

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales



“Implementación de protocolos de aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical como base para estudios de regeneración de tejidos”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Diego Fernando Costa Costa

Guayaquil – Ecuador

2015

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis hermanos Nataly, Cesar y Gabriel; y a mis padres Cesar y Matilde por su diverso apoyo en toda mi carrera; sobre todo a mi madre por preocuparse siempre por mi bienestar. Al Dr. José Álvarez por su constante guía y apoyo para culminar este trabajo. A todo el grupo que conforma el laboratorio de Biomedicina por su amabilidad y apoyo, principalmente al Dr. Washington B. Cárdenas por recibirme y prestar su colaboración para la realización de esta tesis. A la Dra. Ana Tirapé y el Dr. Marcelo Muñoz por el tiempo dedicado en la evaluación de este documento.

Agradezco también, al equipo que conforma la Unidad de Trasplante de Órganos y Tejidos del Hospital Luis Vernaza, especialmente a su coordinadora, Dra. María Candela Ceballos y a la Blga. Sandra Miño, quienes cooperaron para que este proyecto se materialice.

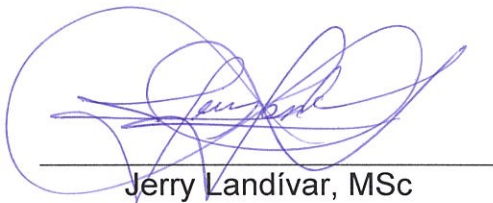
Finalmente agradezco a mis amigos en general por amenizar mis estudios universitarios.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis padres y hermanos a quienes quiero mucho, a quienes debo prácticamente todas mis virtudes, y por quienes buscaré ser mejor cada día. Sobre todo te la dedico a ti padre... aunque no pueda celebrar este momento contigo, espero estés satisfecho con mi esfuerzo.

Se la dedico además, a esa persona especial que me ha sacado de la monotonía en estos últimos tiempos.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



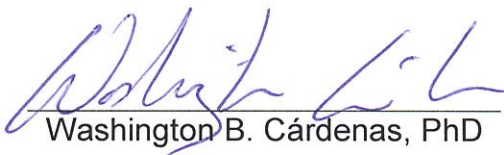
Jerry Landívar, MSc

PRESIDENTE



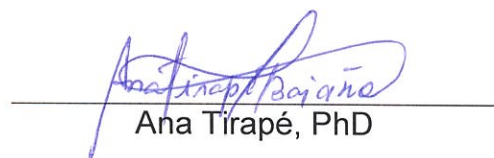
José Álvarez-Barreto, PhD

DIRECTOR



Washington B. Cárdenas, PhD

CO-DIRECTOR



Ana Tirapé, PhD

VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.



Diego Fernando Costa Costa

RESUMEN

La investigación en células madre ha adquirido un auge vertiginoso debido a su potencial aplicación en reparación y regeneración de tejidos humanos y, por lo tanto, en terapia a nivel celular. En los últimos años, la investigación en células madre mesenquimales (MSCs) tiene especial atención debido a su larga capacidad de proliferación, potencial de diferenciación múltiple y propiedades inmuno-moduladoras. Una de las fuentes más prácticas de obtención de dichas células es la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Las MSCs humanas derivadas de la gelatina de Wharton (hWJ-MSCs) son más primitivas que las obtenidas de la médula ósea de adultos y no sufre del escrutinio ético en su investigación puesto que son obtenidas de un tejido que es descartado después del alumbramiento. Debido a la reconocida importancia terapéutica que tiene las células madre y a la limitada investigación formal en esta área en el Ecuador, el presente proyecto de tesis realizó los primeros estudios de aislamiento y proliferación de hWJ-MSCs obtenidas del cordón umbilical, en colaboración con el Hospital Luis Vernaza de la Junta de Beneficencia de Guayaquil. La obtención de las MSCs se realizó mediante el tratamiento de la gelatina de Wharton, diseccionada de un cordón umbilical humano, con colagenasa tipo I durante 3, 14 y 16 horas. Se tuvo éxito con 3 horas de digestión, sin ninguna diferencia significativa en

las variables analizadas. Las células obtenidas se dejaron proliferar por algunos días a 37°C y en una atmósfera con 5% CO₂. Para determinar su capacidad de diferenciación, algunas células se sometieron a un tratamiento de inducción osteogénica. El éxito de dicha diferenciación fue comprobado por la elevada actividad de la fosfatasa alcalina y la deposición de calcio. Adicionalmente se probó la capacidad proliferativa de las MSCs en un material derivado del mesocarpio de la mazorca de cacao para determinar su citocompatibilidad como andamio natural. El presente estudio estableció la factibilidad de realizar esta línea de investigación y se espera captar mayor interés por parte de los investigadores ecuatorianos en torno al tema de las hWJ-MSCs y su aplicación en la regeneración de tejidos.

Palabras claves: Células Madre Mesenquimales, Gelatina de Wharton, Aislamiento de Células Madre, Ingeniería de Tejidos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1: CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	3
CAPÍTULO 2: CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE LA GELATINA DE WHARTON DEL CORDÓN UMBILICAL.....	9
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	33
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	44
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
ANEXOS.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	53

ABREVIATURAS

ALP : Fosfatasa alcalina

ANOVA : Análisis de Varianza

DMEM : Medio Eagle modificado por Dulbecco

FBS : Suero fetal bovino

hUB-EPCs : Células progenitoras endoteliales de la sangre del cordón

hUC : Cordón umbilical humano

HR : Humedad relativa

hWJ-MSCs : Células madre mesenquimales de la gelatina Wharton del cordón umbilical humano

IC : Índice de citocompatibilidad

ISCT : Sociedad Internacional para la Terapia Celular

MOst : Medio de inducción a diferenciación osteogénica

MSCs : Células madre mesenquimales (mesenchymal stromal cells, en inglés)

MTS : ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

PBS : Solución salina tamponada por fosfatos

RGR : Cociente de crecimiento relativo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Células aisladas en con el método enzimático.	34
Figura 3 Células aisladas vs Tiempo de digestion enzimática utilizando colagenasa tipo I.....	35
Figura 4 Tiempo de doblaje de población vs Tiempo de digestión enzimática.	36
Figura 5 Células aisladas con el método explante.....	36
Figura 6 Proliferación celular con y sin medio MOst.....	38
Figura 7 Actividad de fosfatasa alcalina.....	39
Figura 8 Deposición de Calcio en cultivos de células madre en diferentes medios.	41
Figura 9 Análisis del Cociente de Crecimiento Relativo.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Equivalencia entre el Cociente de Crecimiento Relativo y el Índice de Citocompatibilidad.....	31
Tabla 2: Número de células aisladas y tiempo de doblaje de población según el tiempo de digestión enzimática.....	34
Tabla 3 Índices de Citocompatibilidad para los tratamientos probados	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Ejemplo de Consentimiento Informado.....	54
Anexo B: Aprobación por parte del comité de ética	56
Anexo C: Cordón umbilical en medio de preservación	58
Anexo D: Cordón umbilical	58
Anexo E: Porción de cordón umbilical con corte longitudinal.....	58
Anexo F: Separación de gelatina de Wharton.....	58
Anexo G: Gelatina de Wharton separada y lavada	59
Anexo H: Placa de cultivo con células aisladas	59
Anexo I: Cultivo con de explante de gelatina de Wharton.....	59
Anexo J: Curva estándar para el cálculo de p-nitrofenol.....	60
Anexo K: Curva estándar para el cálculo de calcio depositado	60
Anexo L: Cultivos celulares con los diferentes tratamientos del derivado de mesocarpio del cacao	60
Anexo M: Datos obtenidos en aislamiento y cultivo celular	61
Anexo N: Datos obtenidos en ensayo de proliferación en diferenciación osteogénica.....	61
Anexo O: Fotografía del resultado del ensayo de actividad ALP (placa 1) ...	61
Anexo P: Fotografía del resultado del ensayo de actividad ALP (placa 2)....	62

Anexo Q: Datos obtenidos en actividad ALP	62
Anexo R: Fotografía del resultado (placa) del ensayo de deposición de calcio	63
Anexo S: Datos obtenidos en deposición de calcio	63
Anexo T: Datos de ensayo de citocompatibilidad	64

INTRODUCCIÓN

Las células madre o células troncales se caracterizan por su capacidad de dividirse, produciendo células idénticas no diferenciadas y su potencial de diferenciarse en diversos tejidos o células de órganos específicos. Las células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) son células de adulto cuyo aislamiento puede no implicar controversia y, por ello, el principal motivo de esta investigación se deriva de la necesidad de emprender estudios usando células madre en el país, y sobre todo las de la gelatina de Wharton (WJ-MSCs), que además de venir de una fuente descartable, poseen características tales como amplia pluripotencialidad, tolerancia en trasplantes alogénicos, no tumorigenicidad y prolongada capacidad de diferenciación (1).

Hay evidencia que sugiere que las WJ-MSCs son efectivas en la recuperación estructural y funcional de varios órganos/tejidos dañados como la piel, miocardio, hígado y hueso, entre otros (2). Debido a esto, las MSCs han sido usadas en estudios de regeneración de tejidos y terapia celular (3). Es evidente que las MSCs representan un futuro muy prometedor en cuanto al tratamiento de lesiones graves y enfermedades degenerativas tales como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades crónicas del hígado y lesiones a los cartílagos y tendones, entre otras (4). Debido a su

potencial uso terapéutico, la implementación de metodologías que permitan el desarrollo de una línea de investigación formal en biología regenerativa con MSCs es muy importante para el Ecuador.

Uno de los métodos más eficientes para aislar WJ-MSCs humanas (hWJ-MSCs), es el enzimático (5). Este método se implementó en el presente proyecto de tesis, el cual constó de diferentes horas de tratamiento enzimático, así como la investigación de la dinámica de proliferación de las células madre obtenidas. Para verificar el fenotipo de células madre, células aisladas fueron sometidas a un proceso de diferenciación osteogénica. Adicionalmente, para investigar la factibilidad de desarrollar andamios naturales para el crecimiento celular *in vitro*, se probó la citocompatibilidad de un material derivado del mesocarpio de la mazorca de cacao. Estos biomateriales tridimensionales son mucho más eficaces para la reparación de tejidos.

Los resultados que se presentan a continuación, aportan con una de las pocas experiencias en el país en la implementación formal y técnica de un protocolo estandarizado para el aislamiento, cultivo y diferenciación de hWJ-MSCs.

CAPÍTULO 1

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

1.1. Generalidades de las Células Madre

Las células troncales o también llamadas células madre, son un grupo particular de células con capacidad de auto renovarse (formar células idénticas a la célula de origen) y son indiferenciadas, es decir, pueden dar origen a diferentes tipos de células especializadas en ejercer diferentes funciones en el organismo (6). Dependiendo de dónde provengan, las células madre pueden clasificarse en células madre embrionarias y células madre somáticas. Las primeras son totipotentes, pudiendo generar todos los linajes celulares del organismo; mientras que las somáticas son en su mayoría pluripotentes, ya que pueden diferenciarse en una variedad limitada de linajes celulares (7). Pese a su capacidad totipotencial, las células embrionarias no han sido objeto de un continuo

uso en investigación y terapia regenerativa por la gran controversia ética que pueden generar, al ser células producidas en los primeros estadios del desarrollo embrionario (8).

Es así que en los últimos años ha crecido de forma muy considerable el interés en estudiar las células madre somáticas, o adultas, de varios tejidos humanos; ya que son de enorme interés biológico para la generación de conocimiento y posible aplicación clínica (6). Además, la controversia generada con su uso biomédico es considerablemente menor. Por ejemplo, estas células pueden aislarse de tejidos que de todas formas son desechados, como el cordón umbilical o la placenta después del alumbramiento (7). Dentro de este grupo de células, las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) se ha estudiado con una notable intensidad debido a su gran potencial proliferativo y de diferenciación (6, 9).

1.2. Historia de las MSCs

Estas células fueron descubiertas por primera vez en 1968, como poblaciones tipo fibroblasto adherentes en la médula ósea, con capacidad de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteoblastos *in vitro* (10). Posteriormente se demostró que el hueso y el cartílago se pueden renovar gracias a la mediación de MSCs, y que las condiciones que se

presentan alrededor de estos tejidos, jugaban un papel crítico para inducir su diferenciación. Caplan propuso la denominación “mesenchymal stem cells” a esta población de células, la cual fue entonces adoptada por los investigadores del área (11).

Pese al consenso científico en usar el término “MSCs,” con los años de investigación con estas células, surgió cierta controversia sobre el uso de dicho término. La Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) propuso la nueva denominación “mesenchymal stromal cells” para este tipo de células en el año 2006 (12). Según esta sociedad, las razones para el cambio en la nomenclatura de debe a las siguientes razones:

- Los métodos usados para aislar las células madre mesenquimales resultan en poblaciones heterogéneas de células, donde solo una fracción de estas muestra multipotencialidad.
- Ausencia de evidencia directa de que las células mesenquimales pueden auto-renovarse y diferenciarse *in vivo*.

Además, está el hecho de que poblaciones de MSCs aisladas de diferentes tejidos, muestran diferentes características, por lo que el término científicamente más adecuado sería “mesenchymal stromal cells.” Sin embargo ambos términos son ampliamente utilizados y frecuentemente se usan indistintamente en la literatura (13). Es así, que las “mesenchymal stem cells” (células madre en español) son

consideradas una subpoblación de las “mesenchymal stromal cells”. Estas últimas son una población heterogénea de células obtenidas del aislamiento inicial de los tejidos como medula ósea o gelatina de Wharton de cordón umbilical (12). El término “MSCs” es usado para indicar ambas designaciones, “stem” y “stromal” (13).

Estudios posteriores han mostrado la plasticidad de estas células dando origen a otros linajes como: miocitos, tenocitos y células nerviosas. Estas células se han convertido en una excelente alternativa para reemplazar a las células madre embrionarias (7). Las MSCs han captado la atención de muchos científicos alrededor del mundo, pues solo en la base de datos bibliográfica de PubMed, en el año 2012 se identificaron más de 17000 referencias para "mesenchymal stem cells" y más de 4500 para “mesenchymal stromal cells” (13). En una búsqueda actual, existen 56700 referencias para ambas designaciones.

1.3. Biología de las MSCs

Las MSCs 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, entre la tercera y octava semana de gestación, cuando los tejidos y órganos específicos del embrión se encuentran en formación (14).

La ISCT propuso un conjunto de estándares que las células deben cumplir para adquirir la denominación de MSCs. Las células deben adherirse al plástico cuando se mantienen en frascos o placas en condiciones estándar de cultivo celular. Adicionalmente, estas células deben ser estadísticamente positivas para ciertos marcadores de membrana como CD105/endogлина, CD90/Thy-1 CD29 y CD73/ 5'-NT; y negativas para HLA-II, CD45 y CD34. Finalmente, las células deben poseer la capacidad de dar origen a osteoblastos, condroblastos y adipocitos en condiciones estándar *in vitro* (12).

1.4. Fuentes de las MSCs

En un principio se pensaba que pocos tejidos poseían células troncales: sangre, epitelio del intestino, huesos y piel; sin embargo, actualmente se sabe que realmente están presentes en prácticamente cualquier tejido del cuerpo (15). 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 de cordón umbilical y sangre de cordón umbilical (9).

Existen diferentes teorías para explicar la amplia distribución de MSCs: *i)* Todos los tejidos adultos contienen reservorios autónomos de células madre, y estas se desarrollan dependiendo del ambiente encontrado en cada tejido; *ii)* Las MSCs circulan en la sangre por todo el organismo y se

asientan en los diferentes órganos como células de reserva; *iii*) las MSCs tienen su origen en poblaciones celulares que provienen de las paredes de los vasos sanguíneos y por ello se encuentran en todo tejido (16).

La mayoría de estudios, preclínicos y clínicos, han usado como fuente de MSCs a la médula ósea (6), probablemente por ser esta la primera fuente descubierta y por la eficiencia de aislamiento de este tejido, la cual es cercana a 100% (17). Sin embargo, el bajo número de células presentes en la médula, la disminución del potencial proliferativo y de diferenciación de las células conforme aumenta la edad del donante, y el hecho de que su aislamiento sea un proceso invasivo; representan un problema (18). Por ello, hoy en día las fuentes para este tipo de células se han diversificado. Así, tenemos tejidos como el adiposo, la placenta y la gelatina de Wharton del cordón umbilical, como excelentes alternativas por su capacidad proliferativa y la menor controversia que implican su obtención.

CAPÍTULO 2

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE LA GELATINA DE WHARTON DEL CORDÓN UMBILICAL

2.1. Características generales

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 (19). Está compuesta por células estromales, fibras de colágeno, proteoglicanos y, sobre todo, por ácido hialurónico (9). McElreavey, entre otros, reportaron por primera vez el aislamiento de células fibroblastoides a partir de la gelatina de Wharton del cordón umbilical en 1991 (20). Varios estudios han propuesto que las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (WJ-MSCs, por sus siglas en inglés) poseen propiedades únicas frente a otras MSCs (20). 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 MSCs 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 (21).

Las WJ-MSCs presentan características muy prometedoras que pueden ser consideradas para su uso clínico autólogo o alogénico ya que poseen 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 (22). 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 (9). Finalmente, se debe mencionar que para su uso clínico, el aspecto inmunomodulatorio e inmunogénico que poseen las WJ-MSCs son uno de sus aspectos más importantes (20).

Como es de esperarse, estas células muestran marcadores típicos de MSCs, como CD105 (23-25), CD90 (23, 26, 27), CD73 (25, 28) y CD29 (25, 29, 30). Además, no expresan MHC II, carecen de HLA-DR, CD86 y CD80, y su expresión de MHC I es muy baja. Esto último explica la mínima reacción inmune, que se cree provocan. También se debe tomar

en cuenta el efecto inmunosupresivo que estas células presentan, por la mediación de factores solubles y contacto célula-célula (20). PGE₂, galectin-1 y HLA-G5 son uno de los factores liberados con dicho efecto (31).

2.2. Aislamiento de células madre mesenquimales a partir de la gelatina de Wharton del cordón umbilical

2.2.1. Generalidades de los principales métodos de aislamiento

2.2.1.1. Método de explante

Este es el método más simple utilizado en la presente tesis. El método consiste en la preparación de trozos de gelatina de Wharton de 1-3mm³ para luego colocarlos en una placa de cultivo celular. Es importante esperar un par de minutos para que el tejido se adhiera a la placa antes de poder verter lentamente el medio de cultivo celular (25, 32), evitando así que el tejido flote e impida que las células migren hacia la placa. Una vez iniciado el cultivo, la placa debe incubarse de forma inalterada, es decir que el cultivo debe mantenerse estático por aproximadamente 4 días (33). Esto último, con el objetivo de permitir que las células migren del explante hacia la superficie adherente de la placa de cultivo.

Además del medio de cultivo a utilizar, se usa PBS (tampón fosfato salino) para los lavados y, por ello, este método es el más simple en términos de tiempo, costo y mano de obra.

Lamentablemente, las células tardan varios días en migrar a la superficie adherente de la placa y multiplicarse hasta alcanzar la confluencia. Además, la placa que contiene el explante debe mantenerse sin alteraciones mientras se incuba, lo cual puede crear problemas cuando es requerido reemplazar el medio de cultivo. Ninguna MSC puede ser obtenida a partir de un tejido flotante (20).

2.2.1.2. Método enzimático

Este método usa diferentes enzimas tales como la colagenasa tipo I, hialuronidasa y tripsina para disociar el tejido de la gelatina de Wharton y facilitar el aislamiento de células madre. El tipo y concentración de enzima/s juegan un papel crítico en el resultado de la digestión, principalmente cuando se habla de eficiencia, viabilidad y toxicidad (34, 35). El conjunto de enzimas, sus concentraciones, los tiempos de digestión y las proporciones de cada dilución enzimática varían mucho en los diferentes estudios donde se ha aplicado este método. Se ha usado por ejemplo: 0.075% de colagenasa tipo II por 30 min y 0.125% de tripsina por

30 min (30); o 2.7 mg/mL de colagenasa tipo I, 0.7 mg/mL de hialuronidasa y 2.5% de tripsina por 3 h en PBS (36); o tan solo 2,5mg/ml de tripsina EDTA por 30 minutos (5).

Básicamente, en lugar de sembrar directamente los explantes obtenidos del cordón umbilical, se somete dichos tejidos a un proceso de digestión enzimática, usando proteasas como las mencionadas en el párrafo anterior. Luego se centrifuga la digestión y las células peletizadas son sembradas en placas con medio de cultivo. Aspectos como: la preparación del coctel enzimático, el margen crítico del tiempo de digestión, la eliminación del sobrenadante y la formación de detritus en el cultivo, vuelven más complejo a este método, si se lo compara con el de explante. El tiempo de exposición a las diferentes enzimas debe mantenerse al mínimo, pues este podría causar la degradación de la membrana celular o un exceso de degradación la matriz extracelular, y por lo tanto impedir que las células se adhieran al sustrato de cultivo una vez han sido aisladas (37).

*Posteriormente este método se explicara con mayor detalle.

2.2.1.3. Método mixto explante-enzima

Este método es usado por Azandeh *et al* (33), y es muy similar al enzimático. Brevemente, después de la digestión enzimática se separa los explantes remanentes y se los coloca en placas de cultivo. La suspensión digerida es diluida en PBS y centrifugada para peletizar las células disgregadas, luego se colocan en otra placa para formar un cultivo independiente. La eficiencia de aislamiento de hWJ-MSCs entre este método y el de explante demostró que la confluencia celular se alcanzó en 24-48 horas vs 7-8 días respectivamente (32). Por lo tanto, aunque no hay diferencias significativas en cuanto a la tasa de proliferación cuando se comparan ambos métodos, el número de células es bastante mayor en el método mixto explante-enzimático luego del mismo número de días.

2.2.2. Método enzimático con el uso de colagenasa I y Tripsina

La colagenasa es una enzima tipo proteasa. Como su nombre lo indica, la colagenasa tipo I es capaz de digerir el colágeno tipo I, actuado en general sobre las secuencias prolina-aminoácido neutro-glicina-prolina, donde rompe el enlace entre el aminoácido neutro y glicina (38). Las colagenasas comerciales de *Clorstridium histolyticum*, son frecuentemente usadas en la digestión de tejidos

animales (39). Esta enzima tiene la capacidad de degradar las fibrillas de colágeno nativo de triple hélice, las cuales son comúnmente halladas en tejidos de tipo conectivo, como la piel, el tendón, los vasos sanguíneos y el hueso (38). Además, esta enzima es “gentil” con las células ya que no requiere agitación mecánica para actuar y trabaja bien a un pH y temperatura fisiológica. Estas características bioquímicas hacen que la colagenasa tipo I sea una excelente opción para aislar hWJ-MSCs de la gelatina de Wharton, conformada principalmente por tejido conectivo y matriz extracelular.

La tripsina, con o sin EDTA, se utiliza también en la disociación celular, disociación de tejidos y en pases de cultivos celulares (40). Se extrae generalmente del páncreas porcino y se presenta en solución con EDTA para quelar inhibidores u obstructores de la actividad enzimática. La tripsina es una peptidasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas, dando como resultado aminoácidos o péptidos más pequeños (41).

El método de digestión que hace uso de la colagenasa y tripsina, en conjunto, es el más exitoso ya que está asociado a mayores densidades celulares y a la expresión más alta de marcadores de superficie mesenquimales (5). El método colagenasa-tripsina presenta mejores propiedades de pluripotencialidad, de hecho este método se

cataloga como “superior para el aislamiento y cultivo de MSCs a partir de la gelatina de Wharton” (5).

Basado en lo mencionado en el párrafo anterior y en ensayos preliminares con el método explante y el método colagenasa-tripsina, el presente estudio se realizó con el último método para establecer un protocolo de aislamiento de células madre mesenquimales.

2.3. Aplicación Clínica: Regeneración de Tejidos

Una fuente celular ideal para regeneración de tejidos debería ser de fácil acceso y no controversial, proveer un número suficiente de células y presentar inmuno-compatibilidad. Las MSCs cumplen con estos requisitos y es por eso que su uso en investigación preclínica y clínica ha venido incrementando con el paso de los últimos años. Son varias las áreas en donde se ha probado la capacidad de estas células para ayudar en regeneración de tejidos, sobre todo en modelos animales, como el ratón.

2.3.1. En tejido óseo

Pese a que el hueso es un tejido vascularizado, con una aceptable capacidad de auto regeneración y habilidad de remodelamiento (42), no existe tratamiento satisfactorio para algunas lesiones serias (43). La capacidad de diferenciación osteogénica que las MSCs han demostrado en biomateriales osteoinductivos y bajo

señales químicas (44), podría ser aprovechada a futuro en ingeniería de este tejido. Por ejemplo, existen reportes donde se prueba la capacidad de diferenciación osteogénica de las hWJ-MSCs cuando son sembradas sobre andamios nanofibrosos de policaprolactona-colágeno-hidroxiapatita (45), cuando son encapsuladas en microesferas de alginato (46), en hidrogeles inyectables de fosfato de calcio/alginato (47) y cemento ósea fácilmente absorbible de fosfato de calcio (48), entre otros biomateriales.

La diferenciación *in vivo* de las hWJ-MSCs en un modelo de ratón también ha sido examinada. Se demostró que la implantación subcutánea de estas células precedió a la formación de hueso ectópica (49). Además, en otro estudio se detectó la presencia de osteoblastos por microscopía de transmisión electrónica, luego de 12 semanas de haber implantado un andamio de hidroxiapatita-colágeno-ácido poliláctico en el cual se habían sembrado hWJ-MSCs con anterioridad (50). Estos y otros estudios muestran un exitoso futuro de las hMSC y, sobre todo, las hWJ-MSCs, en ingeniería de tejidos. Se requerirán más estudios, especialmente con implantaciones subcutáneas en modelos de ratón, para luego evaluar la funcionabilidad de los andamiajes al ser expuestos a inducciones mecánicas, químicas y fisiológicas (44).

2.3.2. Ingeniería de tejido Cartilaginoso

El cartílago tiene una limitada capacidad auto regenerativa y después de una lesión, puede llegar a ser muy difícil que recupere su función (51). Más allá de las opciones con las que cuenta el paciente en la actualidad, como el uso de prótesis y cirugías invasivas que inducen la formación de tejidos fibrosos no deseables, la ingeniería de tejidos podría ser la alternativa óptima para atender esta problemática (52). Al evaluar la coexistencia de colágeno tipo I y II, la síntesis de matriz extracelular, y la formación de tejido cartilaginoso en cultivos de 3 dimensiones, las MSCs del cordón umbilical pueden ser consideradas como una mejor alternativa que las provenientes de la médula ósea; esto, para aplicaciones en ingeniería de tejido fibrocartilaginoso, como el del disco intervertebral y el del menisco de rodilla (44).

Liu *et al* (53), cultivaron hWJ-MSCs en altas densidades, en presencia de factor de crecimiento transformante $\beta 1$ y dexametasona, obteniendo así, secreción de matriz extracelular cartilaginosa e integración en una delgada pieza de membrana basada en células. Dicha membrana, al exponerse a un sistema de cultivo celular rotatorio, formó un redondo, opaco y brillante tejido tipo cartílago, el cual no era parte del andamio. Pese a que se requieren más estudios

para identificar los biomateriales idóneos y las técnicas para usarlos como andamios, la gelatina de Wharton es una prometedora fuente de células con capacidad de ser usadas en el tratamiento de lesiones del tejido en mención. Así lo sugieren diversos artículos científicos, donde se investigó el posible uso de estas células en ingeniería de cartílago, estudiando su diferenciación condrogénica en cultivos 3D con materiales biocompatibles (52, 54, 55).

2.3.3. Otras aplicaciones

Además de los estudios ya mencionados, existen muchos otros donde se trata de estudiar el potencial uso de las MSCs en el tratamiento de enfermedades relacionadas a otros tejidos (26, 56-58). Una de las posibles áreas de aplicación es en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I. Un reciente reporte mostró que las hWJ-MSCs se diferenciaron en precursores de islotes pancreáticos, produjeron insulina humana y respondieron a un challenge de glucosa por más de 12 semanas (57). En dicho estudio, se usó ratas, a las que se les indujo la enfermedad, como modelo.

Además, existen varios estudios donde se propone a las hWJ-MSCs como buenas candidatas para terapia cardiovascular (56, 59-63). Kadner *et al* (59, 60) y Schmidt *et al* (61, 62), cultivaron MSCs en andamios 3D de PGA/poly-4-hydroxybutyrate, produciendo un tejido

laminar con colágeno tipo I y III, GAGs, elastina y rigidez mecánica similar a la del tejido cardiovascular nativo. Incluso, Schmidt *et al* (63), lograron “endotelializar” su construcción, obtenida con el andamio y las MSCs. Para ello se usó perfusión de factor de crecimiento y tensión cíclica junto con células progenitoras endoteliales de la sangre del cordón umbilical humano (hUB-EPCs). No es difícil entonces, imaginar que en el futuro ambos tipos de células, hWJ-MSCs y hUB-EPCs, provenientes del cordón umbilical de niños a los que se les detectó tempranamente enfermedades congénitas de corazón, puedan ser tratados autológamente con construcciones bilaminares como la construida en el último estudio prescrito.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de Cordones Umbilicales

Para la obtención de cordones umbilicales humanos (hUCs), fue necesario establecer un convenio con el Hospital Luis Vernaza para que este los disponga, siempre y cuando la madre haya firmado un consentimiento informado (Anexo A). Los protocolos para la obtención de los hUCs, por parte del laboratorio de Biomedicina-ESPOL y los relacionados al uso que se les dio en esta investigación, fueron aprobados por el Comité de Bioética en Investigación del Hospital Luis Vernaza el 10 de Enero, 2014. Una renovación de la mencionada aprobación fue concretada en Febrero del 2015 (Anexo B).

Una vez firmado el consentimiento informado por parte de la madre, la placenta y el cordón fueron trasladados, en cadena de frío y bajo condiciones de esterilidad, a la Unidad de Trasplante de Órganos y Tejidos del Hospital Luis Vernaza. Una vez allí, en una campana de flujo laminar, utilizando técnicas de asepsia, el cordón fue cortado de la placenta y se preservó en un frasco estéril de 250 ml con tampón fosfato salino (PBS) a 4°C, por un tiempo máximo de 12 h (Anexo C). Posteriormente, el cordón fue transportado, en un “cooler” con un “coolpack,” al Laboratorio de Biomedicina, en donde el cordón se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su procesamiento.

3.2. Aislamiento de MSCs

La manipulación del cordón umbilical, así como las células derivadas de este, fueron siempre realizadas con la mayor asepsia posible y bajo una campana de flujo laminar tipo A2, previamente esterilizada con luz ultravioleta. También se usó siempre guantes de látex y alcohol al 70% para esterilizar manos, superficies de trabajo y utensilios en todo momento. Para la manipulación y los cortes realizados al cordón umbilical, siempre se usaba un equipo de disección previamente esterilizado en autoclave.

El primer paso del procesamiento del cordón consistió en su seccionamiento en trozos de aproximadamente 2cm, los cuales se

colocaban en una caja de Petri parcialmente llena de PBS. Cada sección se procesó independientemente en cada caja de Petri. Se realizó un corte longitudinal superficial (Anexo E), luego se identificó la vena, arterias y conducto amniótico; y de ser posible, se los retiraba. Se consideró como cordones aprovechables, para el propósito de aislar células madre, aquellos en los que la gelatina de Wharton podía ser visible en esta instancia. Con ayuda de las pinzas y el bisturí, se separaba pequeñas porciones de la mencionada gelatina (Anexo F), siempre teniendo mucho cuidado de no incluir el tejido epitelial de la *vaina* del cordón y/o tejido vascular.

Las pequeñas porciones de la gelatina de Wharton, que de ahora en adelante se denominarán “explantes”, se colocaron en un tubo cónico de 50ml conforme se separaban del cordón. Una vez culminado el proceso de extracción de explantes, se les realizaba 3 ciclos de lavado con PBS, con la finalidad de prepararlos para la digestión enzimática. Luego del último lavado, las suspensiones se centrifugaron a 500 g por 5 min. El sobrenadante se desechó con la ayuda de una pipeta descartable. Luego, el total de explantes extraídos, fueron divididos en tubos con volúmenes aproximadamente iguales (Anexo G), los cuales fueron procesados independientemente, de la siguiente forma: A cada tubo se añadió una solución enzimática que contenía colagenasa (Gibco, CA) diluida al 0,1% p/v en PBS. Luego se colocó los tubos en incubación, a 37 °C, 5% de

CO₂ y 95% humedad relativa (HR), durante 12, 14 o 16 horas; esto, según el tiempo asignado aleatoriamente a cada mitad de cordón umbilical en el diseño experimental.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión, se agregó a cada tubo 10ml de PBS. El tubo se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para facilitar la posterior extracción de la colagenasa diluida. Luego se agregó 1ml de tripsina (0.25% trypsin/EDTA) (Gibco), y el tubo se llevó a una agitadora-incubadora a 37 °C (MAXQ 4000, Thermo Scientific), 125 rpm, durante 15 min. La enzima se inactivó con 1 ml de suero fetal bovino (FBS) (Gibco) por tubo, seguido de una centrifugación para facilitar la eliminación del sobrenadante. Para no absorber los explantes disociados por las enzimas, este último paso se realizó con una pipeta serológica estéril descartable.

Llegado el momento, a cada tubo se le agregó aproximadamente 3 o 4 ml de medio de cultivo: Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) bajo en glucosa, suplementado con 10% de FBS y 1% de Antibiótico-Antimicótico (todos de Gibco). Antes de colocar las células en el envase de cultivo, éstas fueron cuantificadas en una cámara de Neubauer para estimar el número de MSCs aisladas. La suspensión celular se puso en un envase de cultivo de 25cm² (Anexo H) para ser incubada a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% HR.

Adicionalmente, también se probó el método de explante descrito en la sección 2.2.1.1. La separación de la gelatina de Wharton y su posterior lavado, se llevó a cabo de la misma forma que en el método enzimático, descrito en los párrafos anteriores. Luego los explantes de aproximadamente 2-3 mm fueron colocados en una placa de 6 pocillos junto con 1,5ml de medio por cada pocillo (Anexo I). Después, dicha placa se llevó a incubación a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% HR.

3.3. Cultivo Celular

Las células se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% HR. Cada 2-3 días se reemplazó el medio de cultivo, para lo cual simplemente se desechaba el medio usado con una pipeta pasteur y una bomba al vacío, y luego se agregaba el nuevo medio. Cuando las células alcanzaron la confluencia, es decir, cuando cubrieron aproximadamente el 70% de la superficie de la placa, se expandió el cultivo de la siguiente forma: se lavó la monocapa celular con PBS y después se aplicó tripsina-EDTA (0,25%) por 5 min para desprender las células de la superficie de la placa. Luego se desactivó la enzima con FBS del medio de cultivo. Las células resuspendidas fueron centrifugadas a 500 g por 5 min, el sobrenadante se descartó y el pellet celular se resuspendió con nuevo medio para ser sembrado en nuevas placas de cultivo. En cada pase de proliferación (desprendimiento celular para resiembra en nuevas placas a

una densidad menor) se tomó 50µL de muestra, justo antes de resembrar, para realizar un conteo celular y comparar la eficiencia proliferativa de las células, según las diferentes horas de digestión con colagenasa I, con las cuales se las aisló las células inicialmente.

Durante todo el proceso de cultivo, las células fueron monitoreadas en el microscopio invertido, el mismo con el que se realizaron capturas de imagen utilizando el software MIDevices.

3.4. Cálculo del Tiempo de doblaje de población

Con el propósito de encontrar el método más eficiente para aislar MSCs, a partir de la gelatina de Wharton, diferentes horas de digestión con colagenasa I fueron ensayadas. Como se lo menciona en las secciones 1.2 y 1.3, la proliferación en los cultivos provenientes de las diferentes horas de digestión fue monitoreada. Una vez obtenidos los datos de interés, se procedió a calcular el tiempo de doblaje de población (PDT) usando la formula $PDT=t*\lg2/(\lg NH-\lg NI)$. Donde NI es el número de células inicial o número de células sembradas, NH es el número de células cosechadas y t es el tiempo de cultivo en horas. Dicho PTD fue calculado al llegar al segundo pase.

3.5. Criopreservación

Las MSCs se desprendieron de las placas de cultivo mediante la acción enzimática de la tripsina, como se describió anteriormente. Luego de agregar medio DMEM con FBS, la suspensión celular fue centrifugada a 500g durante 5 minutos. El taco celular fue resuspendido en medio de crio preservación, el cual consistió de 10% dimetil-sulfóxido (DMSO) en FBS, a una densidad de 1×10^6 células/ml. Esta suspensión se distribuía en viales para criopreservación, según el número celular, y se colocaron a -80°C por 12 h, para finalmente ser trasladados a tanques de nitrógeno líquido, para su almacenamiento a largo plazo.

A fin de determinar el mantenimiento del fenotipo celular, se descongeló 3 viales y, luego de mezclar las células con DMEM + FBS, se sembraron en nuevas placas de cultivo. Luego de 12h, se realizó un cambio de medio para descartar el DMSO. Después de restaurar el cultivo las células fueron sometidas a ensayos de diferenciación.

3.6. Ensayos de Diferenciación Osteogénica

Para demostrar la capacidad de diferenciación de las MSCs, estas se sometieron a diferenciación osteogénica *in vitro*. Dicha diferenciación se verificó mediante el monitoreo de marcadores o indicadores estándar como lo son: Actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y deposición de calcio. Primero, un lote de las MSCs aisladas, fueron sembradas en placas de 96

pocillos a una densidad de 3000 células/cm², 10 horas después, el medio común de cultivo fue reemplazado por un medio de inducción de diferenciación osteogénica (MOst), el cual consistió de DMEM, bajo en glucosa, suplementado con 10% FBS, 1% antibiótico-antimicótico, 10⁻⁸ M dexametasona, 10mM beta-glicerol fosfato, y 0,05 mM ácido ascórbico. El cultivo se realizó durante 4, 7, 14 y 21 días, con cambios periódicos de medio, a 37 °C y 5% CO₂. Medio DMEM, común de cultivo, fue usado como control. Una vez transcurridos los días establecidos, se evaluaron marcadores de proliferación y diferenciación osteogénica.

3.6.1. Proliferación Celular

La proliferación celular se probó por medio del kit *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*. Este se basa en el compuesto MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), el cual es reducido por enzimas mitocondriales de células viables a una sal de formazán púrpura, cuya absorbancia puede ser leída en un espectrofotómetro (lector de placas) a una longitud de onda de 490 nm. Al cumplirse cada día del ensayo (4, 7, 14 y 21 días), se desechó el medio en cada pocillo, se realizó dos lavados con PBS y se añadió el MTS diluido 1:5 en medio de cultivo. Luego de una incubación de 75 minutos a 37 °C, el producto de la reacción en cada pocillo se trasladó

a una nueva placa para agregarle 10 μL de 0,1% SDS, para parar la reacción hasta proceder a la lectura de absorbancia.

3.6.2. Actividad de fosfatasa Alcalina

La actividad de fosfatasa alcalina (ALP) también se cuantificó mediante ensayos espectrofotométricos. Para ello, los pocillos originales, conteniendo las células, fueron preparados de la siguiente forma: se realizó 3 lavados con PBS, se colocó agua estéril ultrapura, y se obtuvo un lisado de las células por medio de 3 ciclos de congelación-descongelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Un volumen de 20 μL del lisado celular se añadió, en una proporción 1:3, al sustrato p-nitrofenil fosfato del kit *Alkaline phosphatase yellow (pNPP) liquid substrate system for ELISA*. El producto final de dicho sustrato, después de la incubación realizada a temperatura ambiente, que en este caso duró 30 minutos, es el compuesto amarillo p-nitrofenol, que fue leído a 405nm. Estándares de p-nitrofenol, de 0; 12,5; 50; 100; y 200 μM , fueron preparados y leídos junto con las muestras, en un lector de microplacas (Synergy HT, Biotek). La curva estándar (Anexo J) se usó para estimar la concentración de p-nitrofenol de las muestras, en μM .

3.6.3. Deposición de calcio

La cantidad de calcio depositado se determinó utilizando el método de o-crisolftaleína complexona. Para extraer el calcio, el resto de cada lisado celular (80 μ L), mencionados en la sección anterior, fueron mezclados con ácido acético 1N, en volúmenes iguales, y luego se colocó las placas en agitación (Zaranda VRN-200, Gemmy), toda la noche. Al siguiente día se agregó 180 μ L de un preparado de: reactivo de color de calcio + tampón de calcio (kit *CALCIUM oCPC*, Pointe Scientific Inc), mezclados 1:1, a 20 μ L de cada muestra. Esta solución captura el calcio y, al reaccionar, resulta en un color púrpura. De igual manera, en este ensayo se preparó soluciones estándar, utilizando concentraciones de cloruro de calcio, de 0; 12,5; 25; 50; 100; y 200 μ g/ml para la estimación del calcio depositado por muestra (Anexo K). La lectura se realizó a una longitud de onda de 575nm y los valores se expresaron en μ g/ml.

3.7. Citocompatibilidad del Derivado de Mesocarpio de Cacao

Debido a que el propósito en general de esta tesis es el impulso de estudios en ingeniería de tejidos, las MSCs aisladas fueron utilizadas para probar la citocompatibilidad *in vitro* de un material derivado del mesocarpio de la mazorca del cacao, el cual fue obtenido por la Ing. Sandra Heredia como tema de tesis en la Facultad de Ingeniería Química

de la ESPOL. Se realizó este bioensayo para probar su potencial como andamio orgánico de crecimiento celular. Para tal propósito, las células aisladas en este estudio fueron sembradas a una densidad de 5000/cm², en una placa de 96 pocillos. Luego de 8 horas el medio regular de cultivo fue reemplazado por el mismo medio conteniendo 1mg/ml del biomaterial pulverizado, derivado de la homogenización de esponjas porosas obtenidas mediante el tratamiento del mesocarpio de la mazorca de cacao con los siguientes compuestos: NaOH 1N, NaOH 0,1N, CH₃COOH 1N, CH₃COOH 0,1N, H₂O y sin tratar (Anexo L). Después de 72 horas de cultivo, el ensayo MTS (ver sección 3.6.1) fue realizado.

Células cultivadas en medio regular de cultivo “DMEM,” en ausencia del biomaterial, fueron usadas como control. Para conocer el índice de citocompatibilidad (IC), el parámetro Cociente de crecimiento relativo fue calculado (RGR) con la siguiente fórmula: $RGR = (Axi/Ac) * 100$, donde Axi es la absorbancia en el medio con el tratamiento de interés y Ac es la absorbancia en el cultivo control. El IC es equivalente al RGR de acuerdo a los valores de la Tabla 1.

Tabla 1: Equivalencia entre el Cociente de Crecimiento Relativo y el Índice de Citocompatibilidad.

RGR (%)	0	1-24	25-49	50-74	75-99	>100
IC	0	1	2	3	4	5

(64)

3.8. Análisis Estadístico

Los métodos o pruebas usadas para realizar el análisis de cada ensayo, fueron seleccionados según la valoración de las principales características de los datos. Para examinar la eficiencia proliferativa y de aislamiento celular se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, mientras que su equivalente paramétrico, el Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, se utilizó para estudiar la citocompatibilidad del derivado de mesocarpio de cacao, después de probar que las principales asunciones estadísticas de normalidad y homocedasticidad se cumplieran. Dicho ANOVA fue complementado con el contraste de comparaciones múltiple *a posteriori*, de Tukey. Finalmente, en los demás casos se realizó la prueba U de Mann-Whitney para dos grupos independientes. Para el efecto de este último caso, cuando la distribución de la variable dependiente en los dos grupos de la variable independiente no compartió una forma similar, se procedió a transformar los datos. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis utilizados en este estudio fueron llevados a cabo mediante el software STATISTICA, mientras que las gráficas descriptivas fueron realizadas en Microsoft Excel.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1. Eficiencia en aislamiento y proliferación celular según el tiempo de digestión con colagenasa tipo 1

Todos los métodos utilizados permitieron el aislamiento de células. Los tiempos de digestión realizados (3, 14 y 16 horas) derivaron en células con una morfología fibroblastoide sin ninguna diferencia aparente (Fig. 1). En cuanto al número de células aisladas en cada tiempo de digestión, con la ayuda de colagenasa tipo I, el grupo de 3 horas presentó los valores más altos (Tabla 2). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 2). Un caso similar resultó de la variable *Tiempo de doblaje de población*, pues no se encontraron diferencias significativas (Fig. 3).

También se lograron aislar células con el uso del método explante (Fig. 4).

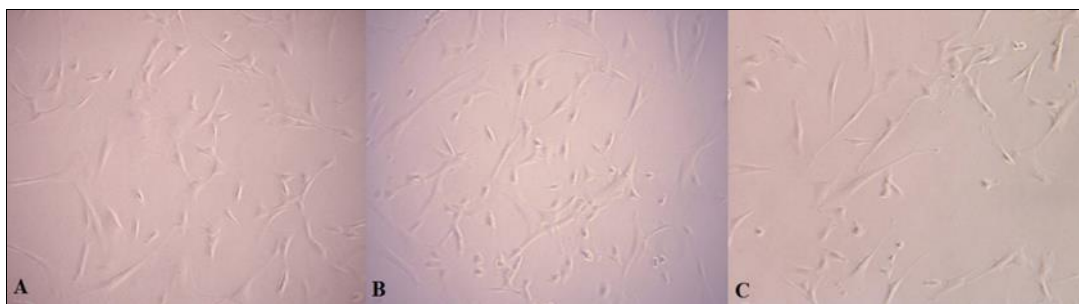


Figura 1 Células aisladas en con el método enzimático.

Células aisladas con el método enzimático observadas a un aumento de 10x. (A): Células aisladas con 3 horas de digestión enzimática. (B): Células aisladas con 14 horas de digestión. (C): Células aisladas con 16 horas de digestión. Las 3 poblaciones muestran una morfología similar.

Tabla 2: Número de células aisladas y tiempo de doblaje de población según el tiempo de digestión enzimática

Horas de Digestión	Células Aisladas	PDT (horas)
16	172040 \pm 81973	94 \pm 20
14	173037 \pm 28065	111 \pm 30
3	203626 \pm 25334	80 \pm 6

Se presenta los parámetros *Células aisladas* y *Tiempo de doblaje de población* (PDT), resultantes en el aislamiento con cada tiempo de incubación o digestión enzimática. Los valores dados son presentados como la media \pm la desviación estándar.

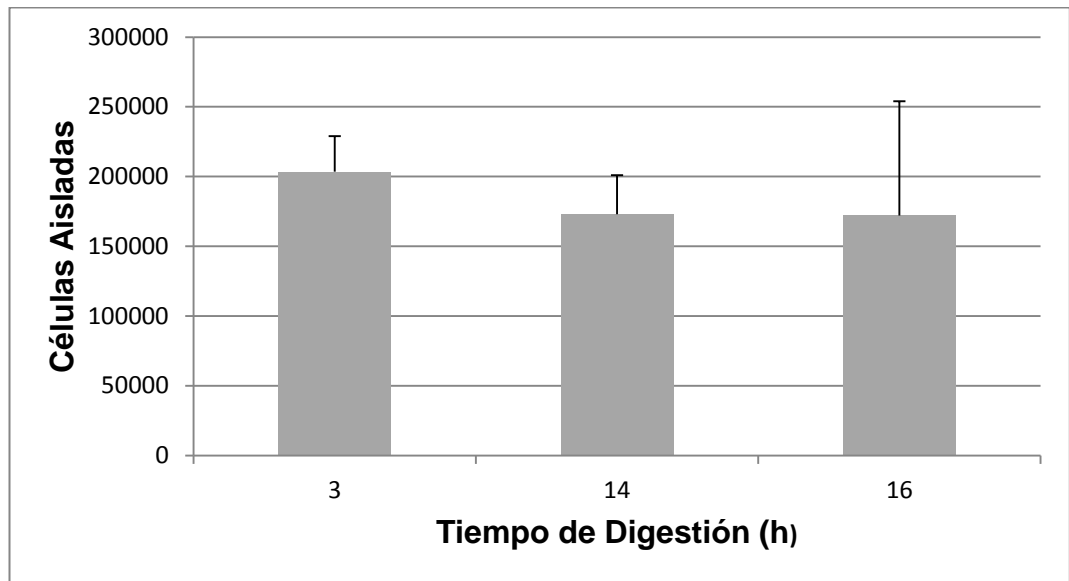


Figura 2 Células aisladas vs Tiempo de digestión enzimática utilizando colagenasa tipo I.

Número de células aisladas con la ayuda de colagenasa tipo I, en cada tiempo de digestión. Se presentan las medias y desviaciones estándar ($n=4$). No se detectaron diferencias significativas con la prueba ANOVA de Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

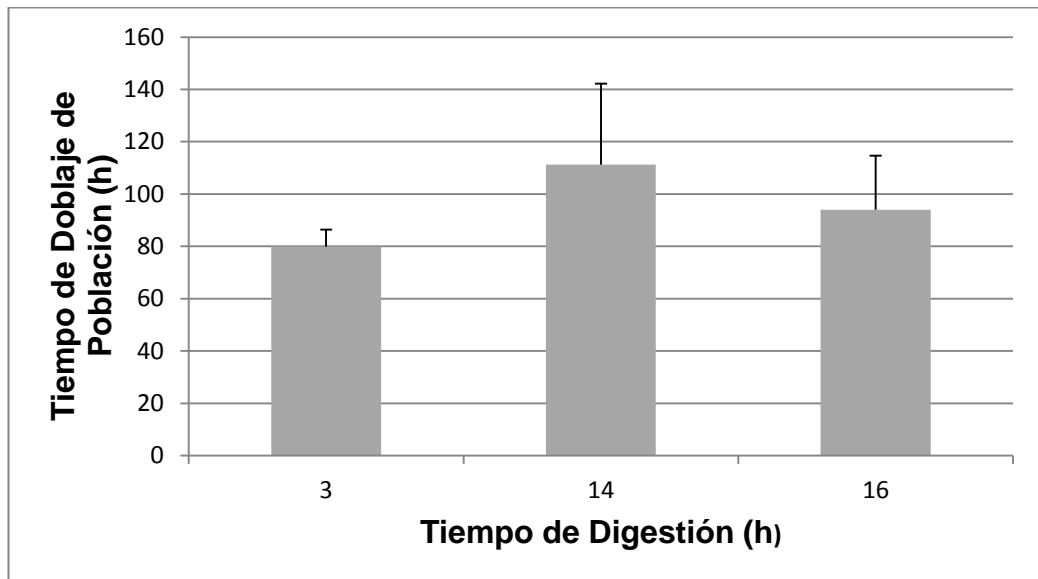


Figura 3 Tiempo de doblaje de población vs Tiempo de digestión enzimática.

Parámetro *Tiempo de doblaje de población* en cada tiempo de digestión, con la ayuda de colagenasa 1. Se presentan las medias y desviaciones estándar ($n=4$). No se detectaron diferencias significativas con la prueba ANOVA de Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

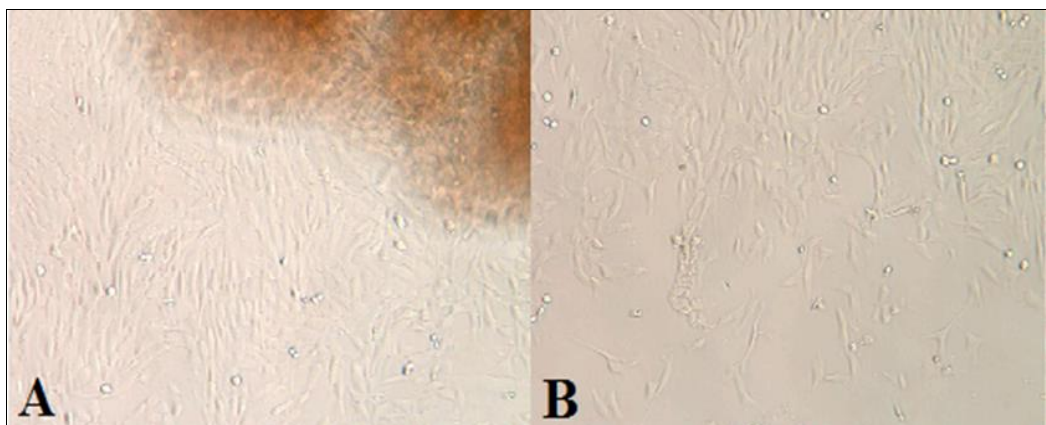


Figura 4 Células aisladas con el método explante.

Células observadas al microscopio óptico (10x) aisladas con el método de “explante”. (A): Se observa la gelatina de Wharton y las células que han migrado a la placa. Las células cercanas al tejido, se encuentran distribuidas en una densidad alta. (B): Las células proliferan y migran, y empiezan a cubrir toda la superficie disponible.

4.2. Diferenciación Osteogénica

4.2.1. Proliferación Celular

La absorbancia leída a 490nm, posteriormente al ensayo de MTS, es una medida proporcional a la cantidad de células viables; y ya que en todos los grupos la densidad de siembra fue la misma, la absorbancia se puede usar como indicador para comparar la proliferación. La Figura 5 muestra las comparaciones entre las células cultivadas con medio DMEM y medio de diferenciación osteogénica (MOst). Como se observa, las líneas de tendencia muestran un comportamiento similar al comportamiento típico de crecimiento poblacional de células en cultivo. Entre los días 4 y 7, la curva aparenta una fase latente o de adaptación; luego hacia el día 14 se observa un crecimiento exponencial; y finalmente, parece haber una pequeña fase estacionaria, y posterior declive, después del día 14. Pese a que la línea de tendencia del medio DMEM es mayor que la

del MOst, no se encontraron diferencias significativas al comparar ambos medios en los diferentes días de cultivo.

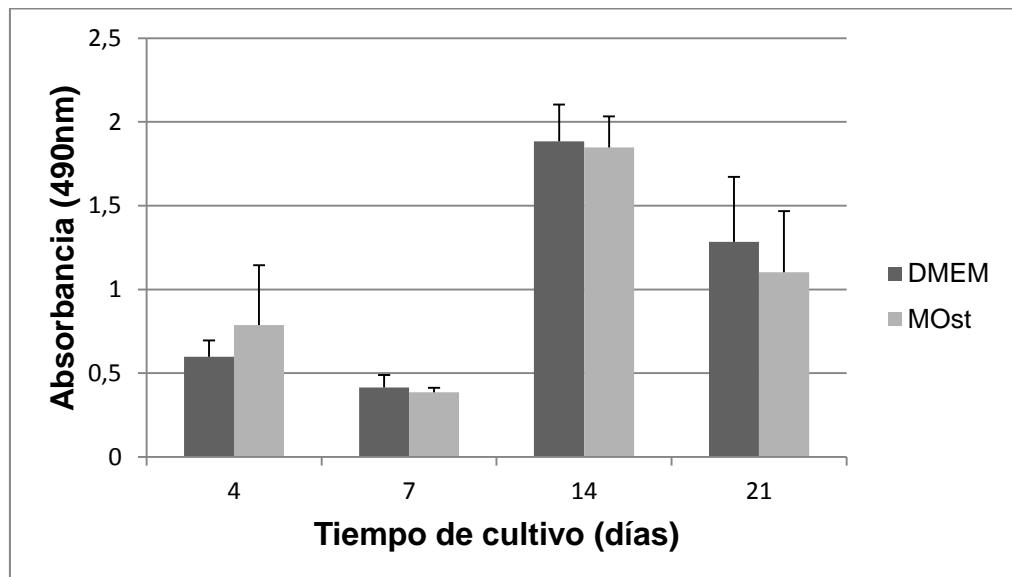


Figura 5 Proliferación celular con y sin medio MOst.

Cultivos de hWJ-MSCs fueron expuestos a medio de diferenciación osteogénica “MOst”, o medio regular de cultivo “DMEM”, usado como control. La proliferación se estimó por MTS. Se representa las medias con sus respectivas desviaciones estándar ($n = 5$). Luego del contraste con la prueba U de Mann-Whitney, no se detectaron diferencias significativas en ningún día de cultivo ($p > 0,05$).

4.2.2. Fosfatasa Alcalina

Como se mencionó en la sección 3.6.2, al exponer el sustrato del kit a la reducción de la fosfatasa alcalina (ALP), se obtiene p-nitrofenol, un compuesto amarillo. Por lo tanto, para comparar la

actividad de fosfatasa alcalina se calculó la concentración de dicho producto. La figura 6 muestra que los comportamientos de la mencionada actividad, fueron distintos según el medio en el que se mantuvieron las células y el tiempo de exposición. La actividad promedio de ALP en DMEM fue similar en los días ensayados. Por otro lado, el grupo de células expuestas a MOst mostró un pico en el día 14, cuya media fue de aproximadamente 2477 ± 246 uM. Al comparar estadísticamente la actividad de ALP en cada día, según el medio, se encontraron diferencias significativas en los días 7, 14 y 21, siendo la mayor diferencia la del día 14.

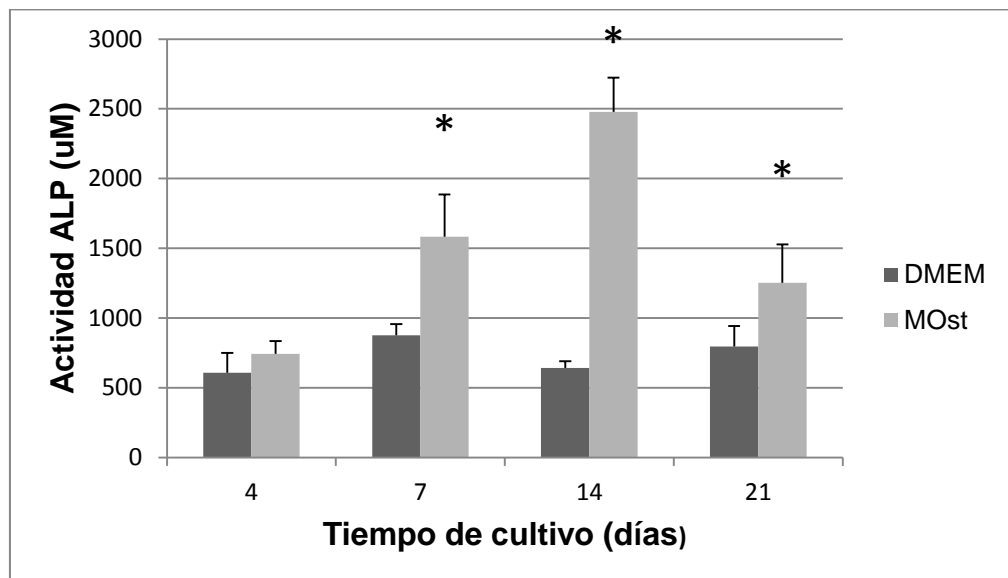


Figura 6 Actividad de fosfatasa alcalina.

Análisis de ALP según el producto de su actividad, p-nitrofenol, en los diferentes días de cultivo de las hWJ-MSCs expuestas al medio de diferenciación osteogénica “MOst”, y medio regular de cultivo “DMEM”,

usado como control. Se representa las medias con sus respectivas desviaciones estándar ($n = 6$). El asterisco denota diferencias significativas por medio del análisis U de Mann-Whitney (Día 7: $p = 0,0022$, Día 14: $p = 0,0021$, y Día 21: $p = 0,0043$).

4.2.3. Deposición de Calcio

Para la deposición de calcio, según el medio en que se mantuvieron las células, se realizaron comparaciones en los días 4, 14 y 21. Como la figura 7 lo denota, la concentración de calcio en el día 4 fue muy similar para ambos medios. Sin embargo, en los días 14 y 21 se puede observar un aumento significativo en los cultivos en presencia de MOst, en comparación con aquellos realizados en medio DMEM, siendo el último día de ensayo en el que se obtuvo la media más alta con un valor de 33 ± 6 ug/ml. En ambos días, 14 y 21, existen diferencias significativas.

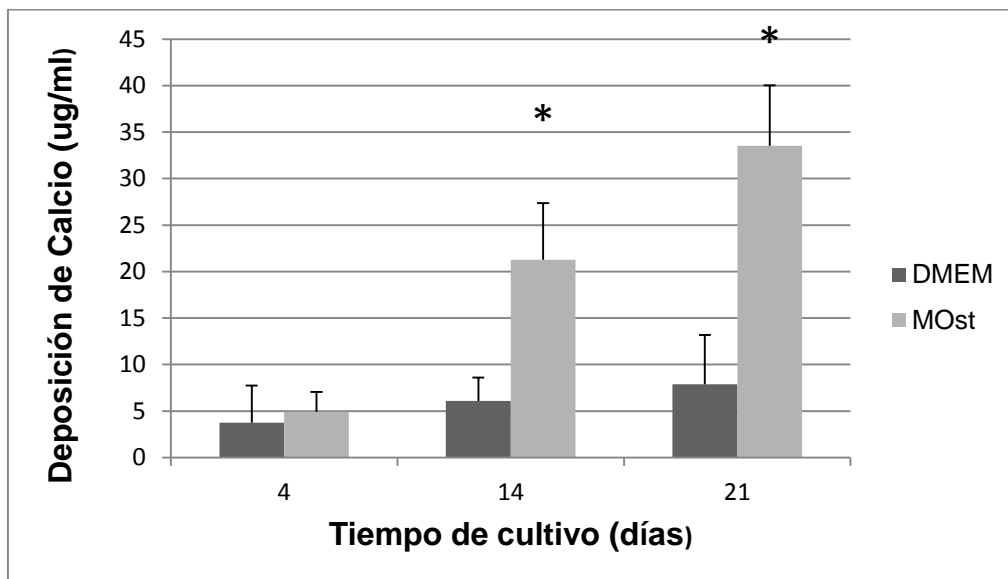


Figura 7 Deposición de Calcio en cultivos de células madre en diferentes medios.

Análisis del calcio depuesto en los diferentes días de cultivo de las hWJ-MSCs expuestas al medio de diferenciación osteogénica “MOst”, y medio regular de cultivo “DMEM”, usado como control. Se representa las medias con sus respectivas desviaciones estándar ($n = 5$). El asterisco denota diferencias significativas por medio del análisis U de Mann-Whitney ($p = 0,0079$ y $p = 0,0079$ para los días 14 y 21, respectivamente).

4.3. Citocompatibilidad del Derivado de Mesocarpio de Cacao

Como fue mencionado, para probar la citocompatibilidad de cada material tratado, el cociente de crecimiento relativo (RGR) fue calculado en base a la absorbancia de las células cultivadas sin ningún material. La

media del RGR para el material *sin tratar* fue la mayor, mientras que el tratamiento con *CH₃COOH*, presentó los valores más bajos para dicho RGR, y por lo tanto su IC fue el más bajo (Tabla 3 y Fig. 8). El ANOVA de una vía, realizado para comparar las ICs, estableció diferencias significativas entre las medias de los diferentes tratamientos con un p de 0,015 (Información no mostrada), por lo que se procedió a realizar el análisis *post hoc* de Tukey, donde se encontró diferencias significativas entre las medias del grupo sin tratar vs *CH₃COOH* 1 y 0,1 N.

Tabla 3 Índices de Citocompatibilidad para los tratamientos probados

Tratamiento	RGR	IC
NaOH 1N	97±12	4
NaOH 0,1N	102±25	5
Sin tratar	122±31	5
CH ₃ COOH 1N	80±11	4
CH ₃ COOH 0,1N	74±08	3
H ₂ O	98±22	4

Se presenta los ICs de cada tratamiento puesto a prueba según sus RGRs; de los cuales se muestra la media y desviación estándar.

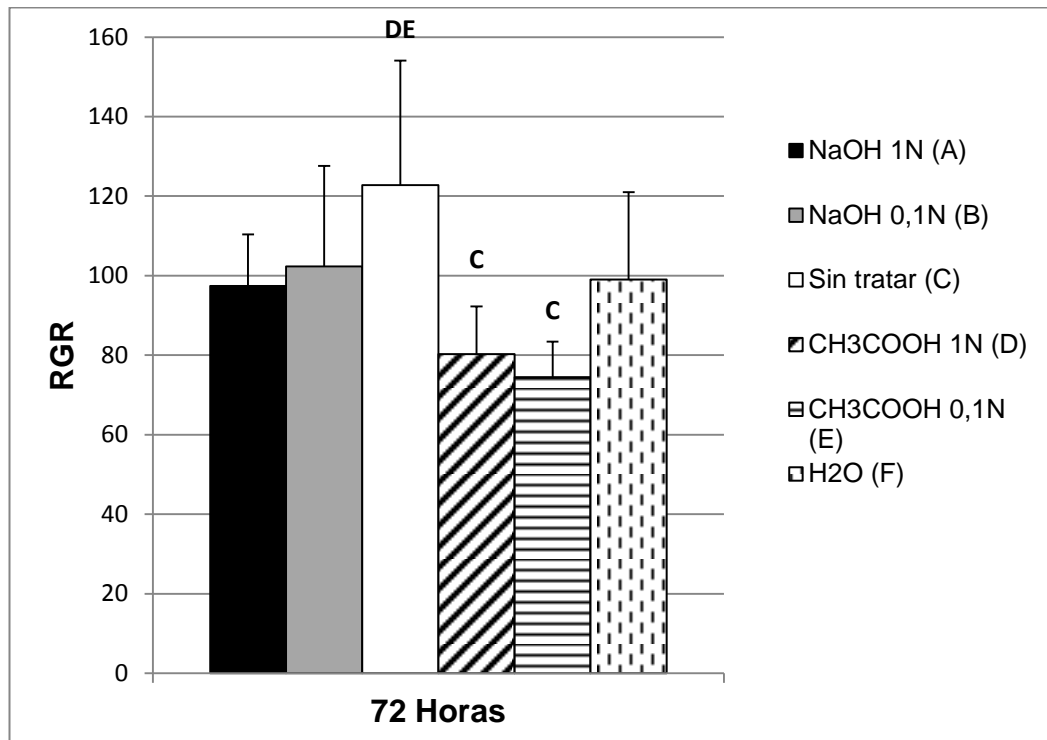


Figura 8 Análisis del Cociente de Crecimiento Relativo.

RGR después de 72 horas de cultivo de las hWJ-MSCs expuestas a los tratamientos NaOH 1N, NaOH 0,1N, Sin tratar, CH₃COOH 1N, CH₃COOH 0,1N y H₂O. Medio común de cultivo “DMEM” fue usado como control. Las letras sobre las barras denotan los grupos entre los cuales existen diferencias significativas según el contraste de Tukey (C-D: $p = 0,032$ y C-E: $p = 0,011$).

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (hWJ-MSCs) tienen excelente capacidad proliferativa y potencial de diferenciación (9). Además sus propiedades inmunogénicas e inmunomodulatorias son bastante útiles para trasplantes alogénicos (32), y la fuente de estas células es un tejido que normalmente se descarta. Por ello, como se menciona en el Capítulo II, las hWJ-MSCs han captado gran atención para su uso en regeneración de tejidos. Los procedimientos usados para el aislamiento de hWJ-MSCs hallados en la literatura son muy diversos y ningún protocolo en particular ha sido introducido para ser usado de forma estándar (5). Sin embargo, Salehinejad *et al* (5), encontraron que los métodos de aislamiento tienen una influencia significativa en la pureza y capacidad de proliferación de las MSCs obtenidas. Por lo tanto, en este estudio se escogió uno de los métodos más exitosos reportados para el

aislamiento de hWJ-MSCs, el de colagenasa-tripsina (ver sección 2.2.2). Por otro lado, al comparar diferentes horas de incubación con la enzima colagenasa tipo I, estas no tuvieron un efecto considerable en la dinámica proliferativa o eficiencia de aislamiento de células, lo que implica un rango amplio de tiempo para el investigador en el procesamiento de las muestras. Salehinejad *et al* (5) obtuvieron un rendimiento de aislamiento promedio de 360.000 células por cordón umbilical cuando usaron la digestión de 3 horas en condiciones similares a las trabajadas aquí, donde se obtuvo un promedio de 400.000. Pese a esta similitud, existe una considerable diferencia en cuanto al PDT promedio presentado en este documento y los reportados en otros estudios (65, 66), los cuales son de aproximadamente la mitad. Esta diferencia podría explicarse por las notables diferencias existentes entre protocolos de aislamiento y cultivo de las publicaciones citadas, y es por ello que se recomienda realizar un estudio donde se trabaje con más datos y se llegue a pases mayores para mejorar la precisión y confiabilidad de los resultados.

Una de las principales características que las hWJ-MSCs deben poseer, es su capacidad de diferenciarse en adipocitos, condroblastos y osteoblastos (6, 53). Por ello la diferenciación osteogénica fue inducida y evaluada. Según Huang *et al* (67), la diferenciación osteogénica *in vitro* tiene 3 etapas: Primero hay un pico de proliferación alrededor del día 4; la segunda etapa, de diferenciación temprana, la caracteriza la fuerte expresión de fosfatasa

alcalina (ALP) entre el día 5 y 14, con un pico de expresión dentro de este rango de tiempo (68); y en la tercera etapa, entre el día 14 y 28, hay una maduración de los osteoblastos, matriz de colágeno tipo I es liberada y el calcio y fosfato empieza a depositarse en ella (69). Aunque en el ensayo realizado en la presente investigación, el pico de expresión de ALP no se presentó hasta el día 14, las células cultivadas con MOst presentaron una actividad de notable aumento y posterior disminución, lo cual es comparable con los resultados de otros reportes (70, 71), donde las MSCs cultivadas en medio DMEM también presentaron una actividad notable de ALP. Células en medio DMEM como células en MOst presentaron valores basales de deposición de calcio a los 4 días de incubación; sin embargo, las células tratadas con medio osteogénico mostraron un incremento significativo de deposición de calcio a los 14 y 21 días. Las MSCs no deberían presentar valores apreciables de calcio según lo reportado en otro estudio (71). Los valores obtenidos en este estudio podrían explicarse por un nivel basal debido a una posible demora entre el momento de agregar los reactivos del kit *CALCIUM oCPC* (ver sección 3.6.3) a las muestras. La deposición de calcio de las células en DMEM también puede deberse a la presencia de rojo de fenol en este, el cual ha demostrado actuar como impulsor de cierto grado de osteodiferenciación, pues Lysdahl *et al* (72), encontraron un aumento en actividad de ALP en cultivos de MSC utilizando DMEM con rojo de fenol,

mientras que la encontrada en ausencia del colorante fue prácticamente imperceptible por el método de medición utilizado.

En el presente estudio se obtuvo valores de proliferación no consistentes con el comportamiento de diferenciación que se acaba de mencionar, pues las células diferenciadas no proliferan o lo hacen a una tasa menor que las células progenitoras (67). Sin embargo, las diferencias claramente significativas en actividad de ALP y deposición de calcio en las células expuestas a medio de diferenciación osteogénica (MOst), comparadas con las expuestas a medio regular, sugieren que al menos cierta parte de la población de células aisladas puede ser considerada como tipo MSCs.

Varios estudios previos han probado y propuesto diferentes compuestos y materiales para ser usados en la regeneración de diversos tejidos (73-75), incluyendo el hueso (45, 76). En el presente trabajo se ensayó, de manera preliminar, si un derivado del mesocarpio del cacao puede soportar la viabilidad y proliferación celular, para lo cual se usó las células aisladas tipo hWJ-MSCs. Después de obtener y analizar los datos del ensayo de MTS (ver sección 3.7) en los diferentes tratamientos, los derivados de cacao “sin tratar” y “NaOH 0,1N” mostraron Índices de citocompatibilidad (IC) de 5, siendo “sin tratar” el tratamiento con el Cociente de crecimiento relativo (RGR) más alto (Tabla 2). Todos los tratamientos presentaron ICs que indican citocompatibilidad, exceptuando CH₃COOH 0,1N. Este último, al tener un

RGR menor a 75%, no se considera citocompatible, y por ello no es apto como biomaterial según lo estándar en este tipo de estudios (77). Aparentemente en este material las células permanecieron viables y proliferaron, e incluso, llegaron a multiplicarse de mejor forma que en el medio de cultivo regular. Este es el caso del material *sin tratar*, donde el RGR fue de 122%, y aparece como la mejor alternativa para producirlo y someterlo a otros niveles de estudio en bioseguridad y biofuncionalidad, tales como genotoxicidad e histocompatibilidad respectivamente, los cuales son necesarios previo a los estudios clínicos (78).

En resumen, la actividad de ALP y la deposición de calcio sugieren la diferenciación de las células aisladas a células de tejido óseo, lo que implica que las células obtenidas del cordón umbilical poseen características de MSCs. Sin embargo los valores obtenidos no son tan altos, o consistentes, como los de otros estudios (70, 71, 79). Una explicación para esta discrepancia puede deberse a que las células fibroblastoides, llamadas MSCs, y aisladas de distintas fuentes, pueden ser poblaciones bastante heterogéneas, de las cuales solo una proporción es progenitora (12). Por eso es que en el lenguaje inglés, el término “stem” fue cambiado por “stromal”, aunque ambos son representados por las iniciales MSCs (13). Es así que con el presente documento, al referirse a “MSCs”, no se declara que el protocolo propuesto permite el aislamiento directo de “mesenquimal stem cells”, sino más bien, de “mesenquimal stromal cells”. Adicionalmente estas

células pueden someterse a procesos de purificación, y es por ello que este estudio se manifiesta que las hWJ-MSCs pueden ser aisladas con el proceso de Colagenasa-tripsina en 3, 14 o 16 horas de incubación. Se espera que esta primera implementación tecnológica de células madres sirva de base para una línea de investigación para futuras aplicaciones clínicas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

La gelatina de Wharton humana es una importante fuente para el aislamiento de células madre mesenquimales que tengan como destino la investigación o la aplicación clínica.

Incubación con colagenasa tipo I por 3, 14 y 16 horas, usando la metodología colagenasa-tripsina, es una opción apropiada para el aislamiento de células madre de la gelatina de Wharton humana.

DMEM bajo en glucosa, suplementado con 10% FBS, 1% antibiótico-antimicótico, 10^{-8} M dexametasona, 10mM beta-glicerol fosfato, y 0,05 mM ácido ascórbico; es un medio útil para la inducción de diferenciación

osteogénica si se sigue un protocolo similar al reportado en este documento.

El derivado del mesocarpio de cacao, sustrato que ha sido desarrollado localmente, se muestra como una alternativa prometedora para el crecimiento tridimensional de células madre.

6.2. Recomendaciones

Pese a que en este estudio no se hallaron diferencias significativas al comparar las diferentes horas de digestión sobre la eficiencia proliferativa y de aislamiento de las células madre de la gelatina de Wharton humana, se recomienda realizar un estudio más profundo con más datos y durante pases mayores. También se recomienda usar el tiempo de digestión de 3 horas puesto que es el más corto y además es el más eficiente según el reporte de otros autores (5).

Según las experiencias adquiridas durante la realización de este estudio, se recomienda monitorear constantemente las células madre en cultivo, ya que el permitir la confluencia más allá del 70%, durante un tiempo

considerable, podría implicar la pérdida gradual de la capacidad de diferenciación y proliferación de las células.


Se recomienda siempre realizar un conteo de las células con las que se cuenta y realizar la siembra a densidades bajas de 1000-5000/cm². Esto ayudará a mantener el fenotipo de las células madre y además, las MSCs proliferan más eficientemente al practicar esta actividad con ellas (80).

También se recomienda realizar una PCR en tiempo real para evaluar la expresión de marcadores moleculares de diferenciación osteogénica.

Finalmente, se recomienda usar la técnica de citometría de flujo para caracterizar las poblaciones celulares aisladas y determinar su heterogeneidad.

ANEXOS

Anexo A: Ejemplo de Consentimiento Informado


34-019
 Junta de Beneficencia de Guayaquil
 Hospital Gineco-Obstétrico "Enrique C. Sotomayor"

INSTITUCIÓN DEL SISTEMA		UNIDAD OPERATIVA	COD. UO			COD. LOCALIZACIÓN			NUMERO DE HISTORIA CLÍNICA
Junta de Beneficencia de Guayaquil		Hospital Enrique C. Sotomayor	PARROQUIA	CANTÓN	PROVINCIA	2	1	9	12-18-19

APELLIDO PATERNO: _____ APELLIDO MATERNO: _____ NOMBRES: _____ SEXO: _____ / SALUD: _____ CABA: _____ FICHA: _____ HOJA: _____

18/7/2018

1 AUTORIZACIÓN PARA CIRUGIA, TRATAMIENTO CLÍNICO O PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO
 DECLARO QUE NINGUN PROFESIONAL O FUNCIONARIO DE ESTE ESTABLECIMIENTO DE SALUD HA REALIZADO PROCEDIMIENTOS PARA PROVOCAR ESTE ABORTO Y QUE ASUMO LIBRE Y VOLUNTARIAMENTE PARA RECIBIR EL TRATAMIENTO NECESARIO PARA MI ENFERMEDAD

NOMBRE DEL PACIENTE	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL O TESTIGO	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA

2 EXONERACIÓN DE RESPONSABILIDAD POR ABORTO
 DECLARO QUE NINGUN PROFESIONAL O FUNCIONARIO DE ESTE ESTABLECIMIENTO DE SALUD HA REALIZADO PROCEDIMIENTOS PARA PROVOCAR ESTE ABORTO Y QUE ASUMO LIBRE Y VOLUNTARIAMENTE PARA RECIBIR EL TRATAMIENTO NECESARIO PARA MI ENFERMEDAD

NOMBRE DEL PACIENTE	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL O TESTIGO	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA

3 EXONERACIÓN DE RESPONSABILIDAD POR ABANDONO DE HOSPITAL SIN AUTORIZACIÓN MÉDICA
 DECLARO QUE ME RETIRO VOLUNTARIAMENTE DE ESTE ESTABLECIMIENTO DE SALUD Y EXCUSO AL PROFESIONAL TRATANTE Y AL PERSONAL ADMINISTRATIVO POR LOS RIESGOS A LA SALUD, QUE ME HAN ADVERTIDO CLARAMENTE

NOMBRE DEL PACIENTE	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
NOMBRE DEL TESTIGO	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA
NOMBRE DEL PROFESIONAL DE LA SALUD	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA

4 RETIRO DE MENOR DE EDAD O PERSONA INCAPACITADA
 DECLARO QUE RETIRO AL PACIENTE DE ESTE ESTABLECIMIENTO DE SALUD, BAJO MI RESPONSABILIDAD DEBIDAMENTE CERTIFICADA, CON LA AUTORIZACIÓN MÉDICA IRRESPONDIENTE
 DECLARO QUE RETIRO AL PACIENTE DE ESTE ESTABLECIMIENTO, BAJO MI RESPONSABILIDAD Y SIN LA AUTORIZACIÓN DEL PROFESIONAL TRATANTE HE SIDO ADVERTIDO DE LAS CONSECUENCIAS DE ESTE ACTO NO AUTORIZADO Y ASUMO TODA LA RESPONSABILIDAD POR LAS CONSECUENCIAS NEGATIVAS

NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
NOMBRE DEL TESTIGO	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
NOMBRE DEL MÉDICO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA	

5 AUTORIZACIÓN DE EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS PARA DONACIÓN Y/O TRASPLANTE
 AUTORIZO AL PERSONAL DE SALUD DE ESTE ESTABLECIMIENTO PARA QUE EN VIDA SE ME EXTRAIGA EL O LOS ÓRGANOS CONVENIDOS, DONADOS PARA EL TRASPLANTE EN EL RECEPTOR SEÑALADO
 AUTORIZO PARA QUE, UNA VEZ TRANSCURRIDAS LAS HORAS DE MI MUERTE CEREBRAL, MIS ÓRGANOS SEAN EXTRAÍDOS PARA TRASPLANTE

ÓRGANOS DONADOS	NOMBRE DE LOS RECEPTORES	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
Placenta	David Cu Veloz Hop Venoz			
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
NOMBRE DEL TESTIGO	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
NOMBRE DEL PROFESIONAL TRATANTE	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA	
Dr. Allan Gabriel Mena	2619300	004329218		

6 AUTORIZACIÓN PARA NECROPSIA
 AUTORIZO AL MÉDICO AUTORIZADO DE ESTE HOSPITAL PARA QUE PRACTIQUE LA NECROPSIA AL CADÁVER DEL FALLECIDO


NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
NOMBRE DEL TESTIGO	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA
NOMBRE DEL MÉDICO	TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FIRMA	

VS-MSP / HCU-form.024 / 2008 AUTORIZACIÓN EXONERACIÓN Y RETIRO

Junta de Beneficencia de Guayaquil Hospital Gineco-Obstétrico "Enrique C. Sotomayor"					
INSTITUCIÓN DEL SISTEMA	UNIDAD OPERATIVA	COD. UD	COD. LOCALIZACIÓN		NÚMERO DE
Junta de Beneficencia de Guayaquil	Hospital Enrique C. Sotomayor		PARRISIAN	CANTÓN	PROVINCIA
			2	1	9
APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	NOMBRES	SERVICIO	SALA	CAMA
					18/1/2011
SI LA INFORMACIÓN ENTREGADA POR LOS PROFESIONALES AL PACIENTE SE HARA EN EL AMBITO DE LA CONFIDENCIALIDAD					
1 INFORMACIÓN ENTREGADA POR EL PROFESIONAL TRATANTE SOBRE EL TRATAMIENTO					
PROPÓSITOS			TERAPIA Y PROCEDIMIENTOS PROPUESTOS		
RESULTADOS ESPERADOS			RIESGOS DE COMPLICACIONES CLÍNICAS		
NOMBRE DEL PROFESIONAL TRATANTE	ESPECIALIDAD	TELÉFONO	CÓDIGO	FIRMA	
2 INFORMACIÓN ENTREGADA POR EL CIRUJANO SOBRE LA INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA					
PROPÓSITOS			INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA PROPUESTA		
RESULTADOS ESPERADOS			RIESGO DE COMPLICACIONES QUIRÚRGICAS		
NOMBRE DEL CIRUJANO	ESPECIALIDAD	TELÉFONO	CÓDIGO	FIRMA	
3 INFORMACIÓN ENTREGADA POR EL ANESTESIOLOGO SOBRE LA ANESTESIA					
PROPÓSITOS			ANESTESIA PROPUESTA		
RESULTADOS ESPERADOS			RIESGOS DE COMPLICACIONES ANESTÉSICAS		
ANESTESIA Y analgesia			Bloqueo Peridural		
oprimos.			LEYES DE LA PATRIMONIALES		
NOMBRE DEL ANESTESIOLOGO	ESPECIALIDAD	TELÉFONO	CÓDIGO	FIRMA	
				Roberto Velasco Palacios	
4 CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE					
A EL PROFESIONAL TRATANTE ME HA INFORMADO SATISFACTORIAMENTE ACERCA DE LOS MOTIVOS Y PROPÓSITOS DEL TRATAMIENTO PLANIFICADO PARA MI ENFERMEDAD					FIRMA DEL PACIENTE
B EL PROFESIONAL TRATANTE ME HA EXPLICADO ADECUADAMENTE LAS ACTIVIDADES ESENCIALES QUE SE REALIZARÁN DURANTE EL TRATAMIENTO DE MI ENFERMEDAD					
C CONSENTO A QUE SE REALICEN LAS INTERVENCIÓN QUIRÚRGICAS, PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS Y TRATAMIENTOS NECESARIOS PARA MI ENFERMEDAD					
D CONSENTO A QUE ME ADMINISTREN LA ANESTESIA PROPUESTA					
E HE ENTENDIDO BIEN QUE EXISTE GARANTÍA DE CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO, PERO NO ACERCA DE LOS RESULTADOS					
F HE COMPRENDIDO PLENAMENTE LOS BENEFICIOS Y LOS RIESGOS DE COMPLICACIONES DERIVADAS DEL TRATAMIENTO					
G EL PROFESIONAL TRATANTE ME HA INFORMADO QUE EXISTE GARANTÍA DE RESPETO A MI ENFERMEDAD, A MIS CREENCIAS RELIGIOSAS Y A LA CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN (INCLUSIVE EN EL CASO DE VIRSIDA)					
H HE COMPRENDIDO QUE TENGO EL DERECHO DE REVOCAR ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO EN EL MOMENTO QUE YO LO CONSIDERE NECESARIO.					
I DECLARO QUE HE ENTREGADO AL PROFESIONAL TRATANTE INFORMACIÓN COMPLETA Y VERDADERA SOBRE LOS ANTECEDENTES PERSONALES Y FAMILIARES DE MI ESTADO DE SALUD. ESTOY CONCIENTE DE QUE MIS OMISIONES O DISTORSIONES					
5 CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL REPRESENTANTE LEGAL					
COMO RESPONSABLE LEGAL DEL PACIENTE, QUE HA SIDO CONSIDERADO POR AHORA IMPOSIBILITADO PARA DECIDIR EN FORMA AUTÓNOMA SU CONSENTIMIENTO, AUTORIZO LA REALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO SEGUN LA INFORMACIÓN ENTREGADA POR LOS PROFESIONALES DE LA SALUD EN ESTE DOCUMENTO					
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL	PARENTESCO	TELÉFONO	CÉDULA DE IDENTIFICACIÓN	FIRMA	
SNS-MSP / HCU-form.024 / 2008					
CONSENTIMIENTO INFORMADO					

Ejemplo de un consentimiento informado firmado por el paciente para permitir el uso del respectivo cordón umbilical de la forma en que le fue descrita. La información que identifica al paciente se censuró para proteger su privacidad.

Anexo B: Aprobación por parte del comité de ética

 <p>HLV-DOF-CEI-007 Guayaquil, 27 de Febrero de 2015</p> <p>Doctor JOSÉ ÁLVAREZ-BARRETO Investigador Principal Prometeo-Senescyt Vinculado al Laboratorio de Biomedicina FIMCBOR - ESPOL Ciudad.</p> <p>Referencia: “Ingeniería de Tejidos Humanos Utilizando Células Madre Mesenquimales”. Presentado por el Doctor José Álvarez-Barreto, Investigador Principal.</p> <p>Estimado Doctor:</p> <p>Informamos a usted que el Comité de Ética en Investigación del Hospital General Luis Vernaza, en Sesión ordinaria No. 104, con fecha 26 de Febrero del presente año, se evaluó y aprobó la renovación del proyecto de la referencia:</p> <p>Documentos Revisados y Aprobados:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Protocolo del Estudio Clínico.<ul style="list-style-type: none">▶ Fecha y número de la Versión/Estado: Versión 2.0/17-diciembre-2013.2. Consentimiento Informado.<ul style="list-style-type: none">▶ Hoja de Información y Declaración de Consentimiento.▶ Explicación al paciente sobre el propósito del estudio: El objetivo general de este estudio es establecer protocolos estandarizados de aislamiento, expansión, caracterización y diferenciación de células madre mesenquimales de gelatina de Wharton del cordón umbilical o tejido adiposo humano, así como su preservación para su futuro en investigación de ingeniería de tejidos humanos.3. Declaratoria de Ausencia de Conflicto de Intereses.<ul style="list-style-type: none">▶ Declaración de conflicto de intereses por parte de todos los investigadores participantes del proyecto.4. Curriculum Vitae y antecedentes del Investigador Principal y Co-investigadores.



5. Presupuesto de la Investigación.

- ▶ Documento en el que se detalla los distintos rubros del presupuesto y su inversión; y el monto que aportan para financiarlo la Espol, Senescyt y Junta de Beneficencia de Guayaquil.

6. Representación legal del patrocinador.

- ▶ Proyecto patrocinado por la Secretaría nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología (SENESCYT).

El Comité de Ética ha tomado en cuenta para su aprobación los objetivos del proyecto y el desarrollo de la metodología a aplicarse para lograr dichos objetivos que consta en los documentos revisados.

Puntualizamos la obligatoriedad de envío al Comité de Ética en Investigación la información pertinente y cualquier circunstancia que se observe mientras se efectúa el proyecto a su cargo.

Sin otro particular me suscribo de Usted.

Atentamente,

DR. ALFONSO TAFUR BRIONES
 PRESIDENTE COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
atafur@central.jbqye.org.ec
 PBX 2560300 Ext. 3029

Copia. Econ. Juan Carlos Galame Hoppe – Inspector
 Dr. Joseph Mc Dermott Molina – Director Técnico
 Dr. Daniel Tettamanti M. – Jefe Dpto. Investigación Médica

Erika D.

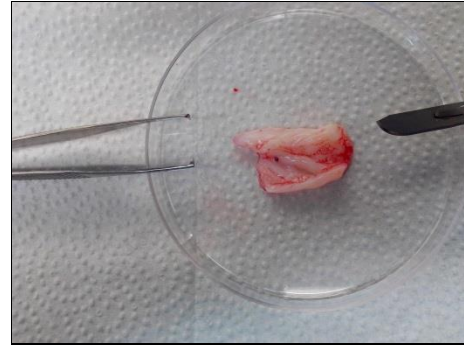
Copia de la aprobación del proyecto “Ingeniería de Tejidos Humano Utilizando Células Madre Mesenquimales” por parte del Comité de Ética En Investigación del Hospital General Luis Vernaza. Este documento corresponde a la renovación efectuada en Febrero del año 2015.

Anexo C: Cordón umbilical en medio de preservación



Cordón umbilical preservado en tampón fosfatado salino hasta el momento del procesamiento del mismo.

Anexo E: Porción de cordón umbilical con corte longitudinal

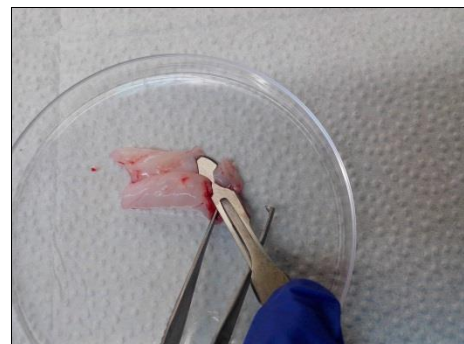


Sección de cordón umbilical al cual se le realizó un corte longitudinal para identificar las venas y arterias, facilitando la extracción de gelatina de Wharton.

Anexo D: Cordón umbilical

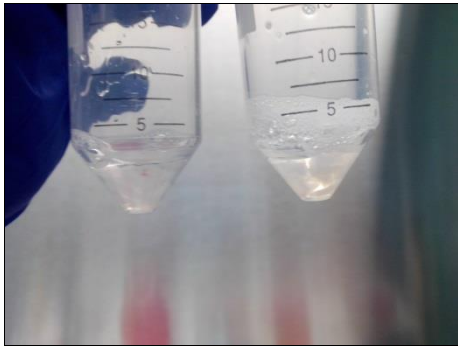


Anexo F: Separación de gelatina de Wharton



Gelatina de Wharton siendo separada del cordón umbilical con la ayuda del bisturí y pinzas.

Anexo G: Gelatina de Wharton separada y lavada



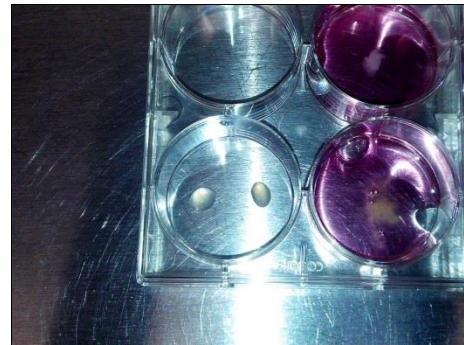
Gelatina de Wharton separada en un tubo de 50ml luego de los respectivos lavados con tampón fosfatado salino.

Anexo H: Placa de cultivo con células aisladas



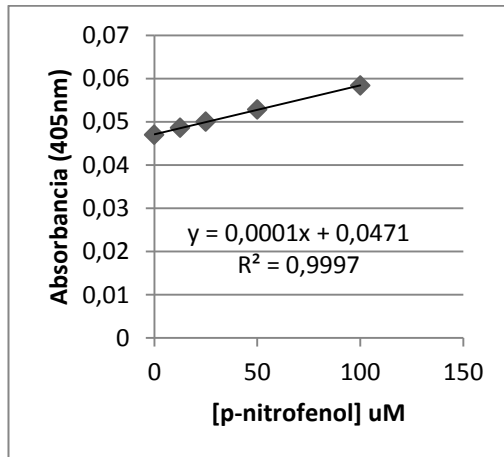
Placa de cultivo (superficie de 25cm²) con células aisladas, lista para colocarse en la incubadora.

Anexo I: Cultivo con de explante de gelatina de Wharton



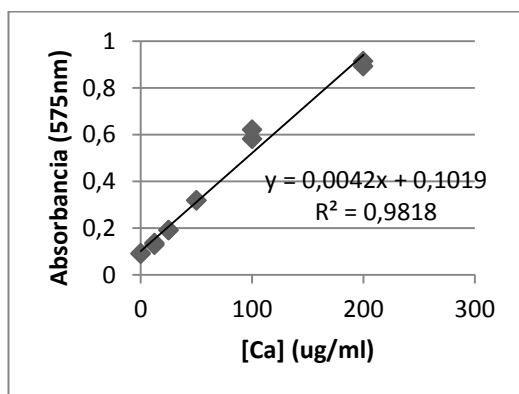
Pequeñas porciones de gelatina de Wharton cultivadas con medio para el aislamiento celular con el método “explante”.

Anexo J: Curva estándar para el cálculo de p-nitrofenol



Curva y ecuación estándar obtenidas para la concentración de p-nitrofenol (uM) vs absorbancia a 405 nm. Con esta curva lineal se calculó la actividad ALP.

Anexo K: Curva estándar para el cálculo de calcio depositado



Curva y ecuación estándar obtenidas para la concentración de calcio ($\mu\text{g/ml}$) vs absorbancia a 575 nm. Con esta curva lineal se calculó la deposición de calcio.

Anexo L: Cultivos celulares con los diferentes tratamientos del derivado de mesocarpio del cacao



Placa del ensayo de citocompatibilidad preparada con las células y sus respectivos tratamientos provenientes del material derivado de mesocarpio de cacao.

Anexo M: Datos obtenidos en aislamiento y cultivo celular

Horas de digestión	Siembra	PDT
14	143000	103,1
16	262200	99,2
16	1020000	71,3
14	162500	93,3
16	151920	111,5
14	177100	156,9
3	232880	87,1
14	209550	91,6
3	205200	74,4
3	214200	78,2

Datos del número de células aisladas (siembra) y el tiempo de doblaje de población PDT.

Anexo N: Datos obtenidos en ensayo de proliferación en diferenciación osteogénica

	1	2	3	4
A	0,376	0,637	0,236	0,314
B	0,401	0,678	0,284	0,409
C	0,367	0,69	0,234	0,256
D	0,277	0,677	0,339	0,273
E	0,872	0,721	0,325	0,389

F	0,718	0,706		
	DMEM 4	MOst 4	DMEM 7	MOst 7

	5	6	7	8
A	1,59	1,617	1,311	1,3
B	1,49	0,656	1,051	1,925
C	1,981	2,223	1,164	1,381
D	1,976	1,802	1,139	1,128
E	1,931	2,271	0,725	1,694
	DMEM 14	MOst 14	DMEM 21	MOst 21

Datos de Absorbancia a 490 nm del ensayo MTS realizado en cultivos celulares con medio DMEM y MOst. El medio y días de cultivo correspondientes se muestran en la parte inferior.

Anexo O: Fotografía del resultado del ensayo de actividad ALP (placa 1)



La primera y segunda columna corresponden a los tratamientos DMEM y MOst, respectivamente, en el día 4. La tercera y cuarta corresponden a los tratamientos DMEM y MOst, respectivamente, en el día 7.

Anexo P: Fotografía del resultado del ensayo de actividad ALP (placa 2)



La primera y tercera columna corresponden a los tratamientos DMEM y MOst, respectivamente, en el día 14. La quinta y séptima corresponden a los tratamientos

DMEM y MOst, respectivamente, en el día 21.

Anexo Q: Datos obtenidos en actividad ALP

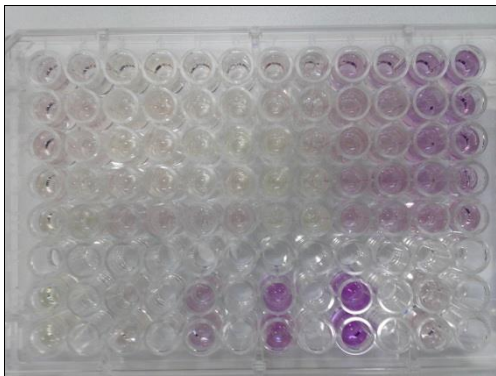
	1	2	3	4
A	0,095	0,109	0,139	0,243
B	0,108	0,133	0,123	0,156
C	0,119	0,113	0,144	0,214
D	0,122	0,121	0,127	0,22
E	0,117	0,127	0,139	0,187
F	0,087	0,126	0,136	0,213
día	4	4	7	7
Medio	DMEM	MOst.	DMEM	MOst.

	1	3	5	7
A	0,106	0,264	0,123	0,141
B	0,115	0,286	0,137	0,152
C	0,117	0,312	0,114	0,162
D	0,105	0,295	0,128	0,187
E	0,112	0,333	0,109	0,174
F	0,113	0,279	0,149	0,218
G				
H				
día	14	14	21	21
Medio	DMEM	MOst.	DMEM	MOst.

Se presentan los datos de absorbancia obtenidos en el lector de placas para el ensayo de actividad de fosfatasa alcalina (ALP). Placas 1 y 2. En la parte

inferior se muestra los días y medio de cultivo correspondientes.

Anexo R: Fotografía del resultado (placa) del ensayo de deposición de calcio



Las columnas de la 1 a la 6 corresponden al tratamiento DMEM en los días 21, 14 y 4 respectivamente (2 columnas por cada día). Las columnas de la 7 a la 12 corresponden al tratamiento MOst en los días 4, 14 y 21 respectivamente (2 columnas por cada día). Se trabajó con 1 réplicas por muestra y 5 muestras por cada grupo (n=5). Los pocillos en las

filas G y H corresponden a las soluciones estándar (n=2): columna 1=0 μ g/ml, columna 3=12,5 μ g/ml, Columna 5=50 μ g/ml, columna 7=100 μ g/ml, columna 9=200 μ g/ml, columna 11=25 μ g/ml.

Anexo S: Datos obtenidos en deposición de calcio

DME M 21	DME M 21	DME M 14	DME M 14	DM EM 4	DM EM 4
0,155	0,151	0,121	0,126	0,109	0,093
0,143	0,154	0,118	0,137	0,122	0,108
0,159	0,145	0,106	0,118	0,108	0,103
0,115	0,107	0,138	0,135	0,108	0,122
0,102	0,119	0,149	0,127	0,122	0,171
0,09		0,137		0,319	
0,093		0,128		0,318	

MOst 4	MOst 4	MOst 14	MOst 14	MOst 21	MOst 21
0,127	0,125	0,236	0,231	0,259	0,307
0,138	0,121	0,169	0,162	0,232	0,238
0,122	0,100	0,202	0,160	0,235	0,265
0,103	0,119	0,185	0,183	0,202	0,274
0,137	0,125	0,188	0,197	0,219	0,196
0,581		0,892		0,191	
0,621		0,914		0,191	

columnas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden a los tratamientos NaOH 1N; NaOH 0,1N; sin tratar; CH₃COOH 1N; CH₃COOH 0,1N; H₂O y control, respectivamente.

Se presentan los datos de absorbancia obtenidos en el lector de placas para el ensayo de deposición de calcio. En la parte superior se indica el medio y día de cultivo.

Anexo T: Datos de ensayo de citocompatibilidad

1	2	3	4	5	6	7
1,0 77	1,5 13	1,2 75	0,9 54	0,7 09	1,1 38	1,2 11
1,0 26	0,7 28	1,0 08	1,0 52	0,9 02	1,2 31	1,1 7
0,8 74	1,1 07	1,5 54	0,7 47	0,8 23	0,8 08	1,0 92
1,1 85	1,2 08	1,8 64	0,7 58	0,7 52	0,9 05	1,1 66
1,2 43	1,1 22	1,1 1	0,9 42	0,9 46	1,4 11	0,9 1

Datos de absorbancia obtenidos en ensayo de citocompatibilidad. Las

BIBLIOGRAFÍA

- [1] C.-Y. Fong, A. Subramanian, K. Gauthaman, J. Venugopal, A. Biswas, S. Ramakrishna and A. Bongso, "Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Stem Cells Undergo Enhanced Chondrogenic Differentiation when Grown on Nanofibrous Scaffolds and in a Sequential Two-stage Culture Medium Environment," *Stem Cell Reviews and Reports*, pp. 195-209, 2012.
- [2] R. C. Zhao, "Mesenchymal Stem Cell Homing," in *A Historical Overview of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical Translation*, Beijing, Springer Dordrecht Heidelberg, 2013, pp. 63-74.
- [3] T. Hatlapatka, P. Moretti, A. Lavrentieva, R. Hass, N. Marquardt, R. Jacobs and C. Kasper, "Optimization of Culture Conditions for the Expansion of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem or Stromal Cell-Like Cells Using Xeno-Free Culture Conditions," *Tissue Engineering*, pp. 485-494, 2011.
- [4] D.-W. Kim, Staples, M, Shinozuka, K, Pantcheva, P, Kang, S-D and Borlongan, C, "Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential

- for Clinical Applications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 6, no. 14, pp. 11692-11712, 2013.
- [5] P. Salehinejad, N. Banu Alitheen, A. Manaf Ali, A. Rahman Omar, M. Mohit, E. Janzamin, F. Sahraneshin Samani, Z. Torshizi, S. Nouredin Nematollahi and Mahani, "Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly," *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, pp. 75-83, 2012.
- [6] S. Wang and R. Zhao Chunhua, "A Historical Overview and Concepts of Mesenchymal Stem Cells," in *Essentials of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical Translation*, Beijing, Springer Science+Business Media Dordrecht, 2013, pp. 3-15.
- [7] E. Flores-Figueroa, J. J. Moentesinos and H. Mayani, "Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica," *Revista de Investigación Clínica*, vol. 58, no. 5, pp. 498-511, 2006.
- [8] R. Lisker, "Ethical and legal issues in therapeutic cloning and the study of stem cells," *Arch Med Res*, pp. 607-611, 2003.
- [9] S. Pacini, "Biology of MSCs Isolated from Different Tissues," in *Essentials of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical Translation*, Beijing, Springer Science+Business Media Dordrecht, 2013, pp. 17-.
- [10] A. Friedenstein, K. Petrakova, A. Kurolesova and G. Frolova, "HETEROTOPIC TRANSPLANTS OF BONE MARROW," *Clinical Medicine*, pp. 230-247, 1968.

- [11] A. Caplan, "Mesenchymal stem cells," *Orthopaedic Research*, pp. 641-650, Septiembre 1991.
- [12] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and D. Horwitz, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, pp. 315-317, 2006.
- [13] A. Keating, "Mesenchymal Stromal Cells: New Directions," *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 6, pp. 709-716, Mayo 2012.
- [14] T. Saedler, *Embriología Medica*, Buenos Aires: Editorial médica panamericana, 2004.
- [15] M. Monti, C. Perotti, C. Del Fante, M. Cervio and C. A. Redi, "Stem cells: sources and therapies," *Biol Res*, pp. 207-214, 2012.
- [16] A. Keating, "Mesenchymal stromal cells," *Curr Opin Hematol*, pp. 419-425, 2006.
- [17] N. Beyer Nardi and L. da Silva Meirelles, "Mesenchymal stem cells: Isolation in vitro expansion and characterization," *Handbook of experimental pharmacology*, pp. 249-282, 2006.
- [18] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter and K. Bieback, "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue," *Stem Cells*, pp. 1294-1301, 2006.
- [19] A. Bongso and C.-Y. Fong, "The Therapeutic Potential, Challenges and Future Clinical Directions of Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord," *Stem Cell Rev and Rep*, pp. 226-240, 2013.

- [20] T. Nagamura-Inoue and H. He, "Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility," *World Journal of Stem Cells*, pp. 195-202, 2014.
- [21] C. Fong, K. Tam, S. Cheyyatraivendran, S. Gan, K. Gauthaman, A. Armugam, K. Jeyaseelan, M. Choolani, A. Biswas and A. Bongso, "Human Wharton's Jelly Stem Cells and Its Conditioned Medium Enhance Healing of Excisional and Diabetic Wounds," *Journal of Cellular Biochemistry*, pp. 290-302, 2014.
- [22] G. La Rocca, Anzalone, R, Corrao, S, Magno, F, Loria, T, Lo Iacono, M, Di Stefano, A, Giannuzi, P, Marasa, L, Cappello, F, Zummo, G and Farina, F, "Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers," *Histochem Cell Biology*, pp. 267-282, 2009.
- [23] S. Karahuseyinoglu, Cinar, O, Kilic, E, Kara, F, Akay, GG, Demiralp, DO, Tukun, A, Uckan, D and Can, A, "Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys.," *Stem Cells*, pp. 319-331, 2007.
- [24] M. Weiss, Medicetty, S, Bledsoe, AR, Rachakatla, RS, Choi, M, Merchav, S, Luo, Y, Rao, MS, Velagaleti, G and Troyer, D, "Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease," *Stem Cells*, pp. 781-792, 2006.
- [25] A. Marmotti, Mattia, S, Bruzzone, M, Buttiglieri, S, Risso, A, Bonasia, DE, Blonna, D, Castoldi, E, Rossi, R, Zanini, C, Ercole, E, Defabiani, E, Tarella, C and Peretti, GM, "Minced umbilical cord fragments as a

- source of cells for orthopaedic tissue engineering: an in vitro study," *Stem Cells*, p. 2012, 2012.
- [26] D. Campard, Lysy, PA, Najimi, M and Sokal, EM, "Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells," *Gastroenterology*, pp. 833-848, 2008.
- [27] A. Marmotti, "Minced umbilical cord fragments as a source of cells for orthopaedic tissue engineering: an in vitro study".
- [28] L. Lu, Liu, YJ, Yang, SG, Zhao, QJ, Wang, X, Gong, W, Han, ZB, Xu, ZS, Lu, YX, Liu, D, Chen, ZZ and Han, ZC, "Isolation And Characterization Of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells With Hematopoiesis-Supportive Function And Other Potentials," *Haematologica*, pp. 1017-1026, 2006.
- [29] Wu, KH, Zhou, B, Lu, SH, Feng, B, Yang, SG, Du, WT, Gu, DS, Han, ZC and Lui, YL, "In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells," *Journal of Cellular Biochemistry*, pp. 608-616, 2007.
- [30] L. Lu, Y. Liu, S. Yang, Q. Zhao, X. Wang, W. Gong, Z. Han, Z. Xu, Y. Lu, D. Lui, Z. Chen and Z. Han, "Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials.," *Haematologica*, pp. 1017-1026, 2006.
- [31] M. Weiss, C. Anderson, S. Medicetty , K. Seshareddy , R. Weiss, I. VanderWerff, D. Troyer and K. McIntosh, "Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells," *Stem Cells*, p. 2865–2874, 2008.

- [32] H. He, Nagamura-Inoue, T, Tsunoda, H, Yuzawa, M, Yamamoto, Y, Yorozu, P, Agata, H and Tojo, A, "Stage-specific embryonic antigen 4 in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency," *Tissue Engineering Part A*, pp. 1314-1324, 2014.
- [33] S. Azandeh, M. Orazizadeh, M. Hashemitabar, A. Khodadadi², A. A. Shayesteh, D. B. Nejad, A. M. Gharravi and E. Allahbakhshi, "Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system," *Biomedical Science and Engineering*, pp. 580-586, Octobre 2012.
- [34] A. Costa, Silvestrini, R, Del Bino, G and Motta, R, "Implications of disaggregation procedures on biological representation of human solid tumours," *Cell Tissue Kinet*, pp. 171-180, 1987.
- [35] J. Koning, van Dongen, J and Schroder, F. H., "Preferential loss of abnormal prostate carcinoma cells by collagenase treatment," *Cytometry*, pp. 805-810, 1993.
- [36] N. Tsagias, I. Koliakos, M. Eleftheriadou, G. Koliakos and V. Karagiannis, "Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes," *Transfusion Medicine*, pp. 253-261, 2011.
- [37] A. Can and Karahuseyinoglu, S, "Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells," *Stem Cells*, p. 2007, 2886-2895.
- [38] Life Technologies, "Life Technologies, , technical support," 2013. [Online]. Available:

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/Collagenase_man.pdf.

- [39] C. Bowman, Yohe, L and Lohr, J, "Enzymatic modulation of cell volume in C6 glioma cells," *Glia*, pp. 22-31, 1999.
- [40] R. I. Freshney, "Culture of animal cells; a manual of basic technique," Wiley, New York, 2005.
- [41] Biosciences, "Product Information: Trypsin — EDTA," Diciembre 2006. [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/p59429.pdf.
- [42] D. Motoki and Mulliken, JB, "The healing of bone and cartilage," *Clinics in Plastic Surgery*, pp. 527-544, 1990.
- [43] A. J. Salgado, Countinho, Olga P and Reis, Rui L, "Bone tissue engineering: state of the art and future trends," *Macromolecular Bioscience*, pp. 743-765, 2004.
- [44] L. Wang, Ott, Lindsey, Seshareddy, Kiran, Weiss, Mark L and Detamore, Michael S, "Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical cord mesenchymal stromal cells," *Regeneration Medicine*, pp. 95-109, 2011.
- [45] K. Gauthaman, Venugopal, JR, Yee, FC, Ramakrishna, S and A. Bongso, "Osteogenic differentiation of human Wharton's jelly stem cells on nanofibrous substrates in vitro," *Tissue Engineering part A*, pp. 71-81, 2011.
- [46] L. Penolazzi, Tavanti, E, Vecchiatini, R, Lambertini, E, Vesce, F, R. Gambari, Mazzitelli, S, F. Mancuso, Luca, G, Nastruzzi, C and Piva, R,

- "Encapsulation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in alginate microbeads," *Tissue Engineering. Part C: Methods*, pp. 141-145, 2010.
- [47] L. Zhao, Weir, MD and Xu, HH, "An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering," *Biomaterials*, pp. 6502-6510, 2010.
- [48] H. Xu, Zhao, L, Detamore, MS, Takagi, S and Chow, LC, "Umbilical cord stem cell seeding on fastresorbable calcium phosphate bone cement," *Tissue Engineering. Part A*, pp. 2743-2753, 2010.
- [49] Zhang, ZY, Teoh, SH, Chong, MS, Schantz, JT, Fisk, NM, Choolani, MA and Chan, J, "Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells," *Stem Cells*, pp. 126-137, 2009.
- [50] Y. Diao, Ma, Q, Cui, F and Zhong, Y, "Human umbilical cord mesenchymal stem cells: osteogenesis in vivo as seed cells for bone tissue engineering," *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, pp. 123-131, 2009.
- [51] J. Stoltz, Huselstein, C, Schiavi, J, Li, YY, D. Bensoussan, V. Decot and N. de Isla, "Human stem cells and articular cartilage tissue engineering," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, pp. 2682-2691, 2012.
- [52] X. Chen, Zhang, F, He, X, Xu, Y, Yang, Z, Chen, L, Zhou, S, Yang, Y, Zhou, Z, Sheng, W and Zeng, Y, "Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type i collagen-hydrogel for cartilage engineering," *Injury*, pp. 540-549, 2013.

- [53] S. Liu, Hou, KD, Yuan, M, Peng, J, Zhang, L, Sui, X, Zhao, B, Xu, W, Wang, A, Lu, S and Guo, Q, "Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, pp. 229-235, 2014.
- [54] L. Wrang and Detamore, MS, "Insulin-like growth factor-I improves chondrogenesis of predifferentiated human umbilical cord mesenchymal stromal cells.," *Journal of Orthopaedic Research*, pp. 1109-1115, 2009.
- [55] M. Bailey, Wang, L, Bode, CJ, Mitchel, KE and Detamore, MS, "A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage," *Tissue Engineering*, pp. 2003-2010, 2007.
- [56] R. Sodian, Lueders, C, Kraemer, L, Kuebler, W, M. Shakibaei, B. Reichart, S. Daebritz and R. Hetzer, "Tissue engineering of autologous human heart valves using cryopreserved vascular umbilical cord cells," *The Annals of Thoracic Surgery*, pp. 2207-2216, 2006.
- [57] K. Chao, K. Chao, Y. Fu and S. Liu, "Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes," *PLoS One*, p. 1451, 2008.
- [58] Y.-S. Fu, Cheng, Y-C, Anya, M-Y, Cheng, H, Chu, P-M, Chou, S-C, Shih, Y-H, Ko, M-H and Sung, M-S, "Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons In Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism," *Stem Cells: Translational and Clinical Research*, pp. 115-124, 2006.

- [59] A. Kadner, S. Hoerstrup, J. Tracy, C. Breymann, C. Maurus, S. Melnitchouk, G. Kadner, Zund, G and Turina, M, "Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering," *The Annals of Thoracic Surgery*, pp. 1422-1428, 2002.
- [60] A. Kadner, Zund, G, Maurus, C, Breymann, C, Yakarisik, S, Kadner, G, Turina, M and Hoerstrup, SP, "Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study," *European Journal of cardio-thoracic surgery*, pp. 635-641, 2004.
- [61] D. Schmidt, Mol, A, S. Neuenschwander, C. Breymann, M. Gössi, G. Zund, Turina, M and S. Hoerstrup, "Living patches engineered from human umbilical cord derived fibroblasts and endothelial progenitor cells," *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, pp. 795-800, 2005.
- [62] D. Schmidt, Mol, A, Odermatt, B, Neuenschwander, S, Breymann, C, Gössi, M, Genoni, M, Zund, G and Hoerstrup, SP, "Engineering of biologically active living heart valve leaflets using human umbilical cord-derived progenitor cells," *Tissue Engineering*, pp. 3223-3232, 2006.
- [63] D. Schmidt, Asmis, LM, Odermatt, B, Kelm, J, Breymann, C, Gössi, M, Genoni, M, Zund, G and Hoerstrup, SP, "Engineered living blood vessels: functional endothelia generated from human umbilical cord-derived progenitors," *The Annals of Thoracic Surgery*, pp. 1465-1471, 2006.
- [64] X. Lin, Fan, H.S., Li, X.D., Tang, M. and Zhang, X.D., "Evaluation of Bioactivity and Cytocompatibility of Nano-hydroxyapatite/Collagen Composite In vitro," *Key Engineering Materials*, pp. 553-556, 2005.

- [65] I. Majore, Moretti, P, Frank, S, Hass, R and Kasper, C, "Growth and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cell Populations Derived from Whole Human Umbilical Cord," *Stem Cell Rev and Rep*, pp. 17-31, 2010.
- [66] P. Venugopal, Balasubramanian, S, Majumdar, A.S and Ta, M, "Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions," *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, pp. 39-50, 2011.
- [67] Z. Huang, Nelson, E.R, Smith, R.L and Goodman, S.B, "The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteoprogenitors] to osteoblasts in vitro," *Tissue Eng*, pp. 2311-2320, 2007.
- [68] J. Aunbin, "Regulation of osteoblast formation and function," *Rev Endocr Metab Disord*, pp. 81-94, 2001.
- [69] C. Hoemann, El-Gabalawy, H and Mckee, M.D, "In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization," *Pathol Biol (Paris)*, pp. 318-323, 2009.
- [70] E. Birmingham, Niebur, G.L, McHugh, P.E, Shaw, G, Barry, F. P and McNamara, L.M, "Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells is Regulated by Osteocyte and Osteoblast Cells in a Simplified Bone Niche," *European Cells and Materials*, pp. 13-27, 2012.
- [71] H. Lee, Tang, J.L, Chiou, L.L, Tsai, K.S, Jiang, C.C, Yang, P.C, Yang. P.M and Huang, G.T, "Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myeloproliferative

- disorders," *J Formos Med Assoc*, pp. 124-128, 2002.
- [72] H. Lysdahl, Baatrup, A, Nielsen, A, Foldager, C and Bünger, C, "Phenol Red Inhibits Chondrogenic Differentiation and Affects Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 6, pp. 1-12, 2010.
- [73] A. Moshaverinia, Xu, Xingtian, Chen, Chider, Akiyama, Kentaro, Snead, Malcom L and Shi, Songtao, "Dental mesenchymal stem cells encapsulated in an alginate hydrogel co-delivery microencapsulation system for cartilage regeneration," *Acta Biomaterialia*, p. 9343–9350, 2013.
- [74] H. Huang, Zhang, Xin, Hu, Xiaoqing, Shao, Zhenxing, Zhu, Jingxian, Dai, Linghui, Man, Zhentao, Yuan, Lan, Chen, Haifeng, Zhou, Chunyan and Ao, Yingfang, "A functional biphasic biomaterial homing mesenchymal stem cells for in vivo cartilage regeneration," *Biomaterials*, p. 9608–9619, 2014.
- [75] Wan, Andrew C.A and Tai, Benjamin C.U., "CHITIN — A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies," *Biotechnology Advances*, p. 1776–1785, 2013.
- [76] H. Liu, Xu, Guo Wei, Wang, Ya Fei, Zhao, Hong Shi, Xiong, Si, Wu, Yan, Heng, Boon Chin, An, Cheng Rui, Zhu, Gang Hua and Xie, Ding Hua, "Composite scaffolds of nano-hydroxyapatite and silk fibroin enhance mesenchymal stem cell-based bone regeneration via the interleukin 1 alpha autocrine/paracrine signaling loop," *Biomaterials*, pp. 103-112, 2015.
- [77] T. Ma, Wan, Peng, Cui, Yuyan, Zhang, Guirong, Li, Jiqiang, Liu, Jihui,

- Ren, Yibin, Yang, ke and Lu, Li, "Cytocompatibility of High Nitrogen Nickel-Free StainlessSteel for Orthopedics Implants," *Journal of Materials Science and Technology*, pp. 647-653, 2012.
- [78] M. Zhang, *Biomaterials and Tissue Engineering*, Cincinnati: Springer, 2004.
- [79] W. Zhang, Yang, N and Shi, X-M, "Regulation of Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation by Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ)," *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 4723-4729, 2008.
- [80] U. Nekanti, Mohanty, L, Venugopal, P, Balasubramanian, S, Totey, S and Ta, M, "Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications," *Stem Cell Research*, p. 244–254, 2010.