



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**DETERMINACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS SECRETADAS
POR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DEL
CORDÓN UMBILICAL**

PRESENTADO POR
MARCO MOISES MALAGA JULCA

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

PRESENTADA POR
MARCO MOISES MALAGA JULCA

ASESOR
DR. JOEL DE LEON DELGADO

LIMA – PERÚ
2021



Reconocimiento - No comercial - Compartir igual
CC BY-NC-SA

El autor permite entremezclar, ajustar y construir a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**DETERMINACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS
SECRETADAS POR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
DERIVADAS DEL CORDÓN UMBILICAL**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

**PRESENTADA POR
MARCO MOISES MALAGA JULCA**

**ASESOR
DR. JOEL DE LEON DELGADO**

LIMA, PERÚ

2021

JURADO

Presidente:

DR. DENIS ELEAZAR ARANA JURADO

Miembro:

Dr. SIXTO SÁNCHEZ CALDERÓN

Miembro:

Dr. JOSÉ LÓPEZ REVILLA

ÍNDICE

	Págs.
Portada	i
Jurado	ii
Índice	v
Resumen	vi
Abstract	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	7
III. RESULTADOS	17
IV. DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
RECOMENDACIONES	37
FUENTES DE INFORMACIÓN	38
ANEXOS	

RESUMEN

Objetivos: Determinar la concentración de citocinas inflamatorias secretadas por Células Madre Mesenquimales (CMMs) derivadas del cordón umbilical

Metodología: Estudio observacional, descriptivo, comparativo, transversal. Se cultivó CMM a partir de gelatina de Wharton o sangre de 13 cordones umbilicales obtenidos de partos atendidos en el Hospital Nacional Dos de Mayo (HNDM), de enero a diciembre de 2018. Se identificaron factores asociados al éxito del cultivo usando la prueba de chi cuadrado. Se determinó la concentración de citocinas pro-inflamatorias secretadas por las CMM usando una prueba ELISA en el secretoma obtenido a partir de células extraídas de gelatina de Wharton. Todos los datos se tabularon y procesaron con el paquete estadístico STATA 10.

Resultados: De los 17 cultivos celulares realizados, la tasa de éxito de crecimiento celular fue 33%. La gelatina de Wharton presentó una mayor tasa de éxito que la sangre umbilical. Un tiempo de procesamiento mayor de dos horas disminuyó la tasa de éxito. Finalmente, se encontró que las CMMs secretaron IL-6 e IL-8 en concentraciones superiores a los 3 ng/ml y 1 ng/ml respectivamente. No se encontró secreción de EGF mayor al secretoma usado como control (poner mas claro esto). Los resultados para IGF- no fueron concluyentes.

Conclusiones: Asimismo, el aislamiento de CMMs del cordón umbilical tiene una tasa de éxito baja, siendo mas alta en cultivos provenientes de la gelatina de Wharton. Los CMMs aisladas de cordón umbilical secretan IL-6 e IL-8, pero no secretan EGF, lo que sugiere el valor potencial del secretoma para su uso en medicina regenerativa.

Palabras clave: Células madre, técnicas de cultivo celular, medicina regenerativa

ABSTRACT

Objective: To determine the concentration of pro-inflammatory cytokines in the secretome of umbilical-cord derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

Methodology: Observational, descriptive, comparative, transversal study. We evaluated MSCs isolated from umbilical cords obtained from deliveries that took place at “Dos de Mayo” National Hospital from January to December of 2018. We identified factors associated with culture success rate using the Chi-squared test. We determined the concentration of pro-inflammatory cytokines using an ELISA assay in the secretome of cultured cells. Data was tabulated and processed using STATA 10.

Results: Out of 17 cell cultures, success rate was 33%. Cells obtained from Wharton jelly showed a higher success rate, while a processing time over two hours reduced it. Finally, we found that MSCs secreted IL-6 and IL-8 at concentrations over 3 ng/ml and 1 ng/ml, respectively. We did not find increased secretion of EGF compared to control. Results for IGF-1 were non conclusive.

Conclusions: MSCs isolated from umbilical cord secrete IL-6 and IL-8, but not EGF. This suggests the potential use of MSCs secretome in regenerative medicine. However, isolating MSCs from umbilical cord has a low success rate, which increases if the source material is the Wharton jelly.

Keywords: Stem cells, cell culture techniques, regenerative medicine

I. INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (CMMs) tienen propiedades inmunomoduladoras y secretoras que contribuyen a la regeneración de tejidos (1). Por ello, se han planteado múltiples aplicaciones clínicas, tales como la prevención y tratamiento de quemaduras, cicatrices, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, falla hepática, y enfermedad injerto-contra-huésped (2–7). Sin embargo, no existe un consenso en el procedimiento más adecuado para aplicar los diferentes tratamientos basados en CMMs.

Una de las propuestas es la implantación directa, que en el caso de órganos profundos se realiza mediante infusión por vía sanguínea (8,9). No obstante, se ha observado que las CMMs pueden entrar en apoptosis o perder su anclaje a un determinado tejido después de haberse implantado (10). Además, el método utilizado para inducir la implantación influye en las propiedades secretoras de las CMMs (11).

Por ello, alternativas 'libres de células' han tomado relevancia recientemente (12,13). Estas utilizan una colección de citocinas y compuestos secretados por las células madre, a las que denominan secretoma (3). El secretoma puede ser fraccionado según las características funcionales o químicas de sus componentes, para ser administrado en la zona deseada (13). La mayor parte de las funciones de las CMMs están mediadas por los componentes que estas secretan (14). Por ejemplo, se ha evidenciado que la aplicación terapéutica del secretoma incrementa significativamente la regeneración celular, aún sin utilizar CMMs (15).

Se han considerado dos propiedades importantes de este secretoma en la regeneración de tejidos: inmunomodulación y trofismo (16). Los efectos de inmunomodulación parecen estar relacionados a las citocinas secretadas por las CMMs (17). Un estudio que evaluó el efecto de este en un modelo animal de fallo hepático encontró reducción en la infiltración leucocitaria, lo que sugiere que es uno de los posibles mecanismos de reparación tisular (6). Por otro lado, también

se ha encontrado que el secretoma aumenta la quimiotaxis de monocitos CD14+ y células endoteliales (18). Estos efectos parecen ser dependientes de las células receptoras, sin embargo, de forma general las CMMs reducen la inmunogenicidad y la citotoxicidad (19). Por su parte, el trofismo se expresa de forma distinta en diferentes tejidos, lo que aumenta o disminuye la neovascularización, en dependencia de la región expuesta al secretoma (20).

Es importante resaltar que el perfil secretor de las CMMs varía dependiendo del origen de las células, el método usado para su cultivo, y las características del medio en el que crecen (21–24). En tanto al origen, los primeros cultivos de CMMs se realizaron de aspirados de médula ósea (25,26). A continuación, debido a la invasividad del procedimiento, se estudiaron alternativas como el tejido adiposo, pulpa y otros tejidos dentarios, y la membrana sinovial (27–31). No obstante, el cordón umbilical ha resaltado como una fuente de CMMs debido a que su tejido de origen es usualmente descartado, presenta mayor cercanía a células totipotenciales fetales, y tiene relativa abundancia de las mismas (31–33).

Sin embargo, incluso si las CMMs tienen un mismo origen, estas pueden derivar en líneas celulares que difieren en sus propiedades secretoras, las que pueden o no ser homogeneizadas dependiendo del método de extracción (34–37). Tanto Yoo et al., en 2009 como Mennan et al., en 2013 realizaron comparaciones entre el perfil secretorio de CMMs de cordón umbilical, extraídas de gelatina de Wharton y de sangre umbilical, encontrando diferencia en la secreción de IL-6 e IL-8 (38,39).

Además, el condicionamiento de las CMMs, a través de modificaciones en su medio de cultivo con fármacos, proteínas u otros, resulta en variaciones en la composición del secretoma y su eficacia en la regeneración de tejidos (40). Por ejemplo, existe evidencia de que señales que producen estrés celular, como el TNF-alfa, lipopolisacáridos de pared bacteriana (LPS) o la hipoxia, resultan en la liberación de factores angiogénicos (41–43).

Existen múltiples citocinas involucradas en la actividad inmunomoduladora y regenerativa de las CMMs (1). Una de ellas es la Interleucina 6 (IL-6), una citocina que presenta dos vías según su receptor: pro inflamatoria si es soluble, y regenerativa si es de membrana (44). Se ha descubierto que esta segunda propiedad, es una de las responsables de la actividad inmunosupresora de las CMMs, lo que reduce la inflamación local (45) o inhibe la diferenciación de células dendríticas (46). Si la IL-6 se encuentra elevada en un tejido, junto a la interleucina 8 (IL-8), aumenta la velocidad de reparación del mismo (47). Esta última resulta de importancia pues presenta actividad angiogénica (48) y quimio-atrayente de queratinocitos (49), las cuales promueven la regeneración de tejidos.

Por otro lado, el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés) es una hormona péptida producida por CMMs que también promueve la regeneración, a través de la neovascularización, la proliferación y la diferenciación (50,51). Otro componente del secretoma de relevancia, es el Factor de Crecimiento Endotelial (EGF, por sus siglas en inglés) y su receptor, que se encuentran frecuentemente en tejidos en regeneración y están relacionados a la estimulación, proliferación y migración de células endoteliales y queratinocitos (52–54).

Por lo tanto, dado su rol en la regeneración de tejidos y su amplia variabilidad, resulta de importancia caracterizar la composición de citocinas proinflamatorias que forman parte del secretoma de CMMs obtenidas de una fuente común, bajo un método de cultivo estándar.

