan en la capa que rodea a la aorta, en una región denominada aorta-gónada-mesonefros. Esta capa se origina a partir de la hoja germinativa mesodérmica, cuando los tejidos y órganos específicos del embrión se encuentran en formación estas células cuentan con un fácil aislamiento a partir de la mayoría de los órganos y tejidos adultos mesodérmicos con capacidad para diferenciarse hacia múltiples tipos celulares en determinadas condiciones de cultivo; alta capacidad proliferativa y de autorrenovación, lo que permite obtener la cantidad de células necesarias para su aplicación clínica y propiedades regenerativas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras en el lugar de la lesión, que mejorar a la función de los órganos y tejidos dañados, así como su reparación estructural. (Talavera et al., n.d.)

Finalmente, las células deben poseer la capacidad de dar origen a osteoblastos, condroblastos y adipocitos en condiciones estándar in vitro. Las fuentes de las CMM en un principio se pensaba que pocos tejidos poseen células troncales: sangre, epitelio del intestino, huesos y piel; sin embargo, actualmente se sabe que realmente están presentes en prácticamente cualquier tejido del cuerpo. Sorprendentemente las células troncales mesenquimales pueden ser encontradas y, de hecho, aisladas de médula ósea, tejido adiposo, tejidos de membrana sinovial, pulpa dental, tendón, gelatina de Wharton del cordón umbilical y SCU.

Cuando se realiza una administración o trasplante de CMM, ya sea por vía sistémica o local, se denomina trasplante autólogo si las células proceden del propio paciente (al que se le extrajeron previamente). Si el donante es otro sujeto de la misma especie, el trasplante es heterólogo o alogénico.

La SCU posee mayor potencial replicativo in vitro y una mayor actividad de la telomerasa. El hecho de que las células derivadas de la sangre del cordón posean una actividad hematopoyética tan potente se puede atribuir al hecho de que la sangre del cordón se

encuentra en una etapa de desarrollo mucho más inmadura en comparación a las CM derivadas del adulto. (Madriz de Haan, 2010)

Se demostró que la concentración de esta fracción progenitora endotelial encontrada en las células de cordón CD34 + es casi diez veces mayor en comparación a las células encontradas en la médula ósea. Otro aspecto importante de las células mesenquimales es su capacidad antiinflamatoria y antimoduladora; por ejemplo, ellas secretan de forma constitutiva citoquinas como IL-10 y FNT, manteniendo a pesar de esto su capacidad para presentar antígenos a las células T, sugiriendo que ellas pueden actuar como células presentadoras de antígenos tolerógenas. La sangre de cordón fue capaz de expandirse unas 20 veces, mientras que las derivadas de tejido adiposo se expandieron unas 8 veces y las derivadas de médula ósea lo hicieron unas 5 veces. (Madriz de Haan, 2010)

3. Cordón Umbilical

El cordón umbilical es un anexo fetal que une al feto con la placenta y dentro del cual se encuentran los vasos sanguíneos umbilicales. Estos vasos son responsables del intercambio de sangre entre los organismos fetal y materno. El cordón umbilical del perro se divide en 3 secciones: Yuxtafetal, tercio intermedio y yuxtaplacentaria. En la sección yuxtafetal hay 2 arterias umbilicales y 1 vena umbilical. En el tercio intermedio se ramifican las arterias umbilicales craneal y caudal, y se encuentran las confluencias de las raíces venosas craneales y caudales. En el corte yuxtaplacentario se observan 4 ramas arteriales y 4 radículas venosas, llegando a la placenta y diseminándose por los lados izquierdo y derecho.

La sangre uterina se separa de la sangre fetal por la barrera placentaria, que comprende el epitelio coriónico y el endotelio fetal. El cordón umbilical es una fuente potencial e importante de células madre hematopoyéticas para la reconstitución de la médula ósea, ya que su costo es bajo y es fácil de obtener. Además, es un producto de embarazo que suele desecharse. (Nakage, A., et al, 2005)

- **Células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical**

La gelatina de Wharton del cordón umbilical es una matriz de tejido conectivo mucoso, donde se encuentran incrustadas venas y arterias que atraviesan el cordón y se encuentra rodeada por epitelio amniótico. Está compuesta por células estromales, fibras de colágeno, proteoglicanos y, sobre todo, por ácido hialurónico. Se reportó por primera vez el aislamiento de células fibroblastoides a partir de la gelatina de Wharton del cordón umbilical en 1991. Varios estudios han propuesto que las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton poseen propiedades únicas frente a otras CMM. (T. Nagamura-Inoue-2014).

Se sabe que tienen características intermedias entre células embrionarias y de adulto, lo cual se atribuye a su origen en el cordón umbilical, pues, se ha sugerido que estas células son CMM primitivas que migran desde una región del embrión hacia la placenta y luego, al

dirigirse de vuelta hacia el feto, quedan atrapadas en la gelatina de Wharton. C. (Fong, K. et al, 2014.)

Las CM de la SCU presentan características muy prometedoras que pueden ser consideradas para su uso clínico autólogo o alogénico ya que poseer un potencial de expansión multiplicación de la población original de células más amplio y rápido, al ser comparadas con otras células mesenquimales; lo cual es explicado de cierta forma, por su elevada expresión de actividad telomerasa. La extracción de estas células es indolora y la controversia ética sobre su fuente es mínima. Además, estas células presentan una plasticidad más amplia, pudiendo diferenciarse incluso en hepatocitos, células pancreáticas y células neuronales.

- **Células madre hematopoyéticas**

CMHs están encargadas de producir: Glóbulos rojos que transportan oxígeno a los tejidos, glóbulos blancos que combaten las infecciones en el organismo y se ocupan de la vigilancia inmunológica y las plaquetas que participan en el proceso de coagulación de sangre. Las CMHs poseen tres características básicas: primero, son multipotentes, es decir, tienen el potencial de generar los linajes sanguíneos: la línea roja que produce los eritrocitos, la línea blanca que produce células de diferentes tipos como el de tipo linfoide: linfocitos B y T, y el tipo mieloide: basófilos/mastocitos, eosinófilos, neutrófilos/ granulocitos, y monocitos/macrófagos, también genera la línea trombocítica que da origen a megacariocitos/plaquetas. Segundo, las CMHs tienen un alto potencial proliferativo, es decir que son capaces de dividirse y producir un gran número de células maduras durante la vida del individuo.

Tercero, las CMHs tienen alta capacidad de generación de nuevas células madre idénticas, manteniendo una división de tipo simétrico, capacidad conocida como autorenovación.

La selección y aislamiento de células utilizando los marcadores de linaje puede proporcionar un enriquecimiento típico de subpoblaciones de CMHs de 20 a 500 veces en una muestra, dependiendo de la combinación de marcadores usados. A continuación, se citan algunos ejemplos de marcadores de diferentes linajes: del linaje eritroide la glicoforina A, el antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR) y el TER-119; del linfoide CD45, CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y del mieloide CD14, CD56 y CD33 (22). Las CMHs y otras subpoblaciones de células madre se pueden obtener de diversas fuentes como por ejemplo de la médula ósea, de la sangre periférica y de la SCU. Para identificar, aislar y cuantificar la población de CMHs con frecuencia se utiliza el marcador de linaje conocido como antígeno CD34, el cual se ha identificado en la mayoría de células iniciadoras de cultivo de largo término (CI- CLT), en gran parte de las células formadoras de colonias (CFC) y en células progenitoras linfoides y mieloides. (Mera, C., Roa, A., Ramírez, S.-2007)

CAPÍTULO 6

METODOLOGÍA

- **Tipo de estudio:** Investigación de tipo descriptiva

Para alcanzar el **objetivo general:** “Diseñar un protocolo para la colecta de células madre a partir del cordón umbilical de neonatos caninos” se realizó una búsqueda de literatura científica sobre el tema de los últimos diez años.

1. Se realizó una búsqueda en la literatura de revistas científicas registrada en la base de datos PubMed, Medline y Google Scholar con el planteamiento previo de la pregunta de investigación la cual fue: ¿Por qué diseñar e implementar un protocolo para la colecta de células madre a partir del cordón umbilical de neonatos caninos?
2. Criterios de selección de artículos: Se seleccionarán artículos sin restricción en idioma, periodo de publicación y tipo de estudio.
3. Se aplicaron las estrategias de búsqueda en la base de datos de PubMed
4. Se excluyeron todos aquellos artículos que no se ajustaran a las temáticas a desarrollar.

En cuanto al primer objetivo específico que es “Elaborar un protocolo de selección, seguimiento y monitoreo a las madres gestantes, evaluando la nutrición, número de cachorros y preñez para programar el parto” para lo que es necesario que antes de cualquier intervención con el paciente que el tutor haya aprobado, entendido y firmado un consentimiento informado.

El proceso comienza cuando el tutor de la madre gestante ha firmado el consentimiento informado para la donación voluntaria de SCU. Una vez firmado se comienza con el procedimiento. (Anexo consentimiento informado en los resultados (Capítulo 7)

- **Selección**

El proceso de selección de donantes para la colecta de sangre del cordón umbilical se lleva a cabo cuidadosamente y, por lo general, se recopilan antecedentes familiares para minimizar el riesgo potencial de transmitir trastornos hereditarios no reconocidos que podrían afectar al receptor. La sangre del cordón umbilical no se puede recolectar si existen enfermedades hereditarias conocidas que involucran específicamente la hematopoyesis en la familia, si se identifican discapacidades o enfermedades graves en el feto de la donante antes del nacimiento. Los criterios de exclusión adicionales incluyen enfermedades infecciosas en la madre.

- **Criterios de inclusión**

1. Pacientes hembras de cualquier raza que estén en preñez, que asisten al servicio de Ginecología con previa firma del consentimiento informado con datos reproductivos previos
2. Ausencia de antecedentes patológicos heredables y físicos de la gestante, tales como defectos estructurales del útero, abortos o preñez de alto riesgo según clasificación del Ginecoobstetra, entre otras.
3. Tutores que garanticen un seguimiento mínimo durante el cual se recolecta la información considerada en el protocolo (antecedentes, evaluación de la gineco obstetra o médico veterinario a cargo, entre otros.)

- **Criterios de exclusión**

1. Hembras preñadas con resultados positivos para enfermedades infecciosas, (Distemper, leptospira, parvovirus, brucella, calicivirus etc.), y/o antecedentes de enfermedades relacionadas con la gestación o enfermedades congénitas en embarazos previos o en el actual.
2. Voluntad expresa de la no-participación en el estudio.
3. Volumen insuficiente de la muestra, menor a 40 ml o cantidad menor a 400 millones de células. Recuento y el volumen de células son parámetros clave para la selección y elegibilidad de las unidades de sangre de cordón umbilical para el trasplante. Por lo general, se requiere un mínimo de $2,5 \times 10^7$ células nucleadas totales por kilogramo de peso del receptor. La unidad de sangre de cordón promedio contiene aproximadamente 1×10^9 células nucleadas totales. (Seo MS, Et al, 2009)

- **Seguimiento y monitoreo**

Hacer seguimiento y monitoreo a las madres gestantes, evaluando la nutrición, número de cachorros y preñez para programar el parto durante el embarazo de las perras que está entre 58 y 68 días.

Las ayudas diagnósticas para el monitoreo y como resultado programación del parto son:

- **Ecografía:** Donde podemos diagnosticar gestación, pero no es un método exacto para determinar el número de fetos en la perra. Nos permite detectar algunas patologías fetales y realizar medidas fetales como el diámetro biparietal craneal o el diámetro externo de la cavidad coriónica que nos va a decir con bastante exactitud los días que quedan para el parto.

Aproximadamente sobre el día 21 podemos detectar la vesícula embrionaria, hasta el día 23 y 25 no podremos detectar latido cardíaco. Los movimientos fetales son detectables a partir del día 30 a 39 de gestación y el intestino entre los días 57 y 63 después del pico de LH.

- **Radiografía:** A partir del día 21 desde la ovulación podemos detectar signos de aumento de tamaño del útero, pero hasta el día 43-46 después del pico de LH no se detectan radiológicamente la columna vertebral y el cráneo de los fetos.

Los dientes podrán observarse en las radiografías a partir del día 58 a 63 del pico de LH aproximadamente entre 3 a 8 días antes del parto.

La radiología nos aporta datos importantes previos al parto, como pueden ser la posición de los fetos, la muerte fetal o las presentaciones distócicas que nos va a permitir decidir en muchos casos la conveniencia para realizar cesárea.

Con la radiografía abdominal se sabe el número de cachorros contando los cráneos o columnas.

- **Nutrición**

Una inadecuada condición corporal ya sea por exceso o deficiencia afecta negativamente la gestación, así como una alimentación con ausencia o exceso de determinados nutrientes. Según la AAFCO (Association of American Feed Control Officials) se recomiendan dietas con un: 29-32% de proteína de origen animal además la dieta debe contener al menos un 18% de grasa, controlando el perfil de ácidos grasos omega 3 y omega 6. Finalmente, los hidratos de carbono deben encontrarse entre el 20 y 30% de la dieta.

Tener en cuenta peso y necesidades calóricas que aumentan a lo largo del embarazo especialmente durante el último tercio de la gestación. Las necesidades calóricas pueden incrementarse en un 50% y el peso corporal aumenta de manera constante a partir de la 4ta a 7ma semana y aunque las 2 últimas semanas decaiga el apetito el peso seguirá incrementándose por el crecimiento fetal y el desarrollo mamario.

- **Cuidados de hembras gestantes**

El tutor controla la actividad, apetito, forma física y peso de la hembra evaluando los posibles cambios para comprobar si son fisiológicos de lo contrario se debe llevar al médico veterinario para evaluar posibles patologías. Se deben realizar controles clínicos rutinarios.

Para alcanzar el segundo objetivo el cual es: “Realizar un protocolo de estudio clínico a las madres preñadas de enfermedades virales, transmitidas verticalmente al feto que impidan tener células madre de buena calidad”

▪ **Exámenes clínicos**

Se realizan a las madres preñadas exámenes serológicos para enfermedades infecciosas y PCR de alta resolución, se debe tener ya firmado, el consentimiento informado por parte del tutor, antes de realizar pruebas exhaustivas de enfermedades infecciosas para lograr completar la verificación donde estén negativas a patologías que afecten la viabilidad del feto y posterior a ello de las células madre antes de recolectar y almacenar la sangre del cordón umbilical en el laboratorio clínico para futuros trasplantes y así reducir el riesgo de infección post trasplante además que es indispensable para la viabilidad celular y correcta diferenciación, hacer estos exámenes específicos para agentes infecciosos.

Tabla 1 : Enfermedades infecciosas que la madre puede transmitir verticalmente al feto.

Brucelosis canina	Distemper canino
Tumor Venéreo Transmisible	Parvovirus canino - Tipo I
Calicivirus canino	Leptospirosis
Herpesvirus canino	Toxoplasma

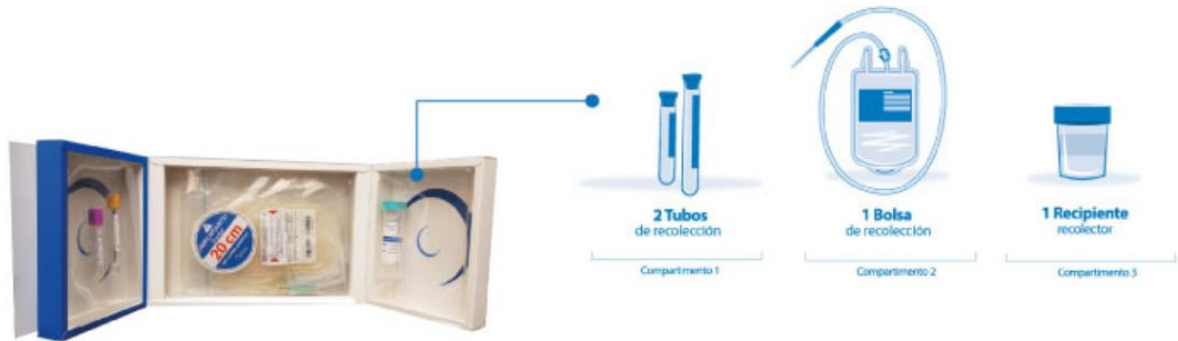
Finalmente llegamos al **tercer objetivo específico** que trata de “Desarrollar un protocolo para el aislamiento, transporte, caracterización, congelamiento y descongelamiento de células madre del cordón umbilical”.

1. Recolección y transporte de la sangre y tejido del cordón umbilical canino

La recolección de sangre del cordón umbilical, en general, no debe afectar el parto del cachorro y solo debe ser realizada por personal capacitado (médicos veterinarios y obstetras) que tenga conocimientos sobre la recolección, el procesamiento y el manejo de la sangre y tejido del cordón umbilical, el transporte y el almacenamiento.

Para lo que se emplea un kit para la recolección de SCU y para el cordón umbilical, este estuche consta de:

- **Materiales:**
- Bolsa con EDTA y aguja de flebotomía: Set Cord Blood Collection Cat. 791-01 y Transfer/Freezing Bag Cat. 791-02 de la casa comercial PALL
- Tubos de muestra para la sangre de cachorros y madre
- Frasco estéril



Wright, A., Snyder, LJ, Knights, K., He, H., Springer, NL, Lillich, J. y Weiss, M. (2020)

▪ **Pasos para la recolección de la muestra de sangre del cordón umbilical**

1. Después del nacimiento de los cachorros y antes de la expulsión de la placenta, un médico obstetra toma el cordón umbilical que está adjunto a la placenta donde se pinza, se limpia y desinfecta minuciosamente para evitar la contaminación con sangre materna o por agentes infecciosos. Este procedimiento no altera el curso natural del nacimiento o el período posparto, de esta manera se reduce la contaminación bacteriana y genera un mayor recuento de células CD34+, unidades formadoras de colonias (UFC), viabilidad de células nucleoides y mayor cantidad de monocitos y granulocitos. La recolección previa al alumbramiento de la placenta, provee alrededor de 40 ml a 100 ml de sangre dependiendo la raza. La modalidad de recolección *in utero*, con una sola punción de la vena umbilical, según la literatura la mejor manera es realizada por el sistema cerrado, es el mejor método para recolectar SCU de buena calidad. (Wright, A. et al, 2020)

2. Se utiliza el método de recolección por gravedad, este consiste en punzar con técnica antiséptica y bajo condiciones asépticas, la vena del cordón umbilical en la sección yuxtaplacentaria de la placenta donde al introducir el catéter se deja que la sangre drene hacia la bolsa especial de recolección estéril con EDTA como anticoagulante, luego de esto procedemos a mezclar muy suavemente sangre con anticoagulante. La bolsa será rotulada con la información del donante, en conjunto con la fecha de la recolección, los anticoagulantes usados, se pesa y se registra el volumen.

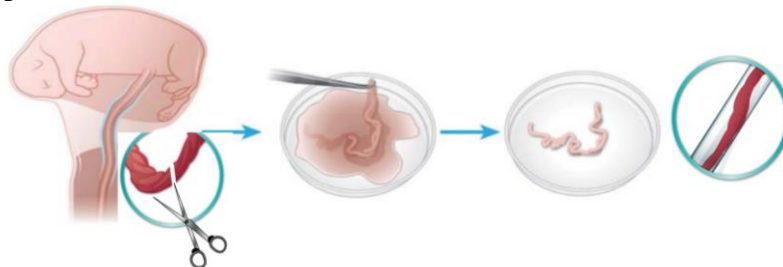


3. Se procede a tomar muestra de sangre de madre y cachorros para la realización de unos análisis exigibles: Leptospira, parvovirus, distemper, brucella canis, toxoplasmosis entre

otros anteriormente nombrados, el día del parto todo esto es enviado a laboratorio en el estuche de recolección para la obtención de la SCU las CMH finalmente.

- **Pasos para la recolección de la muestra de tejido del cordón umbilical**

1. Después del parto, se quita el cordón de cada cachorro de 5 cm a 15cm dependiendo la raza
2. Se guarda en un frasco esteril el tejido con una solución de PBS por sus siglas en inglés (Tampón Fosfato Salino)



Wright, A., Snyder, LJ, Knights, K., He, H., Springer, NL, Lillich, J. y Weiss, M. (2020)

- **Transporte al laboratorio**

1. Todo el kit de recolección donde está, la SCU, el tejido del cordón umbilical y los tubos de muestra de la sangre de la mamá y los cachorros serán trasladados, en cadena de frío y bajo condiciones de esterilidad, las condiciones de transporte y almacenamiento 4°C hasta llegar al laboratorio.

- **Laboratorio Clínico**

Al llegar a laboratorio se procesa las muestra dentro de las 24 horas siguientes a la recolección, abriendo estuche de recolección, verificando documentos, bolsa de recolección de SCU, frasco ésteril con cordón umbilical y tubos de sangre materna, determinando si se recolecto correctamente las muestras se procede a realizar desinfección externa de la bolsa de recolección con el fin de eliminar residuos y agentes patógenos.

La bolsa de recolección es pesada para estimar el volumen de sangre recolectada, luego separación celular para obtención de CMH y CMM. (Roura, S. et al, 2015)

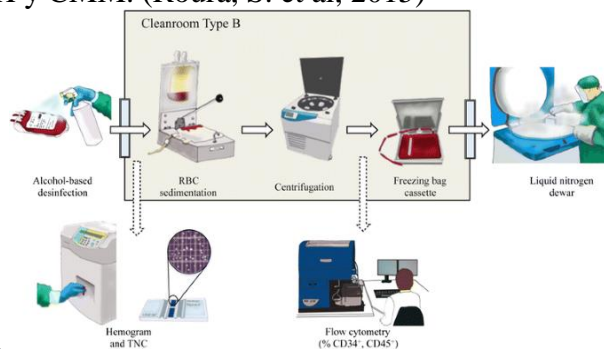


Figura 3: Procesamiento de muestra

Roura, Santiago & Pujal, Jm & Gálvez-Montón, Carolina & Bayes-Genis, Antoni. (2015)

- **Exámenes de tamizaje**

El tamizaje es realizado a la sangre de la madre para realizar la identificación del grupo sanguíneo, conteo celular, y volumen; también se realizan exámenes serológicos para las moléculas del CMH clase I y PCR de alta resolución para las moléculas del CMH clase II y exámenes clínicos para enfermedades infecciosas y así poder lograr completar la tipificación antes de recolectar y almacenar la sangre del cordón umbilical en el laboratorio clínico para futuros trasplantes. Reduciendo el riesgo de infección post trasplante que es indispensable para la viabilidad celular y correcta diferenciación, hacer los exámenes específicos para agentes infecciosos como brucella, distemper, calicivirus, parvovirus, herpes virus entre otros.

- **Recolección de células madre del cordón umbilical**

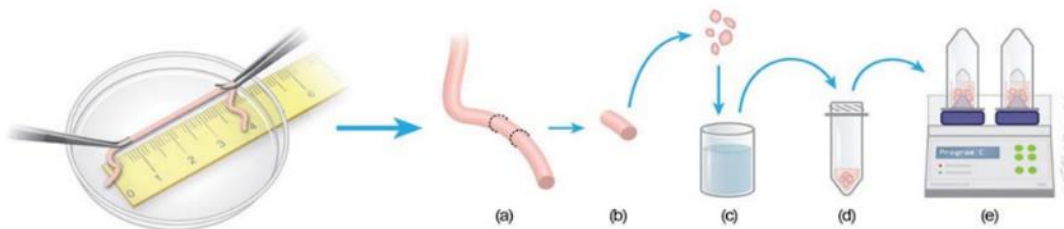
- **Obtención de células madre hematopoyéticas (CMH)**

1. Se controla que la muestra esté libre de virus y bacterias. En la sangre de la vena del cordón umbilical se cuentan las células vivas donde en una centrífuga vamos a proceder a la separación celular, descartando glóbulos rojos y plasma conservando la parte leucocitaria donde están presentes la CMH. Esto reduce el volumen de la unidad de células madre, y facilita el almacenamiento de varias unidades.



- **Obtención de células madre mesenquimales (CMM)**

Figura : Cordón umbilical canino



Wright, A., Snyder, LJ, Knights, K., He, H., Springer, NL, Lillich, J. y Weiss, M. (2020)

- La longitud del material del cordón se mide y se debe lavar el cordón con PBS.

- a. Se liga en trozos del cordón umbilical: Cortarlo transversalmente en fragmentos de 0,5 a 1 cm.
- b. Se corta brevemente el cordón umbilical en secciones más pequeñas.
- c. Se enjuagan los trozos de cordón umbilical con PBS.
- d. Se agrega una longitud fija a un tubo con enzimas: Se someten a digestión enzimática durante 3 horas a 37 °C con agitación rotatoria en presencia de combinaciones de colagenasa, hialuronidasa o tripsina, se elimina el tejido sobrante utilizando un filtro de 100 µm.
- e. El tubo se procesa usando un programa estándar donde se determina el número de células viables (Wright, A., et al, 2020)

▪ **Cultivo**

El cultivo exitoso de CM requiere la recreación del microambiente de células madre *in vivo*, o "nicho", que incluye factores de crecimiento, interacciones de célula a célula y adherencias de célula a matriz. La esterilidad juega un papel importante en el cultivo celular donde se encuentra que son extremadamente vulnerables a contaminación microbiana ya sea por agentes como bacterias y/o fúngicas donde causaría muerte celular y seguido de ello la pérdida de los cultivos completos. En la literatura son muy reiterativos recomendando encarecidamente que las células recibidas de cualquier donación sean analizadas para detectar contaminación microbiana donde el más común es *Mycoplasma* antes del uso inicial y a intervalos regulares durante el cultivo de rutina en el laboratorio.

Dado que los microbios están en todas partes en el entorno de cultivo, la práctica estricta de la técnica aséptica es esencial para prevenir la contaminación del cultivo. Se dice que en los bancos de células madre se realizan pruebas de contaminación viral con regularidad, pero estas pruebas no son una práctica común para los laboratorios de investigación individuales. (Ballen, K. et al, 2010)

La estabilidad de la línea celular se garantiza cuando las células madre pluripotentes conserven su fenotipo de células madre e incluyan la expresión de marcadores de células madre, tanto molecularmente como en forma de marcadores intracelulares o de superficie expresados y la capacidad de formar las tres capas germinales embrionarias. Recomiendan utilizar varios métodos para controlar la estabilidad de la línea celular en los cuales destaca la RT-PCR, la tinción inmunocitoquímica y la citometría de flujo siendo algunos de los métodos más comunes empleados. (Ballen, K. et al, 2010)

▪ **Citometría de flujo (CMF)**

Se usa para medir marcadores de superficie, recuento, comparación u otra caracterización de células. La citometría de flujo es una tecnología de rápido crecimiento y desarrollo que permite examinar muchas propiedades de un gran número de células en poco tiempo. Se basa en el fundamento de hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la

célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Estos parámetros están relacionados con características intrínsecas de la célula, como su tamaño y la complejidad de su núcleo y citoplasma, así como con su capacidad antigénica (inmunofenotipo). (Antonio et al., n.d.)

- Marcadores hematopoyéticos: Expresan CD34+
- Marcadores mesenquimales: Expresan CD73+, CD90+ y CD105; además, se ha postulado que CD73 desempeña un papel en la adhesión celular.

La realización de citometría de flujo Se hace en 3 etapas independientes:

- 1. Fase pre-citometría:** Preparación de los reactivos, preparación de las células, diseño del protocolo y coloración de las células con los reactivos fluorescentes.
- 2. Fase de citometría de flujo:** Involucra el procesamiento de las células marcadas y la recolección de los datos para cada una de las medidas (parámetros) realizados en cada célula individual.
- 3. Fase de análisis:** Análisis de los datos recolectados. (Antonio et al., n.d.)

- **Cultivo y diferenciación para células madre mesenquimales (CMM)**

Las células madre mesenquimales se resuspenden en (DMEM) Eagle Modificado De Dulbecco con un medio rico en L-glutamina, suero fetal bovino, penicilina, estreptomina y anfotericina B, se cultiva la suspensión en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂. Después de 2 días de cultivo, se reemplaza el medio y se observa al microscopio la presencia de células adherentes, que proliferan. Al superar la confluencia del 80 %, se trata con una solución de tripsina. Tras comprobar la viabilidad y ajustar la concentración. Se transfiere a frascos de cultivo y se cultiva de nuevo para lograr su expansión. Se analizan las células por citometría de flujo. Se debe realizar una diferenciación de trilineaje mínima las cuales son adipogénica, condrogénica y osteogénica se basa en la siembra de CMM en pocillos, el crecimiento en incubadora a 37 °C y 5% de CO₂, y la sustitución del medio dos veces por semana hasta alcanzar la confluencia. En el momento de la confluencia, se añade un medio de cultivo diferente para promover la diferenciación, adicional a ello se cubre los cultivos con gelatina para mayor proliferación. (Linero et al., 2014)

1. Diferenciación osteogénica se añade al medio: Hidrocortisona, ácido ascórbico y β-glicerofosfato.
2. Diferenciación adipogénica se añade al medio: Indametacina, dexametasona e insulina.
3. Diferenciación condrogénica se usa: Indametacina, dexametasona e insulina.

- **Cultivo y diferenciación para células madre hematopoyéticas (CMH)**

Las células madre hematopoyéticas que expresan CD34 (células CD34+) se definen por su capacidad para reponer todos los tipos de células sanguíneas y autorrenovarse. Se usará Gibco StemPro-34 SFM como medio de cultivo sin suero formulado específicamente para apoyar el cultivo de estas células madre y ofrece una expansión y diferenciación superiores de las CMH aisladas de la sangre del cordón umbilical neonatal.

- **Caracterización por citometría de flujo**

 - Evaluación morfológica
 - Detección de antígenos de superficie celular apropiados
 - Análisis detallado de la expresión de genes y proteínas
 - Prueba de actividad biológica in vitro
 - Compruebe la expresión de CMH
-
- **Almacenamiento y criopreservación**

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, debido a que el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula. Al estar congeladas a -196°C , las células pueden ser almacenadas indefinidamente. Está demostrado que las células madre de SCU congeladas por más de 10 años conservan su capacidad de reconstitución y proliferación normal.

La SCU será almacenada en bolsas criogénicas testeadas de la más alta calidad que optimizan y conservan las células a través del tiempo adicionamos agentes crioprotectores para que se puede congelar de manera efectiva, se le agrega dimetilsulfóxido al 10% como el crioconservante de elección y puede durar en líquido durante décadas, sin una degradación significativa o pérdida de potencia. Durante la crioconservación, es importante evitar la formación de cristales de hielo. Se ha demostrado que los cristales de hielo dañan las membranas celulares. Por lo tanto, debe reducirse la tendencia del agua a formar cristales de hielo por esto se usa crioprotectores para prevenir la formación de cristales de hielo, como el sulfóxido de dimetilo (DMSO) o como también se conoce dimetilsulfóxido. Los agentes crioprotectores deben poder atravesar la membrana celular y penetrar en las células sin causar citotoxicidad. Por lo general, se requiere que los agentes crioprotectores sean hipertónicos para sacar el agua de las células, lo que reduce la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares.. Se descubrió que las células se dañan principalmente por dos factores: la formación de hielo intracelular y la deshidratación celular. (Seo MS, Et al, 2009)

Se procede a la congelación a -196°C conservando las CM que posteriormente serán almacenadas en tanques, estas células pueden ser almacenadas indefinidamente. La literatura

ha demostrado que las células madre de SCU congeladas por más de 10 años conservan su capacidad de reconstitución y proliferación normal. (Wright, A., et al, 2020)

- **Descongelamiento**

Después del tiempo de almacenamiento, las muestras serán descongeladas mediante choque térmico en baño maría a 37°C por dos minutos hasta la descongelación de la unidad de sangre. Para la remoción del crioprotector, inmediatamente después de ser descongelada, cada unidad fue diluida en una solución de PBS. Para obtener las células nucleadas se llevaron a centrifugación y las células sedimentadas fueron resuspendidas en solución de lavado. Se realizó recuento y viabilidad celular en cámara de Neubauer. (Seo MS, Et al, 2009)

CAPÍTULO 7 RESULTADOS



PROTOCOLO PARA LA COLECTA DE CÉLULAS MADRE A PARTIR DEL CORDÓN UMBILICAL DE NEONATOS CANINOS

1. Selección de donantes

A. Criterios de inclusión

- Hembras de cualquier raza que estén en preñez
- Ausencia de enfermedades potencialmente transmisibles
- Ausencia de antecedentes patológicos heredables y físicos de la gestante, tales como defectos estructurales del útero, abortos o preñez de alto riesgo
- Tutores que garanticen un seguimiento mínimo durante el cual se recolecta la información considerada en el protocolo (antecedentes, evaluación de la gineco obstetra o médico veterinario a cargo, entre otros.)
- Firma del consentimiento informado (Anexo al final)

B. Criterios de exclusión

- Enfermedades hereditarias conocidas que involucran específicamente la hematopoyesis en la familia
- Discapacidades o enfermedades graves en el feto de la donante antes del nacimiento
- Hembras preñadas con resultados positivos para enfermedades infecciosas, (Distemper, leptospira, parvovirus, brucella, calicivirus etc.)
- Volumen insuficiente de la muestra, menor a 40 ml

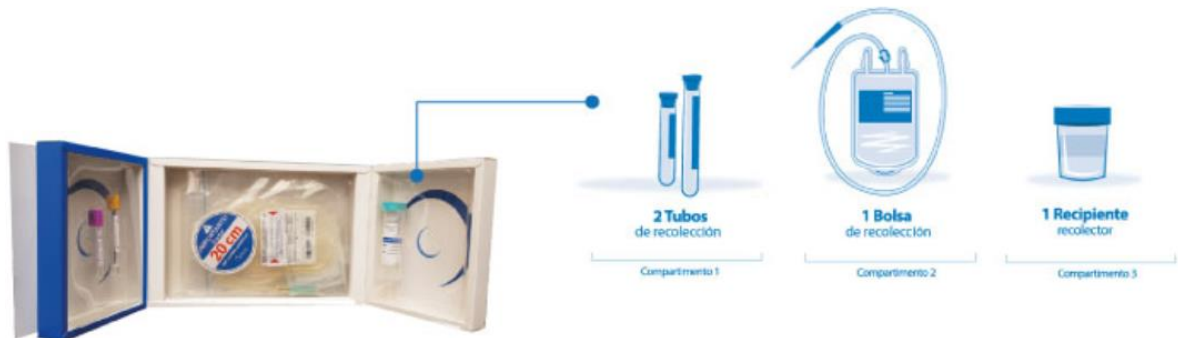
2. Exámenes clínicos

- Se realizan a las madres preñadas exámenes serológicos para enfermedades infecciosas y PCR de alta resolución.
 - Enfermedades infecciosas que la madre puede transmitir verticalmente al feto.

Brucelosis canina	Distemper canino
Tumor Venéreo Transmisible	Parvovirus canino - Tipo I
Calicivirus canino	Leptospirosis
Herpesvirus canino	Toxoplasma

3. Recolección y transporte de sangre y tejido del cordón umbilical canino

- Kit de recolección
 - A. Bolsa con anticoagulante (EDTA)
 - B. Aguja de flebotomía
 - C. Tubos de muestra
 - D. Frasco estéril
 - E. Guantes y instrumental estéril



Wright, A., Snyder, LJ, Knights, K., He, H., Springer, NL, Lillich, J. y Weiss, M. (2020)

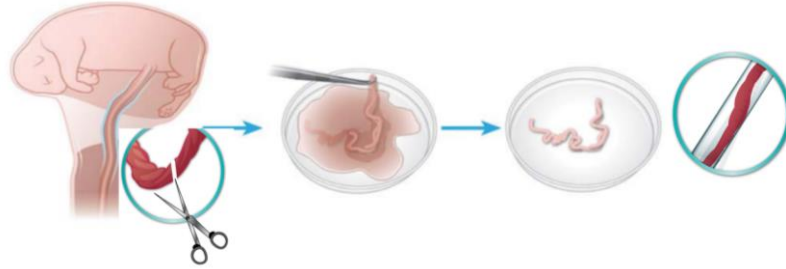
- Recolección de la muestra de sangre del cordón umbilical
 - A. Se pinza cordón umbilical, se limpia y desinfecta (Clorhexidina y yodo), dejar actuar 1 minuto
 - B. Se procede a puncionar con técnica antiséptica y bajo condiciones asépticas, la vena del cordón umbilical en la sección yuxtaplacentaria de la placenta donde al introducir el catéter se deja que la sangre drene por gravedad hacia la bolsa especial de recolección estéril con EDTA



- C. Mezclar muy suavemente sangre con anticoagulante
- D. La bolsa será rotulada con la información del donante, fecha de la recolección, anticoagulantes usados, se pesa y se registra el volumen.
- E. Toma de muestra de sangre de la madre y los cachorros

➤ Recolección de la muestra de tejido del cordón umbilical

- A. Se corta el cordón umbilical de cada cachorro, cortando de 5 cm a 15cm dependiendo la raza
- B. Se guarda en un frasco esteril el tejido con una solución de PBS



Wright, A., Snyder, LJ, Knights, K., He, H., Springer, NL, Lillich, J. y Weiss, M. (2020)

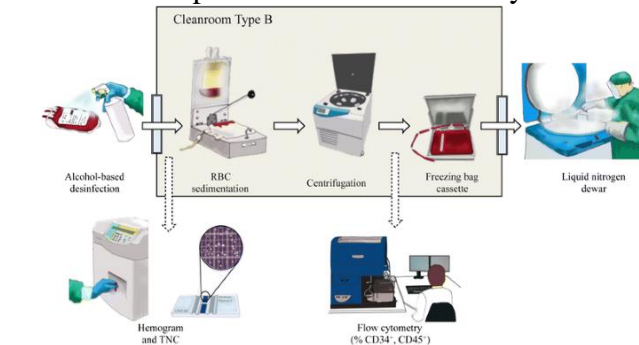
➤ Transporte al laboratorio

- A. Todo el kit de recolección será trasladado, en cadena de frío y bajo condiciones de esterilidad. Las condiciones de transporte y almacenamiento 4°C hasta llegar al laboratorio.



4. Laboratorio clínico

- A. Se abre kit de recolección, verificando documentos y muestras
- B. Desinfección externa de la bolsa de recolección con el fin de eliminar residuos y agentes patógenos
- C. Se pesa bolsa de recolección
- D. Separación celular para obtención de CMH y CMM



Roura, Santiago & Pujal, Jm & Gálvez-Montón, Carolina & Bayes-Genis, Antoni. (2015)

5. Exámenes de tamizaje

- A. Se realiza con los tubos de sangre de madre y cachorros para:
 - Identificación del grupo sanguíneo
 - Conteo y volumen celular
 - Exámenes serológicos para detectar enfermedades infecciosas

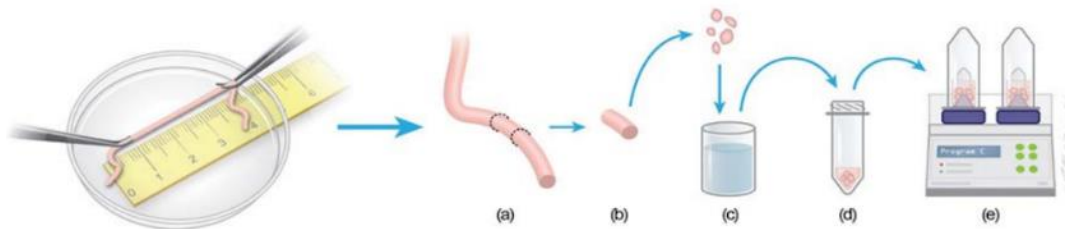
6. Recolección de células madre del cordón umbilical

➤ Obtención de células madre hematopoyéticas (CMH)

- A. Muestra libre de virus y bacterias
- B. Separación celular por medio de la centrifuga
- C. Descarte de glóbulos rojos y plasma
- D. Conservando la parte leucocitaria donde están presentes las CMH



➤ Obtención de células madre mesenquimales (CMM)



Wright, A., Snyder, LJ, Knights, K., He, H., Springer, NL, Lillich, J. y Weiss, M. (2020)

- La longitud del cordón se mide y se debe lavar el cordón con PBS.
 - A. Se liga en trozos del cordón umbilical: Cortarlo transversalmente en fragmentos de 0,5 a 1 cm.
 - B. Se corta el cordón umbilical en secciones más pequeñas.
 - C. Se enjuagan los trozos de cordón umbilical con PBS.
 - D. Se agrega al tubo, enzimas: Generando digestión enzimática durante 3 horas a 37 °C con agitación rotatoria en presencia de combinaciones de colagenasa, hialuronidasa o tripsina, se elimina el tejido sobrante utilizando un filtro de 100 µm.
 - E. El tubo se procesa usando un programa estándar donde se determina el número de células viables

7. Cultivo

- A. CMM: (DMEM) Eagle Modificado De Dulbecco con un medio rico en L-glutamina, suero fetal bovino, penicilina, estreptomycin y anfotericina B, se cultiva la suspensión en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂
- B. CMH: Gibco StemPro-34 SFM como medio de cultivo sin suero y se cultiva la suspensión en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂
- C. Se cubre los cultivos con gelatina para mayor proliferación de CM
- D. Después de 2 días de cultivo, se reemplaza el medio y se observa al microscopio la presencia de células adherentes, que proliferan. Al superar la confluencia del 80 %, se trata con una solución de tripsina
- E. Se transfiere a frascos de cultivo y se cultiva de nuevo para lograr su expansión.
- F. Se analizan las células por citometría de flujo.
- G. Se procede a hacer la diferenciación

8. Diferenciación

- A. En el momento de la confluencia, se añade un medio de cultivo diferente para promover la diferenciación
 - I. Osteogénica: Se añade al cultivo hidrocortisona, ácido ascórbico y β-glicerofosfato.
 - II. Condrogénica: Se añade al cultivo indometacina, dexametasona e insulina.
 - III. Adipogénica: Se añade al cultivo suero de conejo al 15 %, dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), insulina bovina, indometacina

9. Caracterización por citometría de flujo

- A. Se lavan células con PBS
- B. Donde se va a analizar los marcadores hematopoyéticos: CD34+ y los marcadores mesenquimales CD73+, CD90+ y CD105
- C. Se confirma con RT-PCR

10. Almacenamiento y criopreservación

- A. CM serán almacenadas en bolsas criogénicas testeadas de la más alta calidad
- B. Adicionar agentes crioprotectores, se le agrega dimetilsulfóxido al 10%
- C. Se procede a la congelación a -196 °C conservando las CM en tanques de nitrógeno

11. Descongelamiento

- A. Muestras deberán ser descongeladas mediante choque térmico en baño maría a 37°C por dos minutos hasta la descongelación
- B. Remoción del crioprotector donde inmediatamente después de ser descongelada, cada unidad fue diluida en una solución de PBS.
- C. Se realiza recuento y viabilidad celular en cámara de Neubauer

HOSPITAL VETERINARIO GENERAL

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL ESPECIALIDAD DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

Datos del paciente

Nombre:	Apellidos:	Sexo:
Edad:	Raza:	No° de historia clínica:
Número de partos:	Semanas de gestación:	Número de cachorros:

Datos de el tutor

Nombres:	Apellidos:	No° Celular:
Dirección de residencia:	Cédula:	Fecha:

IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

La donación de sangre de cordón umbilical se realiza tras el parto. Una vez que hayan nacido los cachorros y el cordón umbilical sea cortado, los médicos recogerán la sangre del cordón. Para ello se utiliza una bolsa de recolección donde la sangre obtenida se mezcla con un preparado enviado al laboratorio al que se remite la sangre recogida. Para la donación se extraerá una muestra de sangre a la madre para la realización de unos análisis exigibles: Leptospira, parvovirus, distemper y toxoplasma el día del parto, y en ocasiones después; también se realizará examen clínico a los cachorros en el momento del nacimiento y en ocasiones más adelante por su médico veterinario pediatra. Igualmente, se realizarán análisis a la sangre del cordón y se guardarán muestras de la sangre materna y del cordón umbilical para posteriores análisis. Cualquier resultado patológico hallado en los estudios realizados le será necesariamente comunicado. Así mismo, usted deberá informar al laboratorio de cualquier anomalía detectada posteriormente por su médico veterinario o pediatra, sobre su salud de su canino y cachorros. La información referente a la madre y a los cachorros será tratada de forma confidencial y codificada de forma que queden protegidos sus identidades. Este consentimiento no obliga al Hospital Veterinario General a recoger la sangre del cordón umbilical si se considera que las circunstancias no son las idóneas.

OBJETIVOS DEL PROCEDIMIENTO Y BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR

Con la donación de sangre de cordón el personal sanitario especializado podrá realizar un estudio para evaluar si el protocolo para la colecta de células madre del cordón umbilical y validar si es el indicado siendo óptimo y estandarizado para ser usado a futuro y así ser usado en venideros trasplantes en caninos que sean compatibles y lo necesiten. Una vez comprobado que todo está bien, la sangre es analizada y se realiza una ficha informativa con sus características, que pasa a formar parte de un registro internacional, Antes de la donación, un obstetra hablará con usted para conocer los antecedentes médicos de su mascota e informarle de la posibilidad de una segunda revisión a la madre y a los cachorros, antes de que la unidad donada salga para laboratorio.

CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN

La donación de sangre del cordón umbilical obtenida tras el parto es un proceso inocuo tanto para los cachorros como para la madre. Con su donación contribuirá al estudio de protocolos de colecta de células madre del cordón umbilical que sean idóneos para futuros trasplantes. Esta sangre es rica en células madre de la sangre adulta, de igual forma que la médula ósea.

RIESGOS FRECUENTES

Cualquier actuación médica tiene riesgos. La mayor parte de las veces los riesgos no se materializan, y la intervención no produce daños o efectos secundarios indeseables. Pero a veces no es así. Por eso es importante que usted conozca los que pueden aparecer en este proceso: La recogida de sangre del cordón umbilical implica un retraso en el comienzo de las maniobras para el alumbramiento y sutura de la episiotomía, pudiéndose derivar de ello un aumento de sangrado genital y consecuente anemia en la madre.

TUTOR/REPRESENTANTE

DECLARO que he comprendido adecuadamente la información que contiene este documento, que firmó el consentimiento para la realización del procedimiento que se describe en el mismo, que he recibido copia del mismo y que conozco que el consentimiento puede ser revocado por escrito en cualquier momento

Nombres y apellidos:	Firma:	Cédula:
----------------------	--------	---------

MEDICO VETERINARIO/OBSTETRA

DECLARO haber informado al tutor o representante del mismo del objeto y naturaleza del procedimiento que se le va a realizar, explicándole los riesgos y complicaciones posibles del mismo.

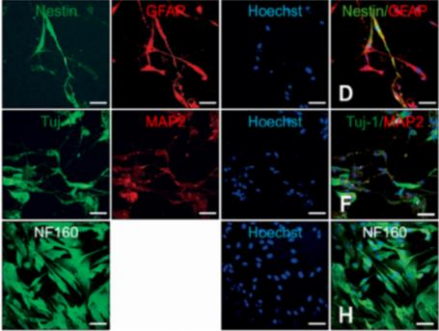
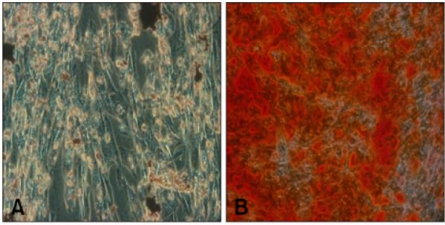
Nombre y apellidos de médico:	Firma:	Cédula:
-------------------------------	--------	---------

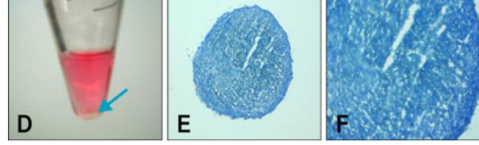
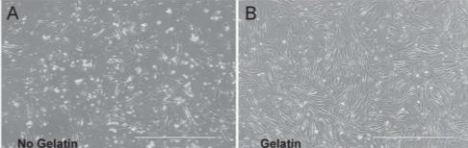
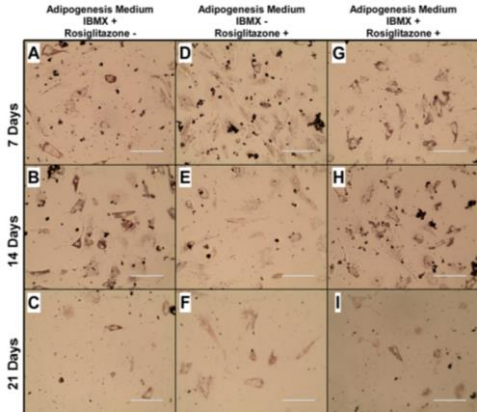
CAPÍTULO 8

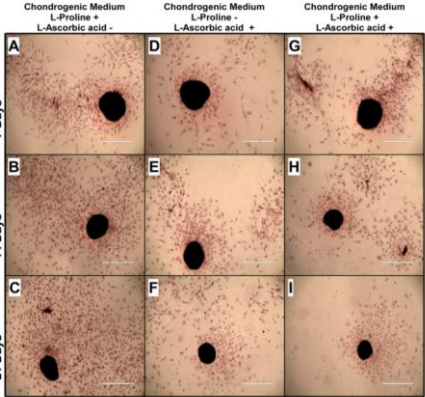
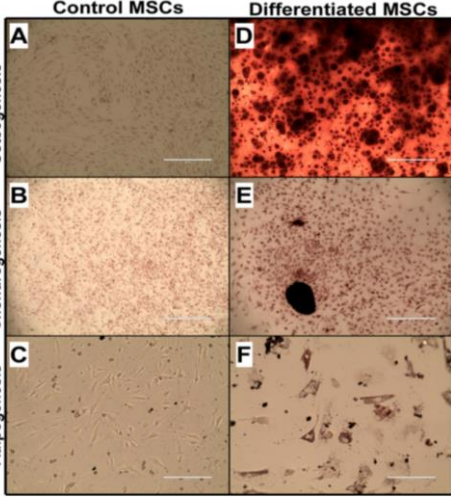
DISCUSIÓN

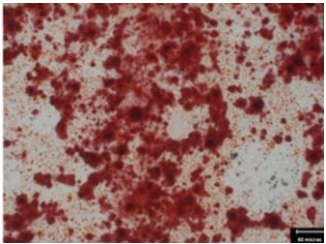
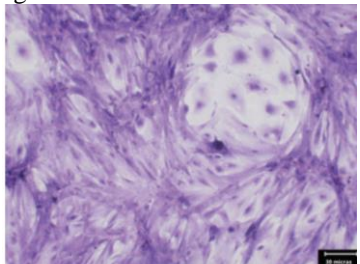
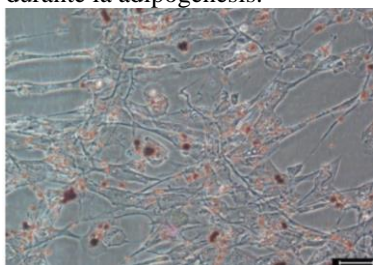
La obtención y cultivo de CM aisladas de cordón umbilical han sido reportadas en varias especies, algunas de ellas son: Equina (Iacono et al., 2012), canina (Wright et al., 2020)(Seo et al., 2009), caprina (Kumar et al., 2016) y bovina (Raoufi et al., 2011), (Debbarma et al., 2020).

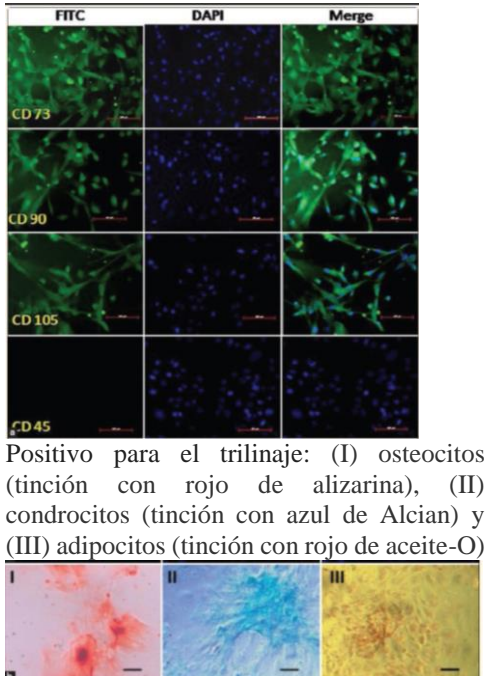
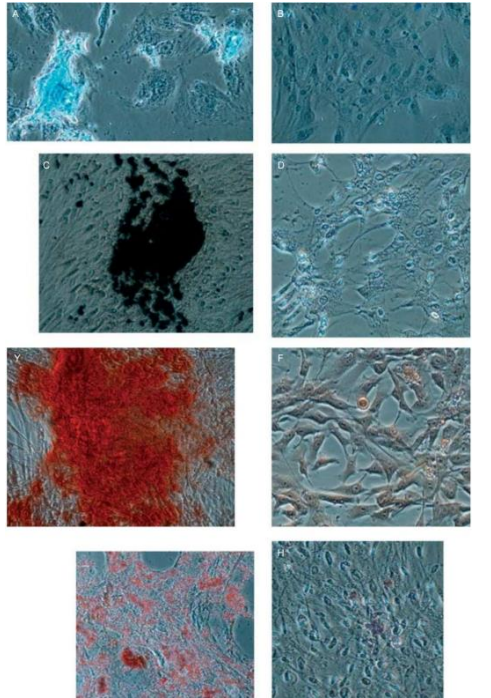
A continuación una breve recopilación de diferentes métodos usados para el cultivo y diferenciación de células madre con sus respectivos resultados de diferentes mamíferos

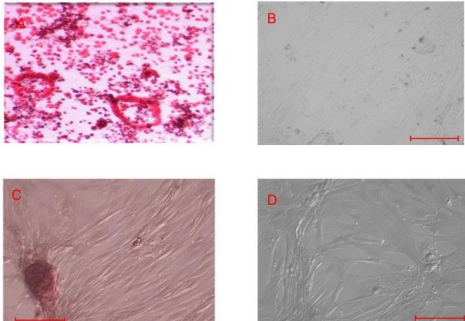
Especie / Artículo	Lavado	Cultivo	Diferenciación	Resultados
Canino (Seo et al., 2009)	Solución salina tamponada con fosfato (PBS)	Eagle modificado por Dulbecco (DMEM bajo en glucosa; Gibco)	<p>Neurogénica: DMEM, FBS al 20 % , docosahexaenoico, suplemento B27 (Gibco) y dimetilsulfóxido al 1,5 %</p> <p>Osteogénica: LG-DMEM, FBS al 10 %, β-glicerofosfato, dexametasona y ácido ascórbico-2-fosfato.</p> <p>Condrogénica: DMEM con FBS al 10 %</p>	<p>Diferenciación neuronal: + D, F y H</p>  <p>Diferenciación osteogénica: Tinción con rojo de alizarina S: Presencia de mineralización de calcio</p> <p>B: Diferenciación +</p> 

				<p>Diferenciación condrogénica: D: Formación de gránulos; E y F: Tinción de azul de toluidina +.</p> 
Canino (Wright et al., 2020)	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) que contiene antibiótico-antimicótico (1% solución enzimática hialuronidasa, y desoxirribonucleasa	Eagles modificado por Dulbecco (DMEM, glucosa alta), suero fetal bovino al 10 %, 1 % de antibiótico-antimicótico, 1 % de glutamax, factor de crecimiento de fibroblastos básico	<p>Diferenciación adipogénica: Dexametasona, piruvato de sodio y L-prolina</p> <p>Diferenciación condrogénica: Suero de conejo al 5 % , dexametasona, indometacina y insulina</p> <p>Diferenciación osteogénica: Kit StemPro (ThermoFisher, StemPro)</p>	<p>Al recubrir los cultivos con gelatina mejoró significativamente la longevidad de la capacidad de autorrenovación de las MSC indicada por mayor duplicación de la población acumulada y mayor eficiencia en la formación de colonias.</p>  <p>Diferenciación adipogénica: A,B,C: 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y sin rosiglitazona D,E,F: Rosiglitazona 5 y sin IBMX. G,H,I: IBMX y Rosiglitazona</p> <p>La pérdida de CMM se observa en los tres medios de diferenciación a lo largo del tiempo.</p> <p>Tinción de lípidos con Aceite rojo: Prominente cuando se utiliza un medio adipogénico que contiene IBMX y sin rosiglitazona a los 7 y 14 días de la diferenciación (véanse los paneles A y B)</p>  <p>Diferenciación condrogénica: A,B,C L-prolina y sin ácido L-ascórbico D,E,F: ácido L-ascórbico y sin L-prolina. G,H,I: L-prolina y Ácido L-ascórbico</p>

				<p>Tinción prominente en todas las condiciones de los medios probados, incluso después de solo 7 días de diferenciación.</p>  <p>Diferenciación osteogénica: Tinción con rojo de alizarina S A,B,C: Medio constituido en el laboratorio D,E,F: Kit StemPro (ThermoFisher) A,B,C: Medio constituido en el laboratorio como resultado una pérdida de MSC y una deposición muy pobre de la matriz. D,E,F: Tinción robusta, y que la deposición de la matriz se observó después 14 días y se intensificó durante la semana siguiente</p> 
Bovino / (Raoufi et al., 2011)	Tampón de lavado (PBS).	Eagle modificado de Dulbecco con bajo nivel de glucosa (DMEM-LG), solución salina tamponada	Diferenciación osteogénica : DMEM bajo en glucosa suplementado con FBS al 10 %, dexametasona, glicerofosfato y ácido ascórbico durante 2 a 3 semanas	Osteogénicas : Focos se tornaron de color rojo con la tinción de rojo de alizarina indicando el depósito de matriz mineralizada

		<p>con fosfato (PBS) de Dulbecco, penicilina-estreptomicina, L-glutamina, tripsina-EDTA y suero bovino fetal (FBS) se obtuvieron de GIBCO</p>	<p>Diferenciación condrogénica: DMEM alto en glucosa complementado con dexametasona, ácido ascórbico, TGF-β3 (Sigma) y 1X-ITS (Sigma)</p> <p>Diferenciación adipogénica: DMEM-LG, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX; sigma), indometacina (Sigma), dexametasona y FBS</p>	 <p>Condrogénica: Tiñeron positivamente de púrpura con azul de toluidina, lo que confirma que la matriz rica en glicosaminoglicanos se produjo en cultivo condrogénico</p>  <p>Adipogénica: Estas gotitas se tiñeron de rojo con aceite rojo, un tinte específico para las gotitas de lípidos en las células adipocíticas, la formación de gotitas de lípidos fue muy lenta durante la adipogénesis.</p> 
<p>Bovino / (Debbarma et al., 2020)</p>	<p>Solución salina tamponada con fosfato (PBS) para desinfectar, en etanol al 70%</p>	<p>Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con bajo contenido de glucosa suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 15 %, L-glutamina, penicilina, estreptomicina y</p>	<p>Osteogénicas: Medio de diferenciación de osteocitos HiOsteoXL™ (HiMedia, AL522, India). Las células se cultivaron durante 21 días y el medio se actualizó cada 3 días .</p> <p>Condrogénica: Medio de diferenciación de condrocitos HiChondroXL™ (HiMedia, AL523, India). Las células se cultivaron durante 21 días y el medio</p>	<p>Positivo para CD105, CD90 y CD73 marcadores de CMM y negativo para CD45, marcador de CMH</p>

		<p>anfotericina B y se mantuvieron en una atmósfera humidificada de 37 °C y 5 % de CO₂ en un incubadora.</p>	<p>se actualizó cada 3 días .</p> <p>Adipogénica: medio de diferenciación de adipocitos HiAdipoXL™ (HiMedia, AL521, India). Las células se cultivaron durante 21 días y el medio se actualizó cada 3 días .</p>	 <p>Positivo para el trilineaje: (I) osteocytos (tinción con rojo de alizarina), (II) condrocitos (tinción con azul de Alcian) y (III) adipocitos (tinción con rojo de aceite-O)</p>
<p>Equino / (Iacono et al., 2012)</p>	<p>CM se almacenaron en PBS que contenía penicilina y estreptomicina, a 4 °C durante 12 h como máximo. La UC se desinfectó sumergiéndolo durante 10 min en etanol al 70%</p>	<p>Solución de digestión de colagenasa tipo I (Gibco, Invitrogen Corporation), disuelta en solución de PBS</p> <p>Cultivado en DMEM, FBS al 10 % (Gibco), penicilina y estreptomicina.</p>	<p>Condrogénica: DMEM, penicilina, estreptomina, insulina, ascorbato-2-fosfato, dexametasona, factor de crecimiento transformante humano (hTGF)-b1 y FBS se tiñeron con una solución de azul alcian.</p> <p>Osteogénica: b-glicerofosfato, dexametasona, ascorbato-2-fosfato y FBS al 10 % en DMEM. Tinción con rojo de alizarina S para confirmar la diferenciación osteogénica, también se realizó la tinción de Alizarin Red S para detectar la deposición de calcio</p> <p>Adipogénica: Suero de conejo al 15 %, dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), insulina bovina, Indometacina en DMEM. La tinción Oil Red O y las vacuolas lipídicas aparecieron rojas.</p>	 <p>(A) Inducción condrogénica: Positivo (B) Control condrogénico: Mantuvieron una morfología normal y se tiñeron negativamente para azul alcian. (C) Inducción osteogénica: Tinción de von Kossa de depósito de calcio extracelular extenso.</p>

				<p>(D) Control osteogénico: Las células mantuvieron una morfología normal y se tiñeron negativamente</p> <p>(E) Inducción osteogénica: Depósito calcio extracelular positivo</p> <p>(F) Control osteogénico: Presentaron morfología normal y se tiñeron negativamente para la tinción de Alizarin Red S.</p> <p>(G) Inducción adipogénica: Acumulación extensa de gotitas de lípidos intracelulares.</p> <p>(H) Control adipogénico: Presentaron morfología normal y se tiñeron negativamente</p>
Caprina / (Kumar et al., 2016)	Solución salina tamponada con fosfato estéril suplementada con anfotericina B, penicilina y estreptomicina	Dulbeco Modified Eagle Media (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (15%) y antibióticos (Estreptomicina) en una incubadora con T a 37 y CO ₂ , 5 % de CO ₂	<p>Osteogénica: DMEM que contiene 10% FBS, Dexametasona, glicerosfosfato, ácido L-ascórbico, se evaluó mediante tinción con rojo de alizarina</p> <p>Adipogénico: DMEM que contiene 10 % de FBS, dexametasona, indometacina y insulina, tiñeron las gotas de lípidos con Oil Red O resultados</p>	 <p>(A) Diferenciación positiva en células adipogénicas (B) Control sin diferenciación C.)Diferenciación positiva en células osteogénicas (D) Control sin diferenciación</p>

Las células madre aisladas del cordón umbilical tienen excelente capacidad proliferativa y potencial de diferenciación. Además sus propiedades inmunogénicas e inmunomodulatorias son bastante útiles para trasplantes heterólogos, debido a su menor restricción de histocompatibilidad, es decir que tiene una semejanza inmunológica del donante al receptor, adicional a ello al ser de una fuente que normalmente se descarta no tiene implicaciones negativas en los donantes, éticos, ni morales .

En este trabajo se revisaron los métodos más exitosos reportados para la recolección y cultivo de células madre, notándose que los procedimientos usados para el aislamiento de CM hallados en la literatura son muy diversos y ningún protocolo en particular ha sido introducido para ser usado de forma estándar. Sin embargo, desde la información recopilada, se encontró que los métodos de aislamiento tienen una influencia significativa en la pureza y capacidad de proliferación de las CM del cordón umbilical obtenidas.

En cuanto al cultivo de las células madres los artículos acá revisados difieren en el mismo cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-LG), donde la variación es que algunos son altos y otros bajos en glucosa, en cuanto el factor de crecimiento, el más usado es el suero fetal bovino en lo que varían los cultivos es en los antibióticos y antimicóticos empleados,

sin embargo en varios cultivos tienen varios en común por esto la elección para el cultivo a emplear que en el caso del trabajo de grado es (DMEM) Eagle Modificado De Dulbecco con un medio rico en L-glutamina, suero fetal bovino, penicilina, estreptomina y anfotericina B, donde se cultiva la suspensión en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂. (Wright et al., 2020)

En varios artículos en la literatura las CM canina no demuestran diferenciación de tres linajes, y por esa razón algunos han argumentado que la diferenciación a dos linajes es suficiente para demostrar progenitores multipotentes en CM caninas.

En el artículo de (Seo et al., 2009), las células cultivadas se mantuvieron hasta el pase 11 donde se realiza una comparación con las células madre humanas que pueden proliferar y tener capacidades de diferenciación de al menos 15 pases. Sin embargo los tres medios de cultivos para diferenciación fue todo un éxito ya que todos salieron positivos.

En este artículo (Wright et al., 2020), se reporta que la eficiencia para diferenciar las CMM caninas a adipocitos fue baja, pero que probablemente se reflejó por la pérdida de células durante la diferenciación, también se realizó una comparación muy interesante en la que se recubrían cultivos con gelatina y otros sin gelatina donde se determinó que el recubrimiento de los cultivos con gelatina era importante para las células madre caninas debido a que mejora significativamente la proliferación de las colonias en comparación con placas sin recubrimiento, lo que no quiere decir que sin gelatina no haya proliferación, si la hay pero a menor escala.

En (Raoufi et al., 2011) tuvo inconvenientes con la diferenciación de adipogenesis debido a que fue muy lento, indicaron que las CMM bovinas tienen un potencial osteogénico más fuerte que la capacidad adipogénica.

En el artículo de (Debbarma et al., 2020), todos los medios de cultivos fueron exitosos en la diferenciación de CM y a diferencia del estudio de (Raoufi et al., 2011), que contaban que la capacidad adipogénica era muy lenta y se lo atribuían a no usar suero de conejo aca con el uso de HiAdipoXL™ (HiMedia, AL521, India), tuvieron buena diferenciación adipogénica.

En equinos, (Iacono et al., 2012), los trilineajes fueron positivos, en cuanto a la diferenciación adipogénica le agregan suero de conejo al medio para la diferenciación, lo cual da muy buenos resultados para el cultivo, adicional a ello de los artículos expuestos es el único que le adiciona ello para diferenciar. Las células madre de la gelatina de Wharton en este estudio mostraron una tasa de expansión más alta en comparación con las células madre de sangre del cordón umbilical. Los resultados observados son similares a los informados en medicina humana.

En la especie Caprina / (Kumar et al., 2016), solo se hizo diferenciación osteogénica y adipogénica donde, ambas fueron positivas.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El protocolo seleccionado es una propuesta para la estandarización y optimización de la recolecta de células madre de cordón umbilical con todo lo que implica (aislamiento, transporte, caracterización, cultivo, tamizaje congelamiento y descongelamiento) para la formación de un banco de sangre de células madre.
- La gelatina de Wharton según literatura evaluada es una importante fuente para el aislamiento de células madre mesenquimales que tengan como fin la investigación o la aplicación clínica al igual que la SCU es rica en células madre hematopoyéticas.
- La fuente de células madre de cordón umbilical es excelente por el hecho de ser descartable, sin problemas éticos, ni morales y adicional no causar problemas al momento del parto.

Recomendaciones

- Se propone la continuidad del proyecto para la validación del protocolo en campo para su posterior uso donde si es necesario se somete a ajustes para mejorar la precisión y confiabilidad de los resultados.
- Se recomienda que los laboratorios analicen las células para detectar infecciones virales antes de su distribución y con regularidad durante el cultivo para evitar pérdidas celulares tratamientos ineficaces.
- Se recomienda que se utilicen varios métodos para controlar la estabilidad de la línea celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ballen, K. K., Gluckman, E., & Broxmeyer, H. E. (2013). Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*, 122(4), 491–498. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-453175>
- Bongso, A., & Richards, M. (2004). History and perspective of stem cell research. Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, 18(6), 827–842. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.09.002>
- Borowski M, Giovino-Doherty M, Ji Let al., autores; Laning J, editor. Protocolos básicos de cultivo de células madre pluripotentes. 2012 Jun 10. En: StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Instituto de Células Madre de Harvard; 2008-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK133258/>
- Buhles W, Kass PH. 2012. Understanding and Evaluating Veterinary Clinical Research. J Am Anim Hosp Assoc. 48:285-298.
- Butler, M. G., & Menitove, J. E. (2011). Umbilical cord blood banking: an update. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(8), 669–676. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9577-x>
- Calloni R, Viegas GS, Türck P, Bonatto D, Pegas JA. 2014. Review mesenchymal stromal cells from unconventional model organisms. Cytotherapy. 16: 3-16.
- Debbarma, P., Mondal, T., Manna, C., Kumar, K., Mukherjee, J., Das, B. C., Bag, S., & Das, K. (2020). Post-calving umbilical cord tissue offcut: A potential source for the isolation of bovine mesenchymal stem cells. *Veterinary world*, 13(12), 2772–2779. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2772-2779>

- Filioli Uranio M, Valentini L, Lange-Consiglio A, et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Mol Reprod Dev.* 2011;78(5):361-373. doi:10.1002/mrd.21311
- Gugjoo, M. B., Amarpal, A., & Sharma, G. T. (2019). Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. *Journal of cellular physiology*, 234(10), 16779–16811. <https://doi.org/10.1002/jcp.28348>
- Henao Pérez, Julieta, & Pacheco Pinedo, Eugenia Cristina, & Arboleda Toro, Germán David, & Gómez Aristizabal, Alejandro, & Restrepo Múnera, Luz Marina (2005). ¿Por qué un banco público de células madre de sangre de cordón umbilical en Colombia? *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 37(2),85-92.
- Hoffman AM, Dow SW. 2016. Concise review: Stem cell trials using companion animal disease models. *Stem Cells*. 34:1709-29.
- Iacono E, Brunori L, Pirrone A, et al. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction*. 2012;143(4):455-468. doi:10.1530/REP-10-0408
- Koch, T. G., Heerkens, T., Thomsen, P. D., & Betts, D. H. (2007). Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC biotechnology*, 7, 26. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-26>
- Kumar K, Agarwal P, Das K, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from caprine umbilical cord tissue matrix. *Tissue Cell*. 2016;48(6):653-658. doi:10.1016/j.tice.2016.06.004
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem cell reviews and reports*, 16(1), 3–32. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>
- Madriz de Haan, P. (2010). REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA CÉLULAS MADRE: FUENTES No EMBRIÓNICAS ACCESIBLES. *Medicina Legal de Costa Rica*, 27(2).
- Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F. 2011. Canine adipose-derived mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci*. 91:18-24.
- Menon, D. V., Patel, D., Joshi, C. G., & Kumar, A. (2019). The road less travelled: The efficacy of canine pluripotent stem cells. In *Experimental Cell Research* (Vol. 377, Issues 1–2, pp. 94–102). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.01.025>

- Munoz, J., Shah, N., Rezvani, K., Hosing, C., Bollard, CM, Oran, B., Olson, A., Popat, U., Mollidrem, J., McNiece, IK y Shpall , EJ (2014). Revisión concisa: trasplante de sangre de cordón umbilical: pasado, presente y futuro. *Medicina traslacional de células madre* , 3 (12), 1435–1443. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0151>
- Nakage, A. P. M., Santana, A. E., Buffo de Cápua, M. L., & Godoy, A. V. (2005). *Characterization and quantification of blood cells from the umbilical cord of dogs. Veterinary Clinical Pathology*, 34(4), 394–399. doi:10.1111/j.1939-165x.2005.tb00067.x
- Raoufi, M. F., Tajik, P., Dehghan, M. M., Eini, F., & Barin, A. (2011). Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 46(1), 95–99. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01594.x>
- Rentsch, C., Hess, R., Rentsch, B. *et al.* Células madre mesenquimales de médula ósea ovina: aislamiento y caracterización de las células y su potencial de diferenciación osteogénica en andamios de policaprolactona-co-lactida bordados y de superficie modificada. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 46 , 624–634 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9316-0>
- Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S. 2012. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells: A comparative study. *Vet Res Commun*. 36:139-148.
- Riaño G, N. B., Vera A, V. J., & Carlos Villamil, L. J. (2007). *Las células madre mesenquimales desde la perspectiva de las ciencias veterinarias* <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>
- Rodríguez-Pardo, V. M. (n.d.). *CÉLULAS MADRE: CONCEPTOS GENERALES Y PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN* (Vol. 10, Issue 1). <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4932>
- Roura, Santiago & Pujal, Jm & Gálvez-Montón, Carolina & Bayes-Genis, Antoni. (2015). The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: A review. *Stem Cell Research & Therapy*. 6. 10.1186/s13287-015-0113-2.
- Seo, MS, Jeong, YH, Park, JR, Park, SB, Rho, KH, Kim, HS, Yu, KR, Lee, SH, Jung, JW, Lee, YS y Kang, KS (2009). Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical canino. *Revista de ciencia veterinaria* , 10 (3), 181–187. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.3.181>
- Talavera, J., Gil-Chinchilla, J. I., García, D., Castellanos, G., López-Lucas, M. D., Atucha, N. M., & Moraleda, J. M. (n.d.). *Terapia con células madre en medicina*

veterinaria: conceptos generales y evidencias clínicas Stem cell therapy in veterinary medicine: general principles and clinical evidences Introducción. <https://www.clinvetpeqanim.com/img/pdf/1329600056.pdf>

- Uhrig, M., Ezquer, F., & Ezquer, M. (2022). Improving Cell Recovery: Freezing and Thawing Optimization of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells*, 11(5), 799. <https://doi.org/10.3390/cells11050799>
- Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. 2010. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant*. 19:279-289.
- Volk SW, Theoret C. 2013. Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regen*. 21: 382-394
- Wright, A., Snyder, LJ, Knights, K., He, H., Springer, NL, Lillich, J. y Weiss, M. (2020). Un protocolo para el aislamiento, cultivo y crioconservación de células del estroma mesenquimatoso canino derivadas del cordón umbilical: papel de la unión celular en el mantenimiento a largo plazo. *Células Madre y Desarrollo*. doi:10.1089/scd.2019.0145
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. y Rybak, Z. (2019). Células madre: pasado, presente y futuro. *Investigación y terapia con células madre*, 10 (1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Rodríguez Linárez, J. (2017). Historia e investigación en las células madre. *Gaceta De Ciencias Veterinarias*, 20(1), 3. Recuperado a partir de <https://revistas.uclave.org/index.php/gcv/article/view/893>
- Gonzales Becerril, L., Ortigoza Fonseca, L. M., Tela Cayecatli, H., & Hernández Velasco, D. M. (2019). Células madre. La revolución está esperando. *TEPEXI Boletín Científico De La Escuela Superior Tepeji Del Río*, 6(11), 29-30. <https://doi.org/10.29057/estr.v6i11.3830>