

TEMPERATURA Y TIEMPO PRE-PROCESAMIENTO: FACTORES ESENCIALES PARA EL RENDIMIENTO CELULAR PROVENIENTE DE LA GELATINA DE WHARTON

*Pre-processing temperature and time: essential factors for
cellular performance from Wharton's gelatin*

Juan Manuel Duarte Rojas¹
Nathalia Muñoz Martínez¹
Jenniffer Ávila²
Ángela Riveros²
Derly Franco²
Luz Mabel Ávila Portillo^{2,3}

Resumen

Se realizó un estudio cuasi experimental; se recolectaron 25 cordones umbilicales (UC) en solución de transporte, de los cuales sólo nueve cumplieron con los criterios de inclusión. El tamaño de los cordones fue mayor de 30 cm con un diámetro de ≥ 1.5 cm; éstos fueron seccionados en 15 fragmentos de aproximadamente 2 cm, y expuestos a diferentes temperaturas (10°C, 22°C y 32°C) durante 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Se obtuvo una cantidad de 600 mg de gelatina de Wharton (WJ) de cada fragmento. Se analizó la celularidad y viabilidad con la tinción de azul de tripan. Los fragmentos mantenidos a 10°C presentaron una media de viabilidad de $85,6\% \pm 6,8$ después de 6 horas, con una pérdida de viabilidad a las 72 horas, de $13,6\%$ ($p=0,001$); a 22°C la media de viabilidad fue de $84,3\% \pm 4,2$ con una pérdida de viabilidad a las 72 horas de $27,4\%$ ($p<0,001$); a 32°C $83,6\% \pm 4,6$ con una disminución del $60,4\%$ a las 72 horas ($p<0,001$). Respecto al número de células/mg de WJ, a 22°C se presentó una media de $167 \text{ cel./mg} \pm 36,5$ a las 6 horas, con una pérdida de células a las 72 horas de 112 cel./mg ($p=0,001$); a 32°C $139 \text{ cel./mg} \pm 73,7$, con una pérdida de 98 cel./mg a las 72 horas ($p=0,003$). La celularidad no fue estadísticamente significativa a 10°C entre los diferentes períodos ($p=0,931$). Los datos observados en este estudio indican que la temperatura ideal para la preservación y transporte del tejido de UC es de 10°C, con un tiempo máximo de conservación de 24 horas.

¹ Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá Colombia

² Stem Medicina Regenerativa Bogotá. Colombia

³ CryoHoldco Latinoamérica. Autor de Correspondencia: mabelavila_us@yahoo.com

Recibido: 31/10/2017

Aceptado: 12/11/2018

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Palabras claves: Células Madre Mesenquimales, Cordón umbilical, Gelatina de Wharton, Viabilidad, Celularidad, Tiempo, Temperatura.

Abstract

A quasi-experimental study was carried out, where 25 umbilical cords (UC) were collected in transport solution of which only nine (9) fulfilled the inclusion criteria. The size of the cords was greater than 30 cm with a diameter of ≥ 1.5 cm; these were cut into 15 fragments of approximately 2 cm and exposed to different temperatures (10 ° C, 22 ° C and 32 ° C) for 6, 12, 24, 48 and 72 hours. It was obtained 600 mgs of Wharton's gelatin (WJ) from each fragment. Cellularity and viability were analyzed with trypan blue staining. The fragments maintained at 10 ° C presented an average viability of $85.6\% \pm 6.8$ at 6 hours, with a loss of viability at 72 hours of 13.6% ($p = 0.001$). At 22 ° C the viability average was $84.3\% \pm 4.2$ with a loss of viability at 72 hours of 27.4% ($p < 0.001$). At 32°C $83.6\% \pm 4.6$ with a decrease of 60.4% at 72 hours ($p < 0.001$). With respect to the number of cells / mg of WJ, at 22 ° C an average of 167 cells / mg ± 36.5 was presented at 6 hours with a cell loss at 72 hours of 112 cells / mg ($p = 0.001$).). At 32 ° C 139 cel./mg ± 73.7 , with a loss of 98 cel./mg at 72 hours ($p = 0.003$). The cellularity was not statistically significant at 10 ° C between the different times ($p = 0.931$).

The data found in this study indicate that the ideal temperature for the preservation and transport of UC tissue is 10 ° C, with a maximum conservation time of 24 hours.

Keywords: Mesenchymal Stem cells, Umbilical cord, Wharton's Jelly, Viability, Cellularity, Time, Temperature.

Introducción

Las células troncales mesenquimales (MSC) son células estromales multipotentes que se pueden aislar a partir de diferentes tejidos. A pesar de que se identificaron originalmente en la médula ósea y se describen como “células estromales de médula”, ya han sido identificadas en otros lugares anatómicos del cuerpo, entre los que se incluyen tejido adiposo (Portillo, Ruiz, García, Arocha, y Mauricio, 2015), pulpa dental, ligamento periodontal, líquido amniótico, placenta, periostio, sangre de cordón umbilical (SCU), y cordón umbilical; este último constituye la gelatina de Wharton (WJ), el tejido más estudiado. Las WJ-MSCs son células definidas por su potencial de multilineaje, con un éxito de extracción de hasta 100%; además, se caracterizan por su fácil obtención al ser extraídas de lo que no hace mucho se consideraba un desecho biológico (Batsali, Kastrinaki, Papadaki, & Pontikoglou, 2013) multilineage potential and immunomodulatory properties. In this regard MSCs emerge as attractive candidates for various therapeutic applications. MSCs were originally isolated from the bone marrow (BM). Poseen una excelente capacidad proliferativa, de auto-renovación, y de diferenciación entre una variedad de tipos de células: adipocitos, osteocitos, condrocitos, neuronas, células endoteliales y hepatocitos *In vitro* (Chen et al., 2015; Costa y Fernando, 2015; Pal, Hanwate, & Totey, 2008).

Por lo anterior, las WJ-MSCs han captado gran interés y atención para su uso en la regeneración de tejidos, y son motivo de gran investigación en áreas básicas y clínicas. Además, presentan grandes ventajas respecto al aislamiento en otros tejidos, tales como los

de la médula ósea (BM); la sangre de cordón umbilical (SCU), y el tejido adiposo (TA), pues poseen las siguientes características: implican un procedimiento no invasivo, no doloroso, no molesto, de fácil obtención, aceptable éticamente. Adicionalmente, se trata de una fuente mucho más abundante, con mayor potencial de expansión que las células de la SCU, de alta accesibilidad y plasticidad, y con poca respuesta inmune al momento de ser trasplantadas.

Las MSCs, en los distintos tipos de tejidos, comparten numerosas propiedades y características, lo que ha llevado a la Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy ISCT) a establecer un conjunto mínimo de características que debe poseer una célula para ser considerada MSC *In vitro*. Dichos criterios son los siguientes: adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo estándar (medio esencial mínimo, más 20% de suero fetal bovino); expresión en membrana de CD105, CD73, CD90, CD44; ausencia de algunos marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19, HLA-DR, y capacidad de diferenciación en tres líneas básicas al ser cultivadas en las condiciones adecuadas y en presencia de estímulos precisos para cada estirpe celular: hueso (osteoblastos), cartílago (condroblastos), y adipoblastos en tejido graso. (Arbós et al., 2013; Kovolak, Dinnyes, Memic, Khademhosseini, & Mobasheri, s/f; Sharma, Pollok, Hubel, & McKenna, 2014; Wang, Qu, & Zhao, 2012).

Asimismo, las MSCs producen una variedad de citosinas y quimiocinas, factores de crecimiento que, en su mayoría de manera paracrina, estimulan la regeneración de tejidos

afectados y recuperación de las células dañadas (Altanerova et al., 2017; Stanko, Kaiserova, Altanerova, & Altaner, 2014). Igualmente, tienen la capacidad de modular la respuesta inmune y la inhibición de la inflamación (Kang, Shin, Ko, Jo, & Ra, 2012; Sharma et al., 2014; Ullah, Subbarao, & Rho, 2015), que las convierten en una posibilidad para brindar soluciones clínicas importantes, como las enfermedades causadas por el sistema inmune, que incluyen a la enfermedad injerto contra huésped (EICH); en enfermedades autoinmunes y metabólicas (Diabetes tipo I y II), y en padecimientos del sistema nervioso central (Enfermedad de Alzheimer, parálisis cerebral, esclerosis múltiple, autismo) ("Umbilical Cord Mesenchymal", 2016).

Por otra parte, los procedimientos usados para el aislamiento de WJ-MSCs hallados en la literatura son muy diversos, y ningún protocolo en particular ha sido introducido para ser empleado de forma estándar (Costa y Fernando, 2015; Salehinejad et al. 2012). De igual manera, son muy escasos los estudios referentes a la preservación y transporte del CU, desde su recolección hasta el momento de ser procesado para fines de aislamiento, cultivo (proliferación *In vitro*), y caracterización e implantación de las MSCs.

Objetivo

En el presente estudio nos centramos en comprender el efecto de dos factores importantes como son la temperatura y el tiempo sobre la viabilidad y celularidad de las células de la gelatina de Wharton antes de su procesamiento.

Material y métodos

Se diseñó un estudio cuasi experimental con los siguientes criterios de selección de las madres gestantes: edad entre los 18 y 35 años, 38 semanas de gestación, ausencia de antecedentes patológicos, sin enfermedades infecto contagiosas, y la aceptación de participar en el estudio mediante firma del consentimiento informado. Asimismo, se consideraron los siguientes criterios de inclusión del tejido de cordón umbilical: fragmento de 30 centímetros de longitud, diámetro $\geq$ de 1,5 cm, y un peso de la gelatina de Wharton de $\geq$ a 600 mg por fragmento de 2 cm al momento de su extracción.

El estudio se dividió en tres fases: I. Obtención de los fragmentos de cordón umbilical durante el nacimiento, previa firma del consentimiento informado; II. Evaluación de viabilidad mediante la técnica azul de tripán por microscopía y recuento celular posterior a periodos de 6, 12, 24, 48 y 72 horas, utilizando temperaturas de 10°C, 22°C y 32°C para el almacenamiento, y III. Análisis de los datos.

Obtención y transporte de las muestras de cordón umbilical

Antes de realizar el procedimiento de recolección del CU, previa aceptación materna, se procedió a la firma del consentimiento informado (aprobado por el comité de ética del Hospital Militar Central (registro: 2016-006 del 18 de abril de 2016); posteriormente, se reunieron los CU de partos tanto naturales como por cesárea.

Después del alumbramiento y expulsión de la placenta, se tomó la totalidad del cordón, y el corte del mismo. El CU fue trasladado a temperatura ambiente, en un frasco estéril con medio de transporte Tampón Fosfato Salino (PBS) suplementado con penicilina, estreptomina y anfotericina-B al 1%, al laboratorio STEM Medicina Regenerativa en un tiempo máximo de 2 horas desde la extracción.

Recolección de células a partir de la gelatina de Wharton de cordón umbilical

Se procedió a medir cada cordón y se verificó que cumplieran con los criterios de inclusión anteriormente mencionados. Se obtuvieron 25 CU; de ellos, sólo nueve cumplieron con las características establecidas. La manipulación de los CU se realizó en condiciones de esterili-

dad en cabina de flujo laminar aire 100. Se procedió a la disección de los cordones de forma transversal en 15 fragmentos de 2cm cada uno, con la ayuda de pinzas y tijeras esterilizadas.

En seguida, se marcaron tubos falcón de 15 ml con los siguientes datos: Código (CU 001 – 009), horas (6, 12, 24, 48, y 72), y temperatura (10°C, 22°C y 32°C); en cada tubo se introdujo un fragmento de CU, y se adicionó medio de transporte hasta completar 3 ml. Los tubos fueron colocados en la temperatura correspondiente, es decir, 5 tubos a 10°C (Nevera), 5 tubos a 22°C (Temperatura Ambiente), y 5 tubos a 32°C (Baño Serológico o Incubadora).

Obtención celular

Respetando el tiempo y la temperatura seleccionados, los fragmentos de cada cordón se transfirieron a cajas de Petri de manera individual, en ambiente estéril. Cada muestra fue lavada en PBS o solución salina isotónica; en seguida, cada fragmento se diseccionó longitudinalmente con pinzas y bisturí, sin trozar los vasos sanguíneos, y se retiraron las arterias y la vena umbilical para separar la gelatina de Wharton del tejido vascular y del amnio. La gelatina extraída se cortó en pequeños fragmentos y se pesó hasta obtener 600mg (criterio unificado para hacer las muestras comparativas).

Para la digestión enzimática se adicionó 2mL de collagenasa tipo II, concentración 2mg/ml, y se incubó a 37°C durante 2 horas, con agitación constante más vórtex cada 15 minutos. Finalizado el tiempo de incubación, se adicionó 2 mL de medio suplemen-

tado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, y se cosecharon las células disociadas mediante filtración (Filtro de 100 μm) en tubo falcón de 50mL; posteriormente, se centrifugaron a 1500 revoluciones por minuto (rpm) (377g) durante 15 minutos.

Recuento celular y viabilidad por el método azul de tripán

Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió el *pellet* celular en 1mL de SFB; en seguida se realizó vórtex para obtener las células aisladas. Finalmente, se montó con azul de tripán en cámara de Neubauer para realizar el conteo celular y determinar la viabilidad correspondiente de cada muestra en 100 células. (Ver Figura 1).

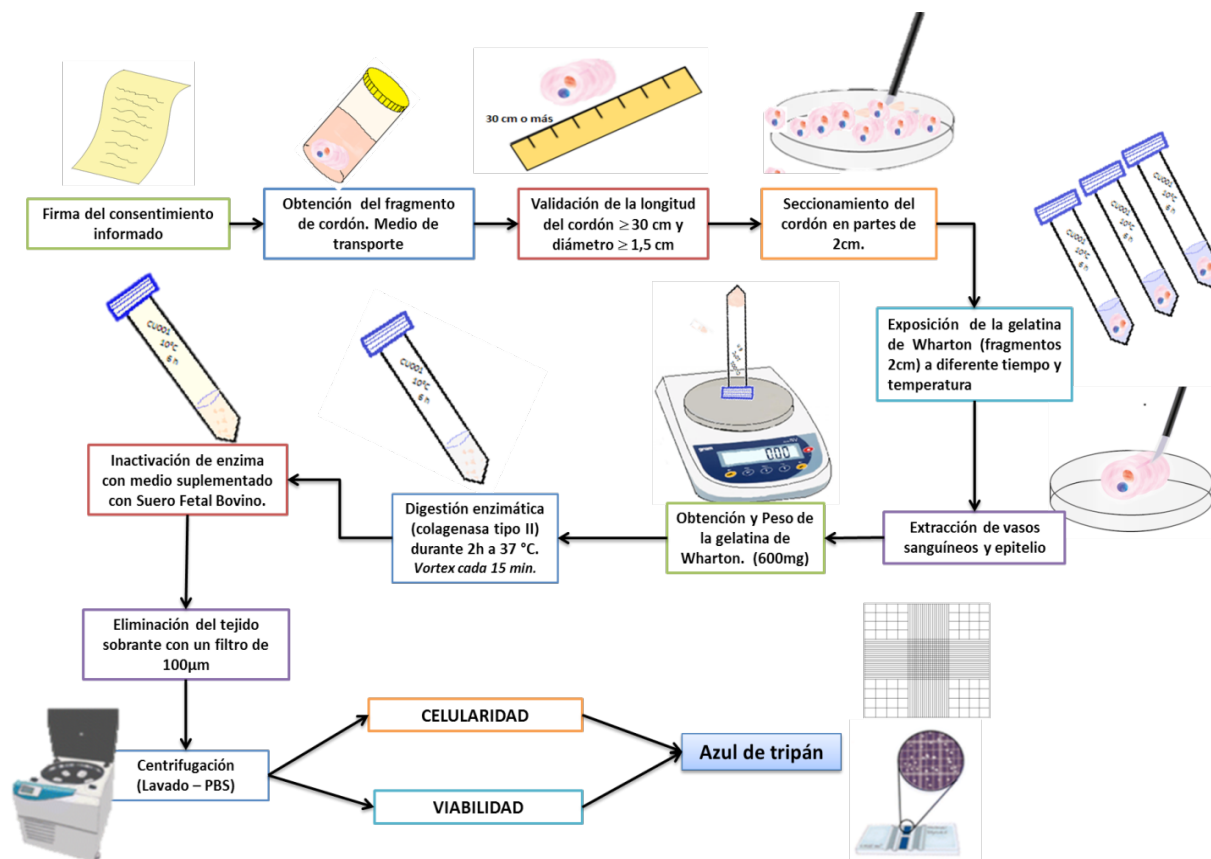


Figura.1. Esquema de la metodología aplicada en el estudio.

Tipificación de las células extraídas de WJ

Las células extraídas fueron re-suspendidas en PBS a una concentración de 1×10^5 cel/10⁵ml. La tipificación celular se realizó por citometría de flujo (equipo FACSCANTO II) utilizando el kit BD Stem Human MSC Analysis Kit (Cat: 562245), que incluye un coctel positivo (FITC CD90, PerCP-Cy[™] 5.5 CD105 y APC CD73) y que se usó en combinación con un coctel negativo (PE CD45, PE CD34, PE CD11b, PE CD19 y PE HLA-DR), con la finalidad de identificar una población celular con fenotipo de células mesenquimales.

Se emplearon tres tubos para la identificación de las células; el primero con células sin marcar (Control), el segundo con el control de isotipo negativo PE hMSC, y el tercero con coctel positivo y negativo. En cada tubo se colocaron 100µl de las células re-suspendidas, y 20 µl de cada anticuerpo; luego de un periodo de incubación de 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se procedió al lavado con PBS centrifugando a 2500rpm durante 7 minutos, para posteriormente efectuar la lectura en el citómetro de flujo, utilizando el software FACS Diva, obteniéndose 50.000 eventos por tubo.

Análisis Estadístico

Las mediciones obtenidas de la viabilidad y celularidad para los diferentes tratamientos asociados a temperatura y tiempo de transporte se ingresaron en una base de datos en hoja de cálculo de Excel, para posteriormente ser importada al software estadístico SPSS para Windows versión 22, y así, realizar el análisis correspondiente. Inicialmente, se efectuó un análisis exploratorio de los

datos que permitió evaluar los supuestos y comprobar la idoneidad del modelo, valorando la normalidad, la homocedasticidad y la independencia, además de realizar los ajustes -de acuerdo con la interacción entre tratamientos y bloques- lo que indicó la necesidad de efectuar el tipo de análisis no paramétrico (prueba H Kruskal wallis), por la varianza entre los resultados.

Las variables continuas se presentaron en promedio y desviación estándar, o como mediana y rango intercuartílico, según correspondiera. Se definió un intervalo de confianza de 95%. Los resultados se interpretaron y fueron presentados con base en los resúmenes de medidas y gráficas, midiendo la significancia estadística.

Resultados

Población de estudio

En total, se recolectaron 25 CU en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Militar Central, después de la firma del consentimiento informado de las madres gestantes aceptando la donación del tejido; posteriormente, fueron transportados a Stem Medicina Regenerativa dentro de las dos siguientes horas, habiendo verificado los criterios de inclusión. Nueve de los 25 cordones cumplieron con esos criterios, y los 16 restantes fueron excluidos.

Fenotipificación

Para garantizar la presencia de células mesenquimales en la gelatina de Wharton, se realizó la tipificación por medio de citometría de flujo, observándose la expresión de

marcadores CD90 (63,5%), CD73 (16%), y CD105 (8,7%), y ausencia para CD34, CD11b, CD19, CD45 y HLA-DR en 91,3%. Con base en este fenotipo, podemos comprobar la presencia de una población con características inmunofenotípicas de célula mesenquimal (ver Figura 2).

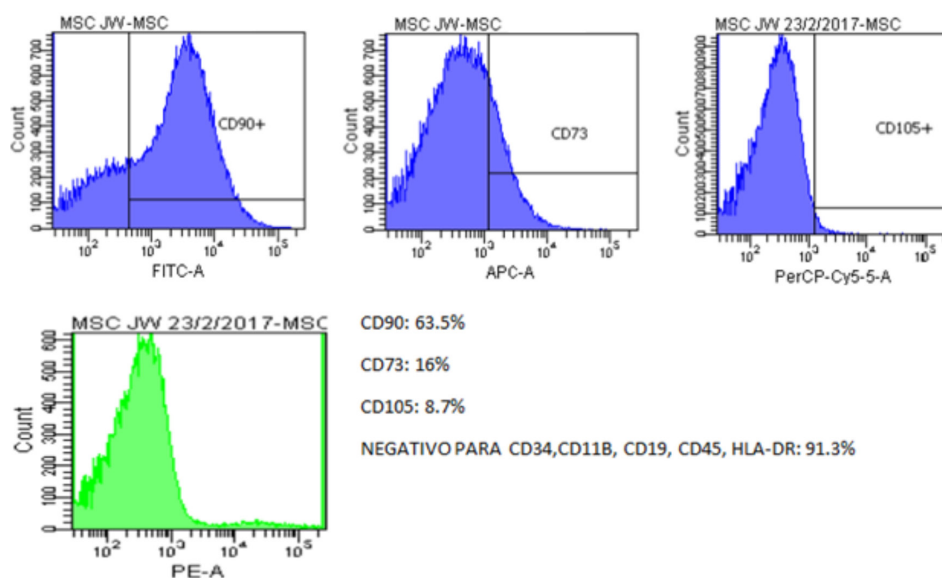


Figura 2. Inmunofenotipo de las células de gelatina de Wharton por citometría de flujo.

Determinación de la viabilidad

En la Figura 3, se resumen los resultados de viabilidad obtenidos de los fragmentos de cordón en los diferentes tiempos (6h, 12h, 24h, 48h, 72h) y temperatura (10, 22 y 32°C), usando azul tripán. Los CU mantenidos a 10°C presentaron una $\bar{X}$ de viabilidad de 85,6% y una DE 6,8 a las 6 horas, con una pérdida gradual de viabilidad a las 72 horas de 13,6% ($p=0,001$). Aquellos que se mantuvieron a 22°C presentaron una $\bar{X}$ de 84,3 %, una DE 4,2 y una pérdida gradual de viabilidad a las 72 horas de 27,4% ($p<0,001$). Los fragmentos de CU mantenidos a 32°C presentaron una $\bar{X}$ de 83,6 % y una DE 4,6, con una pérdida gradual de viabilidad a las 72 horas de 60,4% ($p=<0,001$).

La viabilidad celular no fue significativamente diferente entre cualquiera de las tres temperaturas después de 6, 12 o 24 horas ($p>0,05$); sin embargo, en todos los casos, la viabilidad disminuyó significativamente con el tiempo ($p<0,05$).

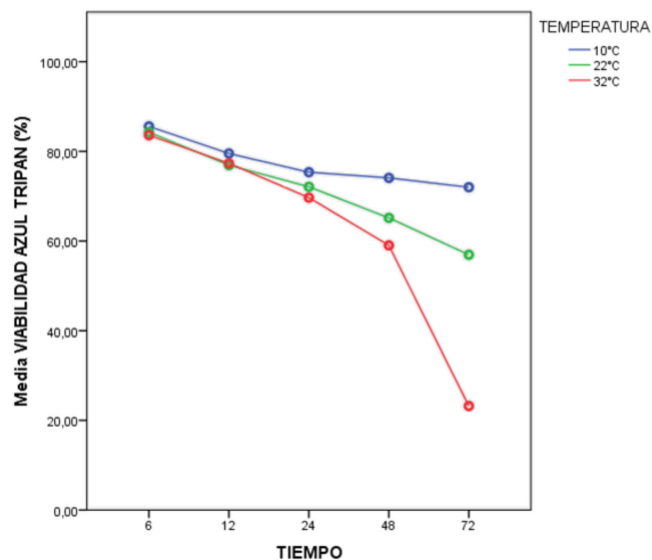


Figura 3. Viabilidad promedio por azul de tripan encontrada en los segmentos de cordón en diferentes períodos (6h, 12h, 24h, 48h, 72h) y temperaturas (10, 22 y 32°C). Podemos observar la pérdida gradual de viabilidad: a 10°C una pérdida de 13,6% a las 72 horas; a 22°C de 27,4%, y a 32°C de 60,4%.

Análisis de la temperatura pre-procesamiento de fragmentos de CU

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad celular de los tejidos sometidos a 10°C y 32°C ($p=0,028$), y la comparación entre la temperatura de 10°C y 22°C ($p=0,023$). No se encontraron diferencias significativas al comparar la viabilidad a 22°C y 32°C ($p=0,499$).

Como se observa en la Figura 4, para la temperatura de 22°C los datos presentaron una mediana de 73,5% de viabilidad, con un rango de 76,4% ($p<0,001$); en 10°C los datos se ubican aproximadamente en 75,7%, con un rango de 29,5% ($p<0,001$). Por último, aquellos provenientes de tejidos mantenidos a 32°C presentan una mediana de 72,5%, y el rango de 89,5 % ($p<0,001$); se

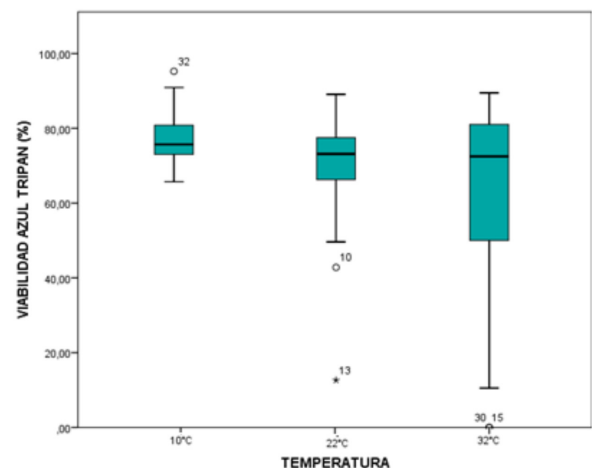


Figura 4. Mediana de viabilidad vs temperatura pre-procesamiento de fragmentos de CU con el método de azul de tripan. El diagrama muestra la mediana de los datos adquiridos para cada una de las temperaturas con sus respectivos rangos mínimo y máximo. Se observa cómo se obtiene una menor viabilidad a 32°C ($p<0,001$).

encontraron diferencias significativas en todas las temperaturas, siendo la de 32°C en donde se observa menor porcentaje de viabilidad.

Análisis de tiempo pre-procesamiento de fragmentos de UC

Se encontraron diferencias significativas al comparar el tiempo de pre-procesamiento de 6h con una viabilidad promedio de 84,5%, y 12h con 78% ($p<0,001$); de igual manera, en las comparaciones entre 12h (78%), 24h (72,4%), 48h (66,1%), y 72h (50,7%) ($p<0,001$).

Como se observa en la Figura 5, a las 6 h los datos presentan una mediana de 84% de viabilidad, con un rango de 23,8%; a las 12 h con una viabilidad de alrededor

de 78 % y un rango de 21,3% ; a las 24 h con una viabilidad de alrededor de 74% y un rango de 51,7%; a las 48 h se presenta aproximadamente 67% y un rango de 71,4 %, y en las 72 h una viabilidad de alrededor de 60% y un rango de 77,5%. Los datos de viabilidad obtenidos por azul de tripán se corroboraron por citometría de flujo usando el 7AAD; en la Figura 5b, puede verse la pérdida de viabilidad a través del tiempo dentro de los hallazgos de este estudio.

En la Figura 5b, se muestra cómo a las 6h los datos presentan una mediana de 84,3% de viabilidad, con un rango de 42%; a las 12 h una viabilidad de 81,6 % y un rango de 35,6%; a las 24 h una viabilidad de aproximadamente 76,8% y un rango de 41,4%; a las 48 h se presenta casi 72,7% y un rango de 54,6% y, a las 72 h una viabilidad de alrededor de 69,2% y un rango de 55%. (Ver Figura 5c).

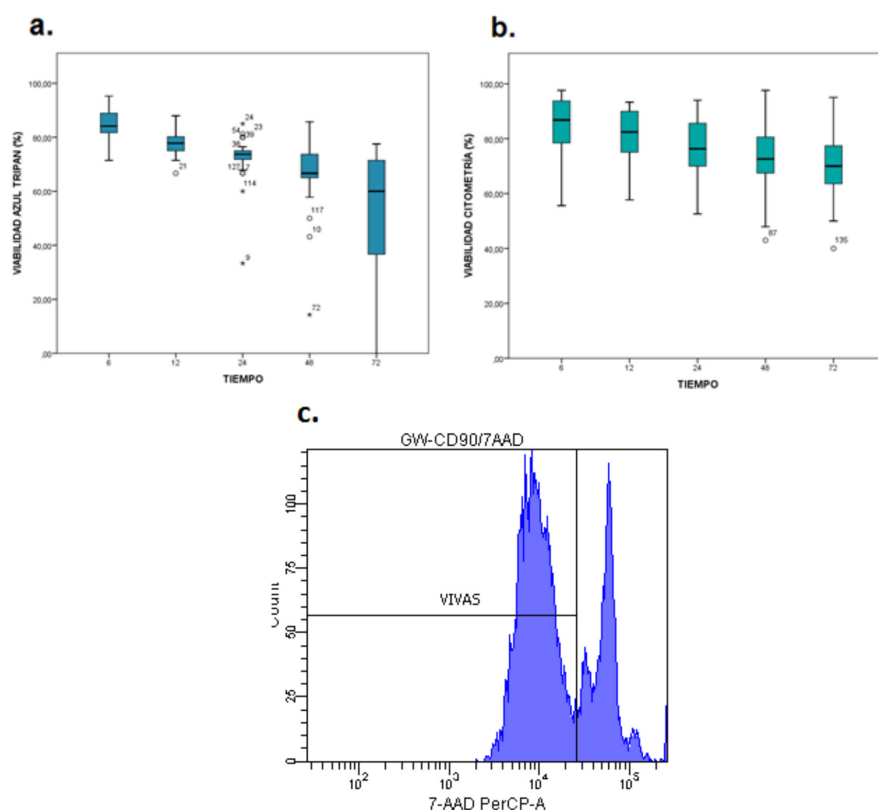


Figura 5. Mediana de viabilidad vs tiempo pre-procesamiento de fragmentos de CU con el método de azul de tripán (a), por 7-AAD (b) e histograma de viabilidad con 7-AAD a las 72h (69,2%) (c). Se observa una disminución significativa de la viabilidad a partir de las 12h de transporte ($p<0,001$) con el método de azul de tripán.

Determinación de celularidad

En la tabla 1 se nota cómo los fragmentos de cordón mantenidos a 22°C presentaron una $\bar{X}$ de celularidad de 167 cel/mg y una DE 36,5 a las 6 horas, con una pérdida gradual de células a las 72 horas de 112 cel/mg ($p=0,001$). Los fragmentos mantenidos a temperatura de 32°C mostraron una celularidad de 139 cel/mg y una DE 73,7 con una pérdida gradual de células a las 72 horas de 98 cel/mg ($p=0,003$). La celularidad no fue significativamente diferente entre el transcurso del tiempo a 10°C ($p=0,931$), a diferencia de lo que ocurre en las temperaturas de 22°C y 32°C, en las que la celularidad disminuyó significativamente con el tiempo ($p<0,05$).

El promedio de células mononucleares obtenidas fue de 105 cel/mg de gelatina de Wharton disociada, con un rango máximo de 288 cel/mg, y un rango mínimo de 8 cel/mg.

	CELULARIDAD Cel/mg				p	
	Media	Desviación Típica (DE)	Máximo	Mínimo		
10°C	6h	124,11	50,88	208,00	58,00	0,778
	12h	138,00	65,70	267,00	75,00	
	24h	137,89	41,55	204,00	63,00	
	48h	109,88	37,88	158,00	75,00	
	72h	130,22	71,56	256,00	33,00	
Ambiente (22°C)	6h	167,22	36,46	229,00	115,00	0,001
	12h	119,00	43,31	192,00	42,00	
	24h	93,56	54,35	200,00	25,00	
	48h	66,25	38,67	125,00	25,00	
	72h	55,25	46,34	158,00	17,00	
32°C	6h	139,44	73,72	271,00	38,00	0,008
	12h	93,67	78,66	288,00	29,00	
	24h	74,56	28,46	117,00	25,00	
	48h	57,00	41,99	146,00	13,00	
	72h	41,22	24,87	79,00	8,00	

Tabla 1. Celularidad promedio encontrada en los segmentos de cordón en diferentes periodos (6h, 12h, 24h, 48h, 72h) y temperaturas (10o, 22o y 32°C) por miligramo de gelatina de Wharton disociada (cel/mg).

Análisis de la temperatura pre-procesamiento

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la celularidad de los tejidos sometidos a 10°C y 32°C ($p < 0,001$), y en la comparación entre las temperaturas de 22°C y 32°C ($p = 0,047$).

En la Figura 6, se advierte a 22°C una mediana de celularidad de 102 cel/mg (*Rango (R):* 17_{Min} - 229_{Max}) ($p = 0,001$); en la temperatura de 10°C una mediana de 117 cel/mg (*R: 33_{Min} - 267_{Max}*) ($p = 0,778$), y para las de 32°C una mediana de 67 cel/mg (*R: 8_{Min} - 288_{Max}*) ($p = 0,008$). En las temperaturas de 22°C Y 32°C se pueden encontrar diferencias significativas, y en la última temperatura la pérdida más progresiva de celularidad.

Análisis de tiempo de pre-procesamiento de fragmentos de UC

Se encontraron diferencias significativas al comparar el tiempo de procesamiento de 6h con una celularidad promedio de 144 cel/mg, 12h con 117 cel/mg ($p = 0,048$), y 24h con 102 cel/mg ($p = 0,022$); de igual manera, las comparaciones entre 12h, 24h (102 cel/mg), 48h (78 cel/mg) y 72h (86 cel/mg) ($p = 0,024$). La celularidad entre el mismo grupo de datos de cada periodo de tiempo es significativamente diferente desde las 24 horas, con un $p = 0,018$.

En la Figura 7 se observan los datos a las 6h, que presentaron una mediana de celularidad de 150 cel/mg (*R: 38_{Min} - 271 cel/mg_{Max}*); a las 12 h con una celularidad de alrededor de

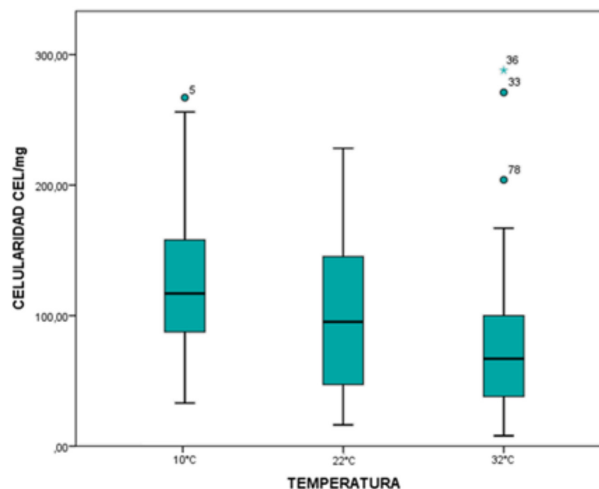


Figura 6. Celularidad cel/mg vs temperatura pre-procesamiento de fragmentos de CU. Se muestra la mediana de los datos adquiridos para cada una de las temperaturas con sus respectivos rangos mínimo y máximo.

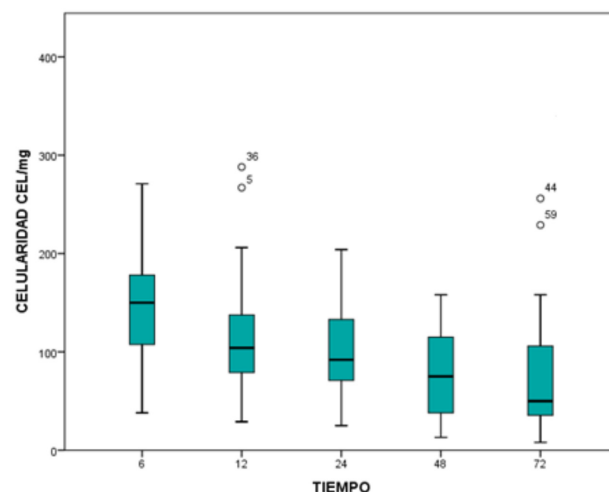


Figura 7. Celularidad cel/mg vs tiempo de pre-procesamiento de los fragmentos de CU. Se muestra la mediana de los datos adquiridos para los diferentes tiempos de pre-procesamiento con sus respectivos rangos mínimo y máximo.

104cel/mg ($R: 29_{Min} - 288 \text{ cel/mg}_{Max}$); a las 24 h con 92cel/mg ($R: 25_{Min} - 204 \text{ cel/mg}_{Max}$); para las 48 h se presenta aproximadamente 75cel/mg ($R: 13_{Min} - 158 \text{ cel/mg}_{Max}$), y en las 72 h una celularidad de casi 50cel/mg ($R: 8_{Min} - 256 \text{ cel/mg}_{Max}$).

Discusión

El conocimiento de las condiciones óptimas para la preservación y almacenamiento de células nucleares provenientes de gelatina de Wharton no ha atraído suficiente atención a pesar de que, la mayoría de los trabajos enfocados en el aislamiento y cultivo de las WJ-MSCs, señalan un límite de tiempo a una determinada temperatura para transportar los CU desde el sitio o centro hospitalario del parto o cesárea, hasta el laboratorio de procesamiento de las células. Tal es en el caso del trabajo desarrollado por Costa y Fernando (2015), que establece un tiempo máximo de mantenimiento pre-procesamiento de 12h a temperatura de 4°C en PBS. También Seshareddy, Troyer, & Weiss (2008), indican que el cordón se procesa dentro de las 12 a 24h después del nacimiento, a una temperatura de 4°C. Adicionalmente, Dulugiac et al. (2015) mantuvieron los UCs en PBS a 4°C en un plazo de 48h. Comparativamente, en el presente trabajo, los datos muestran que desde las 12 h la viabilidad disminuye en cada temperatura. Después de las 24 h, en temperaturas de 22°C y 32°C la viabilidad disminuye significativamente ($p < 0,001$ en las dos temperaturas), mientras que en la temperatura de 10°C se mantiene por encima de 70% a las 72h.

Igualmente, Muraki et al. (2006), al evaluar la viabilidad de las MSCs obtenidas de la médula ósea, indicaron que, a medida en que transcurría el tiempo, la viabilidad disminuía de forma progresiva. Utilizaron tres temperaturas (4, 24 y 37°C) y tiempos diferentes (0, 1, 3, 6 y 24 horas). Señalaron que las células se mantuvieron por encima de 85% de viabilidad tanto a 4°C como a 24°C durante 6h, y más de 80% de viabilidad a 4°C durante las 24h, mientras que la viabilidad de las células a 24°C y 37°C disminuyó significativamente. Aunque el tipo de fuente de obten-

ción de las células es diferente al presente estudio e implica otra variable, los datos son similares, al igual que el comportamiento de la viabilidad celular a través del tiempo.

Otros autores como Oliver-Vila *et al.*, (2016) utilizaron fragmentos de CU procesados dentro de las 80h desde el nacimiento; en el caso de Qiao *et al.* (2008), el periodo óptimo de procesamiento es de 6h. Salehinejad *et al.*, y Arbós *et al.* (2013) mantuvieron los UCs en PBS a 4°C hasta su procesamiento. De acuerdo con esos experimentos, la temperatura de 4°C es la más utilizada para el mantenimiento del cordón hasta su procesamiento dentro de un periodo promedio de 12-24h. Los datos encontrados en el presente estudio indican que la temperatura ideal para la preservación y transporte del tejido de UCs es de 10°C, con un tiempo máximo de conservación de 24 horas.

Según los datos hallados y corroborados por citometría en las primeras 12 h, se puede observar que en las tres temperaturas se mantiene la viabilidad por encima de 80%. Sin embargo, a 32°C la viabilidad disminuye significativamente; después de 72 h la viabilidad es de 64,6%. Respecto al tiempo, se observa una disminución progresiva de la viabilidad con el método 7-AAD, obteniéndose una viabilidad óptima en un periodo de conservación máximo de 24h, con 74%.

Lo anterior sugiere que el tiempo óptimo para mantener las muestras antes de su procesamiento es de 24 h, tanto con el método de azul tripano (76,8%), como con el de 7-ADD (74%).

Por lo que se refiere a la celularidad se advierte una alta variabilidad entre las diferentes muestras e incluso entre los diferentes fragmentos de un mismo cordón; lo anterior probablemente se deba a la heterogeneidad que presenta la muestra, de tal forma que según el tipo de tejido del que se trate, será la equivalencia del número de células, entendiéndose que a mayor número de células, mayor probabilidad de expansión y de utilización en ensayos clínicos con MSCs.

En este estudio las muestras conservadas a 10°C no presentaron diferencias significativas a través del tiempo ($p=0,778$), en comparación con las preservadas a 22°C y a 32°C en las cuales, en el transcurso de las primeras 12 h y 48h respectivamente, se observan diferencias significativas en la celularidad ($p=0,02$, $p=0,047$). Los datos hallados son comparables con el estudio realizado por Arbós *et al.* (2013), quienes no encontraron relación entre el tiempo transcurrido y el rendimiento en la obtención de células en las muestras que se mantuvieron a 4°C por 24h. Además, otro dato que concuerda con los hallazgos de este análisis (Arbós *et al.*, 2013), se refiere a la celularidad por miligramo (*mg*) de tejido, pues se encontraron alrededor de 100 cel/mg al usar la collagenasa como método de tratamiento, en comparación con este trabajo, que muestra 150 cel/mg en promedio ($38_{\text{Min}} - 271_{\text{Max}} \text{ cel/mg}$).

Salehinejad *et al.* (2012), obtuvieron un aislamiento promedio de células de $0,5 \times$ a partir de fragmentos de cordón de entre 3 y 5 cm; las muestras fueron tratadas con disociación enzimática collagenasa tipo II, y se mantuvieron a 4°C antes de su procesamiento. Por otro lado, Fu *et al.* (2006), encontraron una celularidad aproximada de $1 \times$ células madre me-

senquimales humanas (UC-hMSCs), recogidas a partir de 20 cm de UC conservadas a 4°C, al igual que en el estudio de Yan et al. (2013), quienes obtuvieron alrededor de $3 \times$ UC-hMSCs de 20 cm de UC. Aunque el objetivo primordial de estos estudios fue la comparación de métodos enzimáticos, y determinar la capacidad de diferenciación de las células mesenquimales, esos hallazgos permiten comparar su celularidad inicial con la observada en este estudio, que reporta la obtención de un promedio de células en muestras mantenidas a 10°C de $0,7 \times$ (Min $1,9 \times$ - Max $1,6 \times$ cel/mg) en fragmentos de cordón de 2cm de los cuales se tomaba casi la totalidad de la gelatina (600mg) pudiéndose observar proximidad en la celularidad obtenida en los anteriores estudios.

En la literatura global no se encuentran ensayos que establezcan protocolos, guías y/o directrices para el adecuado manejo de los tejidos de cordón umbilical; sin embargo, la temperatura y el tiempo empleados en estos, es la que se aconseja para mantener la mayoría de los tejidos.

Aunque la recolección de las células de esta muestra se realiza primordialmente para su posterior cultivo y diferenciación, es necesario garantizar que las muestras mantengan una viabilidad y celularidad adecuadas. Después de realizar los estudios respectivos, los datos indican que cuando se trata de muestras de cordón umbilical de donde se tomarán las WJ-MSCs, una temperatura de 10°C junto con un tiempo máximo de 24h, representan la mejor opción para el transporte de la muestra desde la clínica al laboratorio antes de su procesamiento (Ávila-Portillo et al., 2006).

Limitantes del estudio

Se recomienda realizar estudios posteriores con una muestra mayor a la utilizada en este trabajo, lo cual permitiría aumentar el grado de confianza en los resultados.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado

Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Referencias Bibliográficas

Altanerova, U., Babincova, M., Babinec, P., Benejova, K., Jakubechova, J., Altanerova, V., y Altaner, C. (2017). Human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes allow targeted ablation of tumor cells via magnetic hyperthermia. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 7923–7936. <https://doi.org/10.2147/IJN.S145096>

Arbós, A., Nicolau, F., Quetglas, M., Ramis, J. M., Monjo, M., Muncunill, J., y Gayà, A. (2013). Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunología*, 32(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2012.11.002>

Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., y Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300.

Batsali, A. K., Kastrinaki, M. C., Papadaki, H. A., y Pontikoglou, C. (2013). Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 8(2), 144–155.

Chen, G., Yue, A., Ruan, Z., Yin, Y., Wang, R., Ren, Y., y Zhu, L. (2015). Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from maternal-origin placenta and Wharton's jelly. *Stem Cell Research & Therapy*, 6. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0219-6>

Costa, C., y Fernando, D. (2015). 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. Recuperado de <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/29597>

Dulugiac, M., Moldovan, L., y Zarnescu, O. (2015). Comparative studies of mesenchymal stem cells derived from different cord tissue compartments – The influence of cryopreservation and growth media. *Placenta*, 36(10), 1192–1203. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.08.011>

Fu, Y.-S., Cheng, Y. C., Lin, M.-Y. A., Cheng, H., Chu, P.-M., Chou, S.-C., y Sung, M. S. (2006). Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(1), 115–124. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0053>

Kang, S. K., Shin, I. S., Ko, M. S., Jo, J. Y., y Ra, J. C. (2012). Journey of mesenchymal stem cells for homing: Strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem Cells International*, (2012), e342968. Recuperado de <https://doi.org/10.1155/2012/342968>

Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A., y Mobasheri, A. (s/f). Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.016>

Muraki, K., Hirose, M., Kotobuki, N., Kato, Y., Machida, H., Takakura, Y., y Ohgushi, H. (2006). Assessment of viability and osteogenic ability of human mesenchymal stem cells after being stored in suspension for clinical transplantation. *Tissue Engineering*, 12(6), 1711–1719. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1711>

Oliver-Vila, I., Coca, M. I., Grau-Vorster, M., Pujals-Fonts, N., Caminal, M., Casamayor-Genescà, A., y Vives, J. (2016). Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. *Cytotherapy*, 18(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.001>

Pal, R., Hanwate, M., y Totey, S. M. (2008). Effect of holding time, temperature and different parenteral solutions on viability and functionality of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells before transplantation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(7), 436–444. <https://doi.org/10.1002/term.109>

Portillo, L. M. Á., Ruiz, D. J. F., García, J. P. A., Arocha, A. G. R., y Mauricio, S. (2015). Comparación de la viabilidad y crecimiento en cultivo de células madre adultas obtenidas de tejido adiposo pre y post congelamiento. *Nova*, 13(24), 27–38.

Qiao, C., Xu, W., Zhu, W., Hu, J., Qian, H., Yin, Q., y Chen, Y. (2008). Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biology International*, 32(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.08.002>

Salehinejad, P., Alitheen, N. B., Ali, A. M., Omar, A. R., Mohit, M., Janzamin, E., y Nematollahi-Mahani, S. N. (2012). Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 48(2), 75–83. <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9480-x>

Seshareddy, K., Troyer, D., & Weiss, M. L. (2008). Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's jelly of umbilical cord. *En B.M. C. Biology*, 86,

101–119. Academic Press. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X0800006X>

Sharma, R. R., Pollock, K., Hubel, A., & McKenna, D. (2014). Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*, 54(5), 1418–1437. <https://doi.org/10.1111/trf.12421>

Stanko, P., Kaiserova, K., Altanerova, V., & Altaner, C. (2014). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 158(3), 373–377. <https://doi.org/10.5507/bp.2013.078>

Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2). <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>

Umbilical Cord Mesenchymal. (2016, mayo 3). Recuperado de <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Umbilical+cord+mesenchymal+&Search=-Search>

Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 5, 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-19>

Yan, M., Sun, M., Zhou, Y., Wang, W., He, Z., Tang, D., ... Li, H. (2013). Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PloS One*, 8(5), e64000. Recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064000>