En este trabajo, se planteó como objetivo determinar la concentración de citocinas proinflamatorias en CMMs derivadas del cordón umbilical. Adicionalmente, determinar el método de mayor tasa de éxito para su cultivo y los factores asociados al mismo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipos y diseño

Estudio observacional, descriptivo, transversal.

2.2 Diseño muestral

Población universo

Células Madre Mesenquimales aisladas a partir de cordones umbilicales obtenidos de partos en Perú.

Población de estudio

Células Madre Mesenquimales aisladas a partir de cordones umbilicales obtenidos de partos en Perú.

Diseño de muestra

Células Madre Mesenquimales aisladas a partir de cordones umbilicales obtenidos de partos realizados en el Hospital Nacional Dos de Mayo (HNDM), de enero a diciembre de 2018.

Tamaño de la muestra de estudio

Se usó la fórmula para hipótesis de comparación de medias en poblaciones finitas de distribución normal y varianza conocida (67):

$$n = 2 \frac{\left(\left(\frac{Z_{\alpha} + Z_{\beta}}{2} \right) \vartheta \right)^2}{\delta}$$

Donde se conoce el valor Z del error tipo 1 y tipo 2 y la desviación estándar, y se desconoce la diferencia esperada entre las medias. Para una significancia en 0.05 y una potencia del estudio en 0.90, los valores Z correspondientes son 1.96 y 1.28 respectivamente. La desviación estándar de la concentración de una de las citocinas (IL-6), obtenida de la literatura fue de 1073 (39). Se estimó la diferencia en 2500 a partir de la data publicada por Yoo y colaboradores (41). De esta forma, se determinó un total de 4 cultivos de CMMs derivadas de cordones umbilicales diferentes

$$n = 2 \frac{((1.96 + 1.28)2500)^2}{1073} = 3.86 \cong 4$$

Muestreo

El tipo de muestreo a realizar es de tipo no probabilístico por conveniencia.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

CMMs de cordones obtenidos de partos por cesárea realizados en el HNMD, entre enero y diciembre de 2018.

Criterios de exclusión

CMMs de cordones obtenidos de gestantes que presenten al menos una de las siguientes condiciones: preclamsia, natimuerto, enfermedad infecciosa tropical, enfermedad de transmisión sexual, infección por Hepatitis B.

CMMs de cordones obtenidos de pacientes con gestación múltiple

CMMs de cordones obtenidos de gestantes que no brinda su consentimiento.

2.3 Técnicas y procedimientos de recolección de datos

Instrumentos de recolección de datos

El proceso se ejecutó a partir de enero de 2018 en el HNMD, el Laboratorio de Bioingeniería de la Universidad de Ingeniería y Tecnología, y el Centro de Infectología e Inmunología de la Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres (FMH-USMP).

El proceso se dio en 5 etapas: recolección de cordón umbilical, aislamiento de células y cultivo, verificación de células, aislamiento del secretoma, y determinación de citocinas en el secretoma. El procedimiento utilizado para el aislamiento de células se basó en la metodología publicada por Seshareddy et al., (55) y Gnechi et al., (56), adaptado a las necesidades de la investigación.

Técnica de recolección de datos

1. Obtención de cordones umbilicales y transporte de muestras

La explicación del consentimiento informado fue realizada por el tesista, con el apoyo de personal del servicio de Obstetricia del Departamento de Ginecobstetricia del HNDM. El parto de las gestantes de las cuales se obtuvo el cordón umbilical fue por cesárea o parto vaginal de acuerdo con la indicación del médico tratante.

Tras el corte del cordón umbilical durante la cesárea o parto vaginal, se procedió a la obtención de muestras. Primero, se sujetó el extremo recién cortado y se limpió el área con una gaza. De forma estéril, se removió la tapa de la aguja de la bolsa de colección de sangre y se insertó en el área limpiada previamente. Se extrajo la sangre del cordón umbilical hacia la bolsa de colección de sangre. Una vez culminado este procedimiento, el investigador colocó el cordón umbilical en un frasco estéril con suero fisiológico (0.9% NaCl) a 4°C. La muestra fue transportada en una caja conservadora de temperatura hasta su procesamiento. El tiempo hasta este se definió como el tiempo entre la hora de nacimiento, cuando la muestra fue recolectada, y el inicio del proceso de aislamiento.

2. Aislamiento y cultivo de CMM provenientes de la gelatina de Wharton y la sangre umbilical

Para el aislamiento celular, se utilizó ambos métodos en tanto la muestra fuera suficiente. Para la gelatina de Wharton, se enjuagó la superficie del cordón umbilical con solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés Phosphate Buffered Solution) para remover la sangre restante y reducir el riesgo de contaminación. Toda la manipulación del control se realizó en una placa Petri estéril de 10 cm. A continuación, se cortó el cordón en fragmentos de 3 a 5 cm con el uso de un bisturí estéril, se removieron los vasos sanguíneos y se enjuagó el remanente con PBS (Fig. 1).

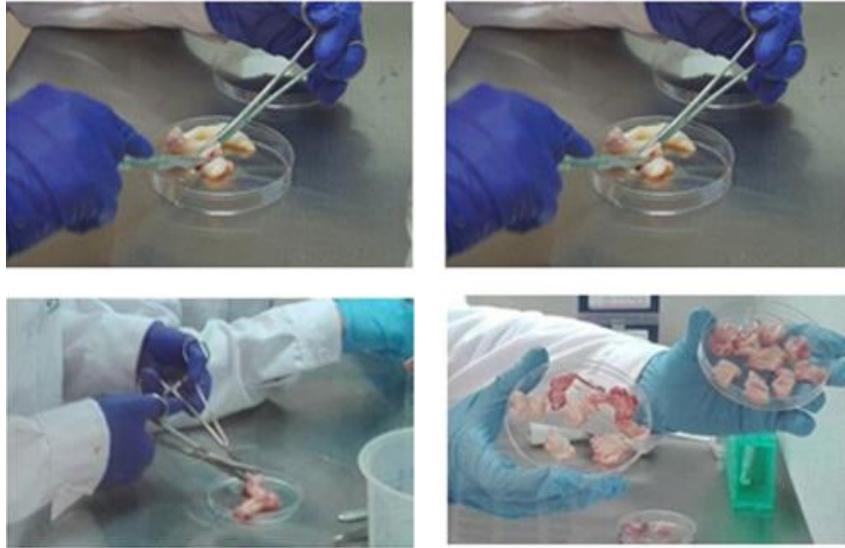


Figura 1. Procesamiento de los cordones umbilicales para obtener fragmentos de 3-5 cm

Luego se procedió a la digestión enzimática, para lo cual se agregó 1 ml de solución de colagenasa tipo A de stock (2800 u/ml; Sigma-Aldrich) diluida en 9 ml de DMEM (Gibco), a una concentración final de 280 u/ml. Se colocó el tejido en un tubo e inicialmente se evaluaron tiempos de incubación entre 1-3 horas, a 37°C.

Finalmente, se determinó utilizar un tiempo de 1 hora y 30 minutos. Las piezas resultantes se trituraron en el propio tubo, y este se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos (Fig 2). Las piezas pasaron a un nuevo tubo con 0.1% de Tripsina-EDTA (Gibco) y se incubaron por 8 minutos a 37°C. Se retiraron las piezas, se descartaron, y se centrifugó el tubo con el resultado de la digestión. Se combinaron los pellets de ambos tubos re-suspendiéndose en 3ml de medio DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés, ThermoFisher) al 10%. Se completó hasta 9 ml de medio y las células se sembraron en un frasco de cultivo T-75 y se incubaron a 37°C y 5% de atmósfera de CO₂, por 72h.



Figura 2. Trituración de fragmentos de cordón umbilical tras digestión enzimática para recuperar la mayor cantidad de matriz extracelular con células embebidas.

Para aislar la sangre umbilical, se diluyó la muestra en PBS en una relación 1:1 (V:V). A continuación, se realizó una gradiente Ficoll-Paque (Merck Millipore) para aislar las células mononucleares (Fig. 3). Se removió la fase plasmática, se centrifugó y se suspendió el pellet en 10 ml de medio DMEM con FBS al 10%. Las células se sembraron en un frasco de cultivo T-75 e incubaron a las mismas condiciones que las células provenientes del tejido umbilical.

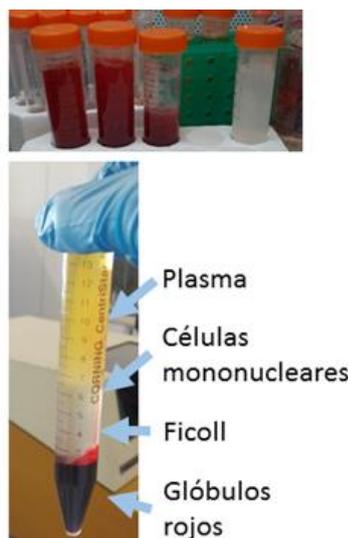


Figura 3. Arriba: Alícuotas de sangre de cordón umbilical. Abajo: Sangre tras separarse en fases con Ficoll (cada fase se señala con flechas).

3. Caracterización de los cultivos y CMMs

El cambio de coloración del medio de cultivo es un subrogado de actividad metabólica celular. El medio DMEM utilizado para el cultivo celular contiene un indicador de pH, que torna al medio más amarillo en condiciones más ácidas. Estas condiciones corresponden con el incremento del metabolismo celular, por la liberación al medio de metabolitos residuales. Sin embargo, esta evidencia es inespecífica, pues puede deberse a contaminación bacteriana.

Por lo tanto, se evidenció el crecimiento celular a través de un microscopio invertido (Zeiss), buscando la presencia de células adherentes al plástico con confluencia célula. Este es uno de los tres criterios usados para determinar la presencia de CMMs. Los criterios restantes incluyen la expresión de CD105, CD73, CD90 y carencia de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 y HLA II en al menos el 95% de la población; y ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (57). Estos no fueron evaluados.

4. Caracterización de agentes contaminantes

En caso un cultivo presentará contaminación, este era retirado del estudio y descartado. Se iniciaban medidas de antisepsia en el área de cultivo. Además, se aislaba el agente contaminante y se evaluaba a través de su crecimiento en Agar Sabouraud y la formación de colonias. Se clasificaron en *Aspergillus* spp., *Candida* spp., u otros, según las características de la colonia descritas en la literatura (58).

5. Aislamiento de secretoma

Para aislar el secretoma, se utilizaron cultivos de CMM donde se logró una confluencia mayor al 75%. Se retiró todo el medio y se agregaron 5ml de medio fresco sin SFT. Se incubaron las células por 2-3 días, el sobrenadante se colectó, se centrifugó y se filtró con un filtro de 0.45um (Merck Millipore). Finalmente se almacenó el secretoma a -20°C. El procedimiento utilizado se describe a continuación.

6. Medición de absorbancia de secretomas

La medición de absorbancia de cada secretoma se realizó utilizando 2µl de cada muestra en un espectrómetro comercial (Nanodrop v1000) a 280nm. Se

siguió el procedimiento según el protocolo del laboratorio, cuidando de la limpieza del pedestal entre mediciones.

7. Determinación de la concentración de moléculas de interés en el secretoma

Se evaluó la concentración de las citosinas IL-6 y IL-8 y las moléculas IGF-1 y EGF en el secretoma utilizando un Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzima (ELISA, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) comercial (Sigma). Para cada juego de reactivos, se desarrolló una curva estándar según lo indicado por el fabricante. Las concentraciones de moléculas incluidas en la curva estándar fueron: 1000, 333.3, 111.1, 37.04, 12.35, 4.12, 1.37 y 0. Se utilizaron como control negativo los secretomas de cultivos donde no había evidencia de crecimiento, dado que este había recibido los mismos recambios de medio y exposición a suero fetal bovino que el Medio condicionado o secretoma.

2.4 Procesamiento y análisis de datos

Cada cordón umbilical se codificó de la siguiente forma: O. #. Donde O puede ser SU [Sangre umbilical] o WJ [Gelatina de Wharton] y # refiere al número de secretoma en un solo dígito [1, 2, 3 o 4]. Se elaboró una tabla con las características de la población utilizada como fuente de cordón umbilical.

La asociación de las características del procesamiento de las muestras y la probabilidad de contaminación del cultivo se realizó utilizando una prueba de Chi-cuadrado.

Finalmente, la concentración de citocinas se calculó a partir de la curva estándar desarrollada con el programa del equipo de lectura (Microplate Reader, BioRad). Todos los datos se tabularon y procesaron con el paquete estadístico STATA 10. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de $p < 0.05$.

2.5 Aspectos éticos

El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la FMH-USMP como Plan de Tesis del autor. Además, se aprobó en el Comité de Ética del Hospital Nacional Dos de Mayo, institución donde se obtuvieron las muestras de cordones umbilicales.

Las pacientes que brindaron las muestras fueron informadas y su consentimiento fue solicitado antes de iniciar la recolección, la cual se llevó a cabo por el médico tratante durante el proceso de parto. Se entregó una copia del consentimiento informado firmado a cada paciente. Se adjunta el consentimiento informado en los anexos.

III. RESULTADOS

Aislamiento y cultivo de CMM a partir de cordón umbilical

Se procesaron 13 cordones umbilicales de los cuales se obtuvieron 17 cultivos diferentes. De estos, en 13 se utilizó la gelatina de Wharton, mientras que en 4 la sangre umbilical. En 5 cultivos hubo evidencia insuficiente sobre el crecimiento celular para definir el resultado del cultivo, es decir, el cultivo se detuvo antes de realizar la observación del crecimiento debido a causas como la contaminación de este.

El número de cultivos exitosos fue de 4, que corresponde a una tasa de éxito del 33% a partir de 12 cultivos (Tabla 1). Este porcentaje se incrementó cuando la muestra se procesó en menos de 2h y cuando se utilizó gelatina de Wharton.

Tabla 1. Características de los cultivos de CU-CMMs y crecimiento celular

Características	n	%	Crec celular (%) n=12
Cultivos	17		
Evidencia de crecimiento	4	24%	33%
Ausencia de crecimiento	8	47%	67%

Evidencia insuficiente	5	29%	
Tipo de parto			
Eutócico	2	12%	-
Cesárea	15	88%	33%
Tiempo de procesamiento			
<2h	6	35%	40%
>2h	11	65%	29%
Espécimen de aislamiento			
Gelatina de Wharton	13	76%	40%
Sangre umbilical	4	24%	0%
Contaminación			
No	8	47%	40%
Si	9	53%	0%

Tabla 2. Matriz de cultivos de CU-CMMs

CU	Cultivo	Exito	Parto	Tiempo	Aislamiento
1	1	-	Cesárea	>2h	GW
	2	-	Cesárea	>2h	Sangre
2	3	-	Cesárea	<2h	Sangre
3	4	-	Eutócico	>2h	GW
4	5	Si	Cesárea	<2h	GW
5	6	-	Eutócico	>2h	GW
6	7	No	Cesárea	>2h	Sangre
	8	No	Cesárea	>2h	GW
7	9	Si	Cesárea	>2h	GW
8	10	No	Cesárea	<2h	GW
9	11	No	Cesárea	<2h	Sangre
	12	Si	Cesárea	<2h	GW
10	13	No	Cesárea	<2h	GW
11	14	No	Cesárea	>2h	GW
12	15	No	Cesárea	>2h	GW
13	16	No	Cesárea	>2h	GW

Dentro de los cultivos que no fueron exitosos, la causa más frecuente fue la contaminación microbiológica. El contaminante más frecuente fue el *Aspergillus* spp (44%), seguido de *Candida* spp (22%). Los agentes contaminantes restantes no se pudieron identificar. Los factores posiblemente asociados a la contaminación son el parto vaginal, un tiempo largo de procesamiento y el uso de la gelatina de Wharton como sustrato). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre estos factores a usando la prueba de Chi-2 (Tabla 3).

Tabla 3. Factores asociados a contaminación en cultivos de CU-CMMs

Factores	No (%)	Si (%)	p
Tipo de parto			0.156
Natural	0 (0%)	2 (100%)	
Cesárea	8 (53%)	7 (47%)	
Tiempo de procesamiento			0.858
<2h	3 (50%)	3 (50%)	
>2h	5 (45%)	6 (55%)	
Tipo de aislamiento			0.312
Gelatina de Wharton	7 (53%)	6 (47%)	
Sangre umbilical	1 (25%)	3 (75%)	

Se evidenció el cambio de coloración en el medio de cultivo y el crecimiento de células adherentes con forma fibroblastoide, similar al descrito en la literatura para las CMM. Imágenes representativas se adjuntan en la Figura 4.

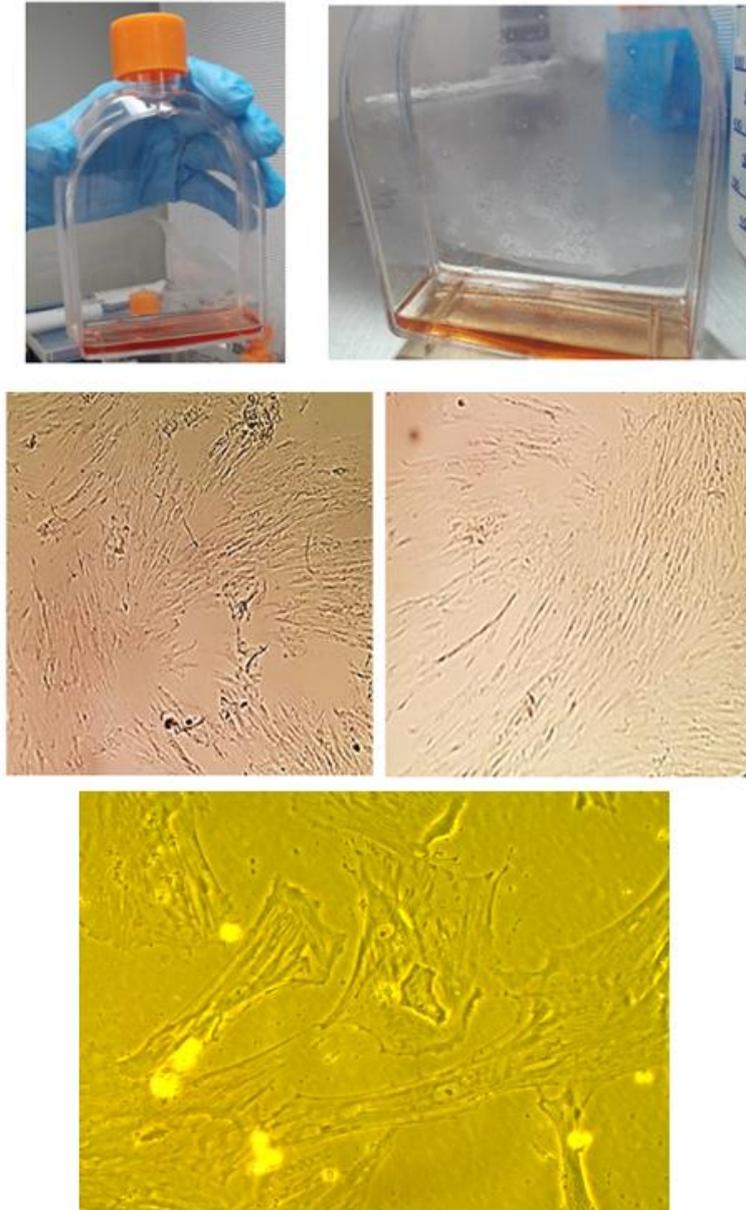


Figura 4. Arriba: Cambio de coloración en los frascos con cultivo derivado de sangre umbilical y gelatina de Wharton, tras 5 y 7 días respectivamente; Centro: Cultivo de CMMs de gelatina de Wharton con 10 días de crecimiento. Magnificación 20x; Debajo: Cultivo de CMMs de gelatina de Wharton con 21 días de crecimiento. 30X

Evaluación inespecífica de moléculas de interés

Se evaluaron 3 secretomas de CMMs provenientes de cultivos diferentes con

evidencia de crecimiento por microscopía . Los valores obtenidos de absorbancia de proteínas para cada secretoma junto al número de días de cultivo, imágenes del cultivo e información sobre el tejido de origen se resumen en la Tabla 4.

La superposición de las curvas de absorbancia según el número de días de los cultivos y la relación entre concentración de proteínas y número de días del cultivo pueden observarse en las Figuras 5 y 6, respectivamente.

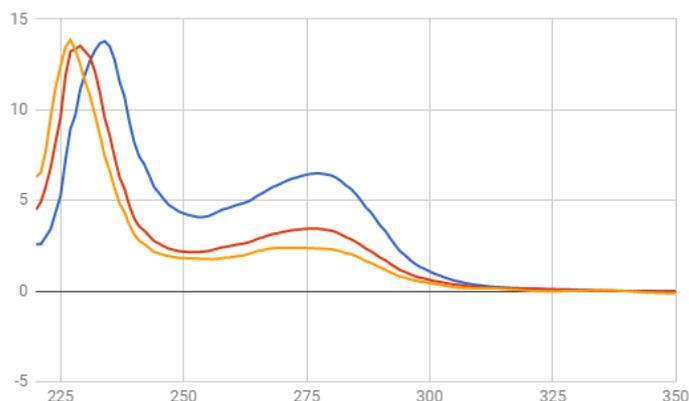


Figura 5. Curvas de absorbancia de secretomas. Amarillo 5 días de cultivo, Rojo 21 días y Azul, 47 días

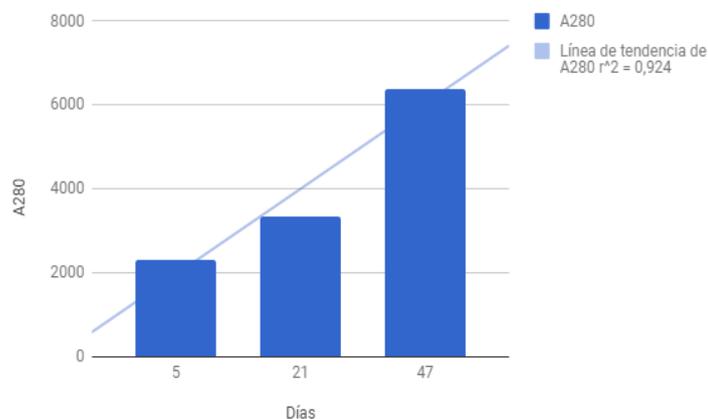
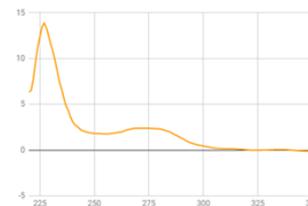
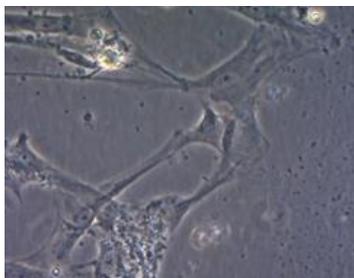


Figura 6. Relación entre número de días de cultivo y absorbancia A280

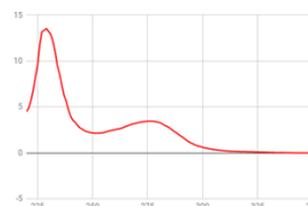
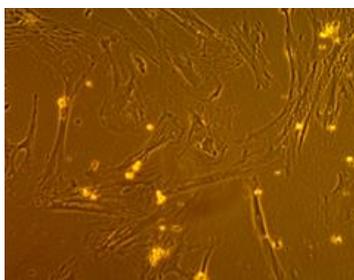
Tabla 4. Características de secretomas de CMMs evaluados

Origen	Días	A280	280/ 260	Imagen del cultivo	Gráfica de absorbancia
--------	------	------	-------------	--------------------	------------------------

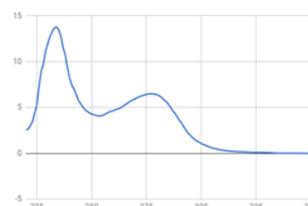
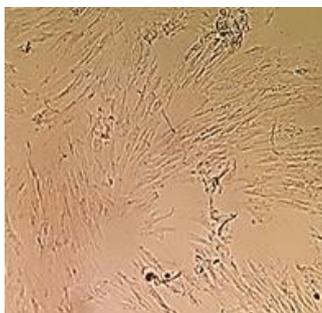
GW	5	2.302	0.82		
----	---	-------	------	--	--



GW	21	3.330	0.75		
----	----	-------	------	--	--



GW	47	6.377	0.73		
----	----	-------	------	--	--



Efecto de desnaturalización

Para determinar que la mayor concentración observada en la absorbancia de

proteínas no se debiera al efecto de la desnaturalización de estas, se midió la absorbancia de estos antes y después de sufrir desnaturalización por calor. Estos resultados se muestran en la Tabla 5. Se encontró un mayor valor de absorbancia tras la desnaturalización, lo que reafirma la necesidad de un análisis específico usando una prueba ELISA, dado que el tiempo entre la recolección del secretoma y su análisis podría haber causado la desnaturalización de las proteínas. Lo anterior contribuiría a sobrevalorar la concentración de moléculas de interés en el secretoma.

Tabla 5. Absorbancia de secretomas antes y tras desnaturalización por calor

#	Inicial		Tras desnaturalización	
	A280	280/260	A280	280/260
1	2.302	0.82	3.7	1.12
2	3.33	0.75	4.2	1
3	6.377	0.73	8	1.29

Evaluación de específica de moléculas de interés

Se evaluaron tres secretomas con evidencia de crecimiento celular y un blanco sin evidencia de crecimiento, para determinar la concentración de 4 moléculas de interés: IL-6, IL-8, IGF-1 y EGF. Se ensayaron dos replicas por cada medición. Las curvas de concentración para estandarizar cada prueba se pueden observar en la Fig. 7. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración en pg/ml de IL-6, IL-8, IGF-1, EGF según prueba ELISA

	IL-6		IL-8		IGF-1		EGF	
	Abs	Conc	Abs	Conc	Abs	Conc	Abs	Conc
Control	0,10 7	(-)	0,18 4	(-)	0,38 0	0,331	0,05 6	(-)

Muestra 01	2289	>3000	2,27 4	>1000	0,47 4	0,592	0,14 8	0,125
Muestra 02	1896	3400	2,32 0	>3000	0,33 4	0,128	0,12 0	0,082
Muestra 03	1124	746.68 5	2,22 9	>1000	0,35 4	0,235	0,13 2	0,100

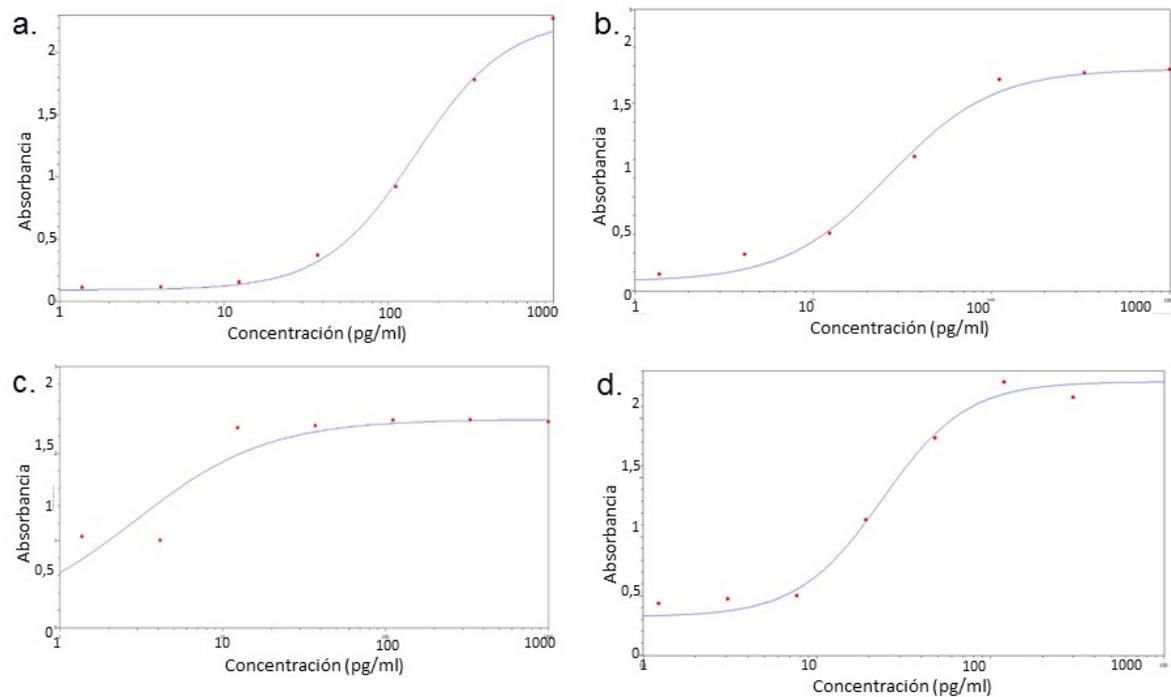


Figura 7. Curva de diluciones estándar para IL-6 (a), IL-8 (b), EGF (c), IGF-1 (d), representadas en base a la Absorbancia (OD=450) y la concentración (pg/ml)

La curva de estandarización fue adecuada para todas las muestras, excepto para EGF, en el que la pendiente no fue óptima. En tanto a las concentraciones halladas, la IL-6 e IL-8 se encuentran en cantidades superiores a los 3 ng/ml (3000 pg/ml) y 1 ng/ml (1000 pg/ml) respectivamente. Sin embargo, dado que el caso de IGF-1 el control negativo presentó un valor por encima de algunas muestras, los resultados no son concluyentes. Finalmente, no se encontró una concentración mayor a la del control de EGF en los secretomas de las CMMs evaluadas.

IV. DISCUSIÓN

De los 17 cultivos celulares realizados, en cinco no se obtuvo evidencia suficiente debido a que al cultivo se detuvo. En cuatro se obtuvo crecimiento celular, resultando en una tasa de éxito de crecimiento celular del 33% para cultivos con resultados concluyentes. Todos los cultivos celulares pertenecieron a CU de distintos individuos. Si dividimos estos resultados entre métodos usados, encontramos que la sangre umbilical tuvo una tasa de éxito del 0%, comparado con 40% para la gelatina de Wharton. Yang et al., y Secco y et al., también reportaron una tasa de éxito baja para sangre umbilical, de solo 23.1% (n=411) y 10% (n=100), respectivamente (59,60). Sin embargo, otros autores han reportado valores más altos tras modificar el protocolo estándar con la adición de suplementos u optimización de características de la recolección: 40% (n=30), 47.8% (n=345), 63% (n=59), y 90% (n=11) (61–64).

Por otro lado, usando el método estándar, la gelatina de Wharton suele tener una mayor tasa de éxito que la sangre umbilical (60). Los valores son del 70% (n=7), 100% (n=10) y 100% (n=13), comparado con un 20% para el método de explantes (n=4) y 0% para el método puramente enzimático (n=5) (60,65,66).

Es posible que la razón por la que nuestra tasa de éxito para la gelatina de Wharton difiere tanto en comparación con estos valores reportados sea el procedimiento de digestión enzimática utilizado. Los equipos anteriormente mencionados utilizaron al menos una enzima además de colagenasa, como hialuronidasa o dispasa (67,68). Lamentablemente, estas no estuvieron disponibles durante el desarrollo de los experimentos.

Un factor que disminuía la tasa de éxito (hasta 10%) fue el mayor tiempo hasta el inicio del procesamiento (mayor de dos horas). Aclarar si este tiempo se refiere del total del proceso, entre la toma de la muestra y el inicio del procesamiento, etc. Otros autores han notado esta asociación. Sin embargo, algunos autores definen la variable como el tiempo hasta el procesamiento, es decir, el tiempo entre el parto y el inicio de la extracción de CMMs del cordón umbilical, en cuyo caso el punto de corte es 2 horas (60,64). Mientras que otros como Bieback et

al., utilizan el tiempo desde el parto hasta la finalización del proceso de extracción de CMMs, en cuyo caso plantean un punto de corte de 15 horas (62).

Algunos otros factores que se han reportado en la literatura son el tamaño del cordón o el volumen de sangre, el uso de suplementos en el medio de cultivo, el uso de segmentos de cordón mayores a 10mm cada uno, el uso de disociación mecánica, entre otros (61,63,65).

Sin embargo, el principal causante de la disminución de la tasa de éxito de los cultivos fue la contaminación, que se presentó en un total de 53% de los cultivos. Encontramos que este porcentaje era mayor en partos naturales que en cesáreas, y en sangre umbilical que en gelatina de Wharton, aunque esta asociación no fue estadísticamente significativa. La relación entre el tipo de parto vaginal y la mayor contaminación en los cultivos ha sido descrita anteriormente por Gong y colaboradores, quienes encontraron una tasa de contaminación del 50% en cultivos derivados de cordones obtenidos de partos vaginales, comparado con 1% para cesáreas (69). Recientemente, se ha reportado el gran impacto del parto vaginal en la microbiota de los recién nacidos (70). Es posible que una colonización similar ocurra en el cordón umbilical, ocasionando la contaminación de los cultivos.

Los agentes contaminantes más frecuentes hallados fueron *Aspergillus* spp (44%) y *Candida* spp (22%). Mirjalili et al., también encontraron que *Aspergillus* es el contaminante fúngico más frecuente. Sin embargo, entre todos los contaminantes microbianos, *Mycoplasma* es el de mayor prevalencia (71). Por otro lado, es de interés notar que ambos cultivos contaminados con *Candida* spp provinieron de partos por vía vaginal.

Una limitación importante en el desarrollo del estudio fue la falta de caracterización completa de las CMMs aisladas del cordón umbilical, acorde a los criterios internacionales (57). Sin embargo, su morfología, comportamiento y

perfil secretorio fue similar al reportado por la literatura, así como el protocolo usado para su aislamiento.

En tanto a la producción del secretoma, durante su evaluación inespecífica usando la absorbancia proteica se observó que esta incrementaba proporcionalmente al número de días de cultivo de las células. Además, este incremento ocurría sin el detrimento de la relación A280/260, señalando que el aumento se debía a una mayor concentración de proteínas y no a un artefacto. Asimismo, debido a que el protocolo de recolección del secretoma implicaba utilizar un nuevo medio por tres días, no podía deberse al depósito acumulado de la secreción de proteínas. Una explicación es que el incremento de absorbancia se debió a una proliferación de CMMs, que a su vez secretaban mayor cantidad de proteínas al medio. El hecho de que esta relación tenga un comportamiento lineal ($r=0.92$) señala a la posibilidad de utilizar biorreactores de CMMs de forma estandarizada para la producción industrial de secretoma. Esta posibilidad también ha sido señalada por otros autores (72–75).

Sin embargo, existe la posibilidad de que el incremento de la absorbancia se deba a la desnaturalización proteica de la muestra, dado el prolongado periodo de almacenamiento. Aunque esto puede haber llevado a la sobreestimación de la absorbancia, es poco probable que por sí solo pueda explicar los hallazgos mencionados anteriormente.

Finalmente, durante el análisis específico de moléculas de interés, se encontró que las CMMs secretaron IL-6 e IL-8 en concentraciones superiores a los 3 ng/ml y 1 ng/ml respectivamente. No se encontró secreción de EGF mayor al control, y en el caso de IGF-1, los resultados no son concluyentes. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores para CMMs derivadas del cordón umbilical. Yoo y colaboradores encontraron concentraciones alrededor de 5 ng/ml para IL-6 e IL-8 con ausencia de EGF (39). Igualmente, Amable y colaboradores describen una concentración de 3 ng/ml para IL-6 y más de 10 ng/ml para IL-8, con ausencia de EGF e IGF-1 (76). Asimismo, Jenhani y

colaboradores refieren una concentración de menos de 20 ng por cada 10⁶ células para IL-6 y 8 ng por cada 10⁶ células para IL-8 (77). Por otro lado, Kim y colaboradores si encontraron expresión y secreción de EGF en el medio condicionado de CMMs derivadas del cordón umbilical (78). Estos autores explican este fenómeno afirmando que la secreción de EGF ocurre a través de exosomas, que pueden no ser analizados dependiendo del protocolo usado (79).

En el caso de IGF-1, aunque se ha reportado su secreción en concentraciones mayores a 0.3 ng/ml en CMMs derivadas de otros tejido, de acuerdo a nuestro conocimiento, no se ha encontrado evidencia concluyente de su secreción por CMMs cultivadas a partir del cordón umbilical (80).

La aplicación de estas moléculas de interés es múltiple. La IL-6 promueve la inmunomodulación a través del fomento de fenotipos tolerogénicos en células dendríticas y monocitos, inhibición de la inflamación local, apoptosis linfocitaria, entre otros (45,46,81–83). Sin embargo, algunos autores han reportado sus efectos en la promoción de metástasis, especialmente de carcinoma hepatocelular y osteosarcoma (84,85). Por otro lado, si bien es cierto que la IL-8 puede colaborar en la inmunomodulación, sus funciones, junto a EGF, parecen estar relacionadas a la regeneración de tejidos y angiogénesis (53,78,79,86).

CONCLUSIONES

El aislamiento de CMMs a partir del cordón umbilical tiene una baja tasa de éxito, la cual se incrementa en cultivos provenientes de la gelatina de Wharton, de cordones obtenidos de cesárea, y con un tiempo de recolección menor a 2 horas. Mejoras a este proceso podrían permitir una aplicación más amplia de la medicina regenerativa en el país.

En relación con los cultivos a partir de Gelatina De Wharton, aquellos provenientes de sangre umbilical tienen mayor posibilidad de contaminación. Asimismo, los cultivos provenientes de parto por cesárea, comparados con partos por vía vaginal, tienen menor tasa de contaminación. Estudiar la etiología de estos fenómenos podría mejorar las técnicas de cultivo.

Los CMMs aisladas de cordón umbilical secretan IL-6 e IL-8, pero no secretan EGF, lo que sugiere el valor potencial del secretoma y las sustancias que lo conforman para su uso en la medicina regenerativa.

RECOMENDACIONES

Para incrementar la tasa de éxito de los cultivos de CMMs, se debe reducir la ocurrencia de contaminación, al trabajar con protocolos de limpieza estrictos y de preferencia, con cordones umbilicales obtenidos por cesárea. Establecer una colaboración adecuada entre los equipos profesionales encargados de la manipulación inicial de la muestra también es de suma importancia.

La medición de proteínas usando una prueba ELISA se debe realizar en las concentraciones indicadas por el fabricante. De no ser esto posible debido a la concentración alta de las proteínas de interés, se recomienda realizar diluciones de la muestra.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Kode JA, Mukherjee S, Joglekar M V, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* [Internet]. 2009;11(4):377–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240903080367>
2. Liu S, Jiang L, Li H, Shi H, Luo H, Zhang Y, et al. Mesenchymal stem cells prevent hypertrophic scar formation via inflammatory regulation when undergoing apoptosis. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2014;134(10):2648–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2014.169>
3. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2012;10(3):244–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.005>
4. Hsieh J-Y, Wang H-W, Chang S-J, Liao K-H, Lee I-H, Lin W-S, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(8):e72604. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072604>
5. Teixeira FG, Carvalho MM, Sousa N, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells secretome: A new paradigm for central nervous system regeneration? Vol. 70, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013. p. 3871–82.
6. Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* [Internet]. 2007;2(9):e941. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000941>
7. Chen X, Wang C, Yin J, Xu J, Wei J, Zhang Y. Efficacy of Mesenchymal

- Stem Cell Therapy for Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One [Internet]. 2015;10(8):e0136991. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0136991> LB - OfKk
8. Watson L, Elliman SJ, Coleman CM. From isolation to implantation: a concise review of mesenchymal stem cell therapy in bone fracture repair. Stem Cell Res Ther [Internet]. 2014;5(2):51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/scrt439> LB - l1vS
 9. Gabr H, Zayed RA. Mesenchymal Stem Cell Infusion in Chronic Renal Failure Patients. J Med Bioeng [Internet]. 2015;4(4):329–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.12720/jomb.4.4.329-331> LB - OjPS
 10. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. Cell Stem Cell [Internet]. 2009;4(3):206–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001>
 11. Cabrera C, Carriquiry G, Pierinelli C, Reinoso N, Arias-Stella J, Paino J. The role of biologically active peptides in tissue repair using umbilical cord mesenchymal stem cells. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2012;1270:93–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06727.x>
 12. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. Mol Ther [Internet]. 2015;23(5):812–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.44>
 13. Vizoso F, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in

- Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017;18(9):1852. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18091852> LB - jDeW
14. Gallina C, Turinetto V, Giachino C. A New Paradigm in Cardiac Regeneration: The Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells Int* [Internet]. 2015;2015:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/765846> LB - X9yt
 15. Flower TR. A New Tool in Regenerative Medicine: Mesenchymal Stem Cell Secretome. *J Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015;1(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.15406/jsrt.2015.01.00005> LB - iBOj
 16. Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A, et al. The stem cell secretome and its role in brain repair. Vol. 95, *Biochimie*. 2013. p. 2271–85.
 17. Lee DK, Song SU. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cell Immunol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.08.009>
 18. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* [Internet]. 2008;3(4):e1886. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001886>
 19. Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2010;19(5):607–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2009.0345>
 20. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and

- differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* [Internet]. 2010;316(14):2213–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.009>
21. Teixeira FG, Panchalingam KM, Anjo SI, Manadas B, Pereira R, Sousa N, et al. Do hypoxia/normoxia culturing conditions change the neuroregulatory profile of Wharton Jelly mesenchymal stem cell secretome? *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0124-z> LB - PuBw
 22. Bartaula-Brevik S. Secretome of Mesenchymal Stem Cells Grown in Hypoxia Accelerates Wound Healing and Vessel Formation In Vitro. *Int J Stem cell Res Ther* [Internet]. 2017;4(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.23937/2469-570x/1410045> LB - G5yU
 23. Paquet J, Deschepper M, Moya A, Logeart-Avramoglou D, Boisson-Vidal C, Petite H. Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2015;4(7):809–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2014-0180> LB - IYVB
 24. Chierchia A, Chirico N, Boeri L, Raimondi I, Riva GA, Raimondi MT, et al. Secretome released from hydrogel-embedded adipose mesenchymal stem cells protects against the Parkinson's disease related toxin 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2017;121:113–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.09.014>
 25. Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* (80-) [Internet]. 1999;284(5411):143–7. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5411.143>
 26. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic

- differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* [Internet]. 1997;64(2):295–312. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027589> LB - u9Q1
27. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* [Internet]. 2007;46(1):219–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21704>
 28. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2006;341(4):1135–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.072>
 29. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang F-C, Byers MA, Chu T-MG, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2008;14(2):149–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0031>
 30. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* [Internet]. 2009;88(9):792–806. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0022034509340867>
 31. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2005;52(8):2521–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/art.21212>

32. Wang H-S, Hung S-C, Peng S-T, Huang C-C, Wei H-M, Guo Y-J, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* [Internet]. 2004;22(7):1330–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2004-0013>
33. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* [Internet]. 2000;109(1):235–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x>
34. Kamal MM, El-Mesallamy HO, Hammad LN, El-Demerdash RF. Comparing umbilical cord blood stem cells and wharton's jelly mesenchymal stem cells regarding their differentiation potential to insulin producing cells. *Cytotherapy* [Internet]. 2014;16(4):S66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.01.241> LB - dfZK
35. G. Jeschke M, Jeschke MG. Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: the Similarities and Differences. *Open Tissue Eng Regen Med J* [Internet]. 2011;4(1):21–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.2174/1875043501104010021> LB - Ybl4
36. Pires AO, Mendes-Pinheiro B, Teixeira FG, Anjo SI, Ribeiro-Samy S, Gomes ED, et al. Unveiling the Differences of Secretome of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Adipose Tissue-Derived Stem Cells, and Human Umbilical Cord Perivascular Cells: A Proteomic Analysis. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2016;25(14):1073–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2016.0048> LB - GNF2
37. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or

- Adipose Tissue. Stem Cells [Internet]. 2006;24(5):1294–301. Available from: <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342> LB - ibzG
38. Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. Biomed Res Int [Internet]. 2013;2013:916136. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/916136>
 39. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. Cell Immunol [Internet]. 2009;259(2):150–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.06.010>
 40. Lee MJ, Kim J, Kim MY, Bae Y-S, Ryu SH, Lee TG, et al. Proteomic Analysis of Tumor Necrosis Factor- α -Induced Secretome of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. J Proteome Res [Internet]. 2010;9(4):1754–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/pr900898n> LB - Knik
 41. Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol [Internet]. 2006;291(4):R880-4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00280.2006>
 42. Chacko SM, Ahmed S, Selvendiran K, Kuppusamy ML, Khan M, Kuppusamy P. Hypoxic preconditioning induces the expression of pro-survival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells. Am J Physiol Cell Physiol [Internet]. 2010;299(6):C1562-70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00221.2010>

43. Chang C-P, Chio C-C, Cheong C-U, Chao C-M, Cheng B-C, Lin M-T. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. *Clin Sci* [Internet]. 2013;124(3):165–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/CS20120226>
44. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2015;26(5):475–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.004>
45. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* [Internet]. 2010;5(12):e14247. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014247>
46. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* [Internet]. 2007;25(8):2025–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2006-0548>
47. King A, Balaji S, Le LD, Crombleholme TM, Keswani SG. Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Adv Wound Care* [Internet]. 2014;3(4):315–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/wound.2013.0461>
48. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* (80-) [Internet]. 1992;258(5089):1798–801. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281554>

49. Michel G, Kemény L, Peter RU, Beetz A, Ried C, Arenberger P, et al. Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells. *FEBS Lett* [Internet]. 1992;305(3):241–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2892%2980677-9>
50. Tonkin J, Temmerman L, Sampson RD, Gallego-Colon E, Barberi L, Bilbao D, et al. Monocyte/macrophage-derived IGF-1 orchestrates murine skeletal muscle regeneration and modulates autocrine polarization. *Mol Ther*. 2015;
51. Gómez-Mauricio G, Moscoso I, Martín-Cancho MF, Crisóstomo V, Prat-Vidal C, Báez-Díaz C, et al. Combined administration of mesenchymal stem cells overexpressing IGF-1 and HGF enhances neovascularization but moderately improves cardiac regeneration in a porcine model. *Stem Cell Res Ther*. 2016;
52. Bodnar RJ. Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. *Adv Wound Care*. 2013;
53. Wenczak BA, Lynch JB, Nanney LB. Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. *J Clin Invest*. 1992;
54. Grotendorst GR, Soma Y, Takehara K, Charette M. EGF and TGF- α are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol*. 1989;
55. Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to Isolate Mesenchymal-Like Cells from Wharton's Jelly of Umbilical Cord. In: *Methods in Cell Biology* [Internet]. 2008. p. 101–19. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)00006-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x(08)00006-x) LB - u5GF

56. Gneccchi M. Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols [Internet]. 570 p. Available from: https://books.google.com/books/about/Mesenchymal_Stem_Cells.html?hl=&id=PaFeAQAACAAJ_LB_-xclm
57. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>
58. Fogh J. Contamination in tissue culture. *Acta Virol.* 1974;
59. Yang SE, Ha CW, Jung MH, Jin HJ, Lee MK, Song HS, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy.* 2004;
60. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LLQ, Cerqueira A, Carvalho MDF, et al. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem Cells.* 2008;
61. Vasaghi A, Dehghani A, Khademalhosseini Z, Maharlooei MK, Monabati A, Attar A. Parameters that influence the isolation of multipotent mesenchymal stromal cells from human umbilical cord blood. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2013;
62. Bieback K. Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells.* 2004;
63. Fan X, Liu T, Liu Y, Ma X, Cui Z. Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. *Biotechnol Prog.* 2009;

64. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: Reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells fro. *J Cell Biochem.* 2011;
65. Tong CK, Vellasamy S, Chong Tan B, Abdullah M, Vidyadaran S, Fong Seow H, et al. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method. *Cell Biol Int.* 2011;
66. Fong CY, Subramanian A, Biswas A, Gauthaman K, Srikanth P, Hande MP, et al. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. *Reprod Biomed Online.* 2010;
67. Can A, Balci D. Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011;
68. Salehinejad P, Banu Alitheen N, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2012;
69. Gong W, Han Z, Zhao H, Wang Y, Wang J, Zhong J, et al. Banking human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical use. *Cell Transplant.* 2012;
70. Neu J, Rushing J. Cesarean Versus Vaginal Delivery: Long-term Infant Outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clinics in Perinatology.* 2011.
71. Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial

- contamination of cell cultures: A 2 years study. *Biologicals*. 2005;
72. Vizoso F, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017;18(9):1852. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18091852> LB - pz9j
 73. Godara P, McFarland CD, Nordon RE. Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2008.
 74. Panchalingam KM, Jung S, Rosenberg L, Behie LA. Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: A review Mesenchymal Stem/Stromal Cells - An update. *Stem Cell Research and Therapy*. 2015.
 75. Phelps J, Sanati-Nezhad A, Ungrin M, Duncan NA, Sen A. Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives: Toward Cell-Free Therapeutics. *Stem Cells Int*. 2018;
 76. Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2014;5(2):53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/scrt442>
 77. Jenhani F, Durand V, Ben Azouna N, Thallet S, Ben Othmen T, Bejaoui M, et al. Human cytokine expression profile in various conditioned media for in vitro expansion bone marrow and umbilical cord blood immunophenotyped mesenchymal stem cells. In: *Transplantation Proceedings*. 2011.
 78. Kim YJ, Seo DH, Lee SH, Lee SH, An GH, Ahn HJ, et al. Conditioned media

- from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. 2018;16(October):96–102. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.10.007>
79. Kim YJ, Yoo S mi, Park HH, Lim HJ, Kim YL, Lee S, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;
 80. Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;
 81. Deng Y, Yi S, Wang G, Cheng J, Zhang Y, Chen W, et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Dendritic Cells to Acquire Tolerogenic Phenotypes Through the IL-6-Mediated Upregulation of SOCS1. *Stem Cells Dev.* 2014;
 82. Deng Y, Zhang Y, Ye L, Zhang T, Cheng J, Chen G, et al. Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF. *Sci Rep.* 2016;
 83. Xu G, Zhang Y, Zhang L, Ren G, Shi Y. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;
 84. Mi F, Gong L. Secretion of interleukin-6 by bone marrow mesenchymal stem cells promotes metastasis in hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep.* 2017;
 85. Tu B, Du L, Fan QM, Tang Z, Tang TT. STAT3 activation by IL-6 from

mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma. *Cancer Lett.* 2012;

86. Hou Y, Ryu CH, Jun JA, Kim SM, Jeong CH, Jeun SS. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor. *Cell Biol Int.* 2014;

ANEXOS

1. Consentimiento informado

Estimada Sra.: _____

Se la invita a participar del proyecto de investigación titulado: **“DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS SECRETADAS POR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE CORDÓN UMBILICAL.”**. Este estudio puede proporcionar información valiosa para estandarizar el proceso de aislamiento de células madre para sus múltiples aplicaciones en biotecnología como la regeneración de tejidos en pacientes quemados. Para estos ensayos se solicitará a su médico el cordón umbilical tras el parto por cesárea.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Encontrar información sobre diferencias en el cultivo de Células Madre del cordón umbilical. Estas son células del cordón que pueden convertirse en otras partes del cuerpo, como piel u órganos, pero aún no se sabe bien cuál es la mejor forma de obtenerlas. Este estudio busca encontrar eso.

¿Qué sucede si participo en el estudio? ¿Cuánto tiempo estaré en el estudio?

Se le pide que nos autorice a utilizar el cordón umbilical tras su corte después del parto por cesárea y permitirnos aislar células de este. El procesamiento se realizará en los laboratorios de la Universidad San Martín de Porres íntegramente. Su tiempo de participación será menos de un día.

¿Qué beneficio puedo esperar por proporcionar estas muestras?

En un futuro, con su ayuda, podría tenerse tratamientos regenerativos para niños quemados o pacientes con otras enfermedades.

¿Cuáles son las posibles molestias o riesgos por participar?

Ninguna. El cordón umbilical usualmente se descarta.

¿Habrá algún costo por participar en el estudio? ¿Recibiré algo por estar en este estudio?

No tiene ningún costo participar en el estudio. No recibirá nada material.

¿Cómo se protegerá la información que me identifica?

Con el fin de proteger su privacidad, en su muestra solamente utilizaremos un número de participante en lugar de su nombre u otra información que lo identifique. No se divulgará ni su nombre ni ninguna otra información que lo identifique directamente fuera de la clínica de investigación y tampoco serán de conocimiento de otras personas ajenas. Se asignará un código único a sus

muestras en el sitio. El investigador del estudio conservará la clave que relaciona su información personal con este código en el sitio del estudio. Hemos establecido registros del estudio para mantener tanto su participación como todos los resultados de sus pruebas por separado y en forma confidencial.

Toda información que lo identifique obtenida en este estudio se mantendrá estrictamente confidencial, a menos que sea requerida por ley o a solicitud de una autoridad reguladora. Si se realiza alguna publicación como resultado de esta investigación, usted no será identificada por su nombre.

¿Se me proporcionarán los resultados de estos análisis?

Los resultados productos de la investigación son completamente confidenciales y usted tiene derecho a conocerlos cuando lo desee, así como solicitar que los resultados no sean incluidos en la discusión y conclusiones del presente trabajo.

¿Qué pasa si usted quiere terminar su participación antes que el estudio haya terminado?

Usted puede solicitar, en cualquier momento retirarse del estudio comunicándose con el investigador. Si retirarse del estudio, usted no perderá ningún beneficio, tratamiento médico o derecho legal que, de otro modo, le corresponda.

¿Qué hacer si tengo preguntas sobre el estudio?

Llamar a Marco Moisés Málaga Julca, al **Teléfono:** 993707710 o al correo marco_malaga@usmp.pe.

Datos del comité de ética:

Comité de Ética del Hospital Nacional Dos de Mayo:

Presidente del Comité de Ética del HNDM: Dr. Jorge Alejandro Yarinsueca Gutierrez

Dirección: Parque Historia de la Medicina Peruana S/N, altura de la cuadra 13 de Av. Grau, Cercado – Lima. Teléfono: 3280028 anexo 8234. Correo electrónico: comite.etica.hndm@gmail.com

Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad San Martín de Porres:

Presidente: Dr. Armando Vargas Guerra

Universidad San Martín de Porres – Facultad de Medicina. Alameda del Corregidor 1531. Teléfonos: 3(511) 365-2300 / (511) 365-3640 Anexo 160. Correo electrónico: etica_fmh@usmp.pe

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACION:

“DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS SECRETADAS POR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE CORDÓN UMBILICAL”

NOMBRE: _____ FECHA: _____

Por medio del presente documento consiento voluntariamente participar en la investigación “DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS SECRETADAS POR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE CORDÓN UMBILICAL”, y hago constar que se me ha informado claramente en qué consiste el proyecto.

Me queda claro que para mi participación, en la investigación se utilizará el cordón umbilical que se tomará después del parto por cesárea. Soy consciente de las condiciones en que se me toma la muestra y de los riesgos mínimos que implica, así como, que no interfiere con ningún tratamiento que esté recibiendo en este momento.

Finalmente, si al término de la investigación hubieran muestras restantes [] AUTORIZO/ [] NO AUTORIZO que sea almacenada indefinidamente para ser empleadas en proyectos de investigación futuros.

.....
Nombre del participante FIRMA Lugar y Fecha
(en letras imprenta)

.....
Nombre de la persona FIRMA Lugar y Fecha
A cargo del consentimiento
(en letras imprenta)

.....
Nombre del testigo FIRMA Lugar y Fecha
(si participante iletrado)

*Certifico que he recibido una copia

.....
FIRMA DEL PARTICIPANTE

2. Protocolos Estandarizados de Procedimientos

a. Obtención de cordones umbilicales y transporte de muestras

Equipos e instrumentos

Equipo de disección estéril

Cooler con paquetes de gel congelante

Bolsa de recolección de sangre

Materiales

Gaza y desinfectante

50ml de suero fisiológico (0.9% NaCl)

Frasco estéril de 100ml

Procedimiento

1. Obtener el consentimiento informado firmado por la parturienta
2. Tras el corte del cordón umbilical, sujetar extremo recién cortado.
3. Limpiar el área deseada con una gaza y evitar posterior contaminación con elementos no estériles.
4. De forma estéril, remover la tapa de la aguja de la bolsa de colección de sangre.
5. Insertar la aguja en el área limpiada
6. Extraer la sangre del cordón umbilical hacia la bolsa de colección de sangre.
7. Una vez culminado con este procedimiento, colocar el cordón umbilical en un frasco estéril con suero fisiológico (0.9% NaCl) a 4°C hasta su procesamiento.
8. Transportar los materiales hasta su lugar de procesamiento, donde el procedimiento se debe realizar de forma aséptica en una cabina de seguridad

b. Aislamiento y cultivo de CMMs provenientes de la gelatina de Wharton

Equipos e instrumentos

Materiales

Equipo de disección estéril

Pipeta de 1000 μ L

Hemocitómetro

PBS

Colagenasa 300 μ /ml

Medio de cultivo DMEM

Tripsina-EDTA (0.1%)

Tampón de lisis NH_4Cl

Placa Petri estéril de 10 cm

Frasco T-75

Tubo Falcon 15ml

Procedimiento

1. Enjuagar la superficie del cordón umbilical con PBS para remover la sangre restante
2. Manipular el cordón umbilical en una placa Petri estéril de 10 cm
3. Cortar el cordón umbilical en fragmentos de 3 a 5cm usando un bisturí estéril (Fig 1)
4. Remover los vasos sanguíneos y enjuagar el remanente con PBS
5. En un tubo estéril de 15ml, agregar 1 ml de solución de Colagenasa tipo A de stock (2800 μ /ml) y agregar 9 ml de DMEM (concentración final de 280 μ /ml).
6. Colocar el tejido en el tubo e incubarlo por 1-3 horas a 37°C.
7. Luego, retirar las piezas y triturarlas con un fórceps. No descartar el tubo.
8. Mover el tejido a una nueva placa Petri de 10cm con PBS, mover por 5 minutos, y transferir a un nuevo tubo conteniendo Tripsina-EDTA (0.1%). Incubar por 8 minutos a 37°C.
9. Durante esta incubación, centrifugar el tubo con la solución de colagenasa a 1000 rpm por 5 min. El sobrenadante es descartado y 3ml de DMEM son añadidos al *pellet*.
10. Resuspender las células usando una pipeta e incubar el tubo mientras transcurre la digestión enzimática de Tripsina-EDTA del paso 8.
11. Al finalizar, apretar las piezas del cordón en la segunda solución para remover la mayor cantidad de células posible (Fig 2).
12. Centrifugar el tubo a 1000 rpm por 5 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 3ml de medio DMEM.
13. Combinar las células de ambos pasos. Opcionalmente, lisar las células rojas con buffer de lisis de cloruro de amonio.
14. Contar las células vivas en un hemocitometro usando azul de tripán
15. Precubrir frascos T-75 con Suero Fetal Bovino (SFB). Agregar

suficiente volumen para cubrir enteramente el área de cultivo del frasco.

16. Incubar a temperatura ambiente por 30min
17. Remover todo el FBS y usar el plato directamente
18. Sembrar en una concentración de 3×10^4 células por cm^2 , en medio DMEM con 10% de SFB
19. Incubar a 37°C , atmosfera de CO_2 al 5%, por 24-72h
20. Pasado el tiempo de incubación, transferir las células a un nuevo frasco para favorecer la adherencia de la mayor cantidad posible de CMMs.
21. Alimentar las células por la remoción/reemplazo de la mitad del medio cada 2 a 3 días hasta que las células lleguen a aproximadamente 80% de confluencia.

c. Aislamiento y cultivo de CMMs provenientes de sangre umbilical

Equipos e instrumentos

Centrifuga

Hemocitómetro

Materiales

PBS/EDTA

Tubos Falcon 50ml

Tubos Falcon 15ml

Ficoll-Paque Plus

Tampón de lisis NH_4Cl

Frasco T-25

Procedimiento

22. Transferir 25 ml de sangre umbilical obtenida en las bolsas de recolección a un tubo de 50ml.
23. Añadir 25ml de PBS/EDTA.
24. Remover una pequeña alícuota para realizar un conteo en el hemocitómetro.
25. Añadir 4 ml de Ficoll-Paque Plus a un tubo de 15ml y cuidadosamente colocar sobre este 9.5 ml de sangre diluida.
26. Centrifugar por 30min a 1800 rpm (Fig 3)
27. Remover la fase plasmática
28. Usando una pipeta Pasteur, cuidadosamente transferir la capa leucocitaria a un nuevo tubo de 50ml y llenar el tubo con PBS/EDTA
29. Centrifugar por 10 minutos a 1800 rpm
30. Lavar con PBS/EDTA dos a tres veces y centrifugar hasta que el sobrenadante este limpio.
31. Lisar eritrocitos con buffer de lisis cloruro de amonio
32. Suspender el *pellet* en 10 ml de medio DMEM, suplementado con 10% de FBS
33. Sembrar las células en una densidad de 10^6 células por cm^2 en un frasco precubierto con FBS como se indicó en el protocolo anterior.
34. Descartar las células no adherentes después de 1-3 días de incubación
35. Alimentar las células por la remoción/remplazo de la mitad del medio cada dos o tres días, hasta que las células lleguen a aproximadamente 80% de confluencia.

d. Ensayo Inmunoenzimático ligado a Enzima (ELISA) para determinación de la concentración de moléculas de interés en Secretoma

Componentes:

- 12 tiritas de 8 pozos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-IL-6, IL-8, IGF-1 o EGF humana
- Tampón de lavado 20X (componente B)
- Estándar de proteína humana IL-6 liofilizada (componente C)
- Anticuerpo biotinado para detección de IL-6 humana (componente

F)

- Estreptavidina conjugada a la enzima HRP (componente G)
- Agente TMB ELISA colorimétrico (componente H)
- Solución para detener el ELISA (componente I)
- Buffer de dilución 1x Ensayo/Muestra Buffer A (componente D1)
- Buffer de dilución 5x Ensayo/Muestra Buffer B (componente E1)

Materiales:

- Frasco de vidrio de 100ml (1)
- Tubos Falcon 50ml (2) y tubo 1.5ml (1)

Pasos:

1. Diluir Tampón de lavado 20X B (Componente E1)
 - a. Añadir a un frasco tapa azul de 100ml autoclavado esteril, 60ml de agua deionizada o destilada
 - b. Añadir 15 ml de Tampón B (E1)
 - c. En 2 tubos de 50ml, añadir 35ml de buffer diluido a un tubo, y 40ml al otro.
 - d. Rotular como 'Tampón B 1x'
2. Reconstitución de Proteína IL-6, IL-8, IGF-1 o EGF liofilizada: Componente C
 - a. Centrifugar brevemente un vial de C.
 - b. Añadir 500ul de Tampón B 1x (Item E1-1x), disolver el polvo mezclando suavemente
 - c. Rotular como 'Standard 12K' (12000 pg/ml).
 - d. Alicuotar en un tubo de 1.5ml 100ul. Rotular como 'S0'
3. Reconstitución de Anticuerpo Biotinado (Componente F)
 - a. Centrifugar brevemente vial de F
 - b. Añadir 100ul de Tampón B 1x (Componente E1-1x)
 - c. Pipetear para mezclar
 - d. Rotular como 'Anticuerpo Biotinado 80x'
4. Almacenar todo a -20°C

-Preparación de curva estándar

Materiales

Reactivos

Tubos de 1.5ml (8)	Tubo 'S0'
Tubo de 15ml (1)	Tampón B 1x
Tubo de 0.6ml (2)	Anticuerpo Biotinado 80x
	HRP

Pasos:

1. Diluciones seriadas (máximo 12)

- a. Descongelar 'S0'
- b. Colocar 7 tubos de 1.5ml y rotularlos como D1-D7
- c. En el tubo 'D1', añadir 440ul de Tampón B 1x y añadir 40ml del 'S0' y mezclar
- d. Almacenar 'S0' a -30° nuevamente
- e. Añadir 400 ul de Tampón B 1x al tubo D2-D7
- f. Del tubo D1, retirar 200ul y añadirlos al tubo D2. Mezclar
- g. Del tubo D2, retirar 200 ul y añadirlos al tubo D3. Mezclar
- h. Repetir sucesivamente hasta el tubo D7. Este tendrá al finalizar 600ul.
- i. Separar otro tubo de 1.5ml, añadir 400 ul de Tampón B1x y rotularlo como 'D0'
- j. Las concentraciones finales de cada tubo son las siguientes:

Tubo	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D0
[]	1000	333.3	111.1	37.04	12.35	4.12	1.37	0

2. Alicuotar Tampón B 1x, Ac. Biotinilado, HRP estreptadivina

- a. En un tubo de 15ml, alicuotar 10ml de Tampón B 1x. Rotular como 'Tampón B 1x'
- b. En un tubo de 0.6ml, alicuotar 30ul de Ac. Biotinilado 80x. Rotular como

'Ac. Biotinilado 80x'

c. En un tubo de 0.6ml, alicuotar 10ul de HRP. Rotular como 'HRP 600x'

3. Alicuotar solución de lavado 20x, Agente Colorimetrico TMB para ELISA, y solución STOP

a. En un tubo de 50ml, alicuotar 2.5 ml de solución de lavado 20x, añadir 47.5ml y rotular como solución de lavado 1x

b. En un tubo de 15ml, alicuotar 3ml de Agente colorimétrico TMB para Elisa

c. En un tubo de 1.5ml, alicuotar 1.4ml de Stop solution

4. Almacenar todo a -20°C

-Medición de moléculas de interés en sobrenadante de cultivo (secretoma)

1. Descongelar todas las muestras y las alícuotas de reactivos

2. Diluir Ac. Biotinado 80x a 1x (Preparado para 24 pocillos)

a. Añadir 30ul de Ac. Biotinado a un tubo Falcon de 15ml

b. Añadir 2370ul de Buffer B 1x y mezclar

c. Rotular como 'Ac. Biotinado 1x'

3. Diluir HRP-streptadivina 600x a 1x (Preparado para 24 pocillos)

a. Añadir 4ul de HRP-streptadivina a un tubo Falcon de 15ml

b. Añadir 2400 ul de Buffer B 1x y mezclar

c. Rotular como 'HRP 1x'

4. Añadir 100ul de cada standard (D0-D7) a cada pocillo de la primera fila, y 100ul de muestra a la primera/segunda fila, cubrir los pocillos, e incubar por 2.5h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° con agitación gentil

5. Descartar la solución y lavar 4 veces con Solución de lavado 1x. Lavar llenando cada pocillo con 300ul de solución, usando una pipeta multicanal o auto-lavador. Completar remoción del líquido entre cada paso, por aspiración o decantado. Invertir la placa y colocarla sobre papeles toalla limpios.

6. Añadir 100ul de Anticuerpo Biotinado 1x a cada pocillo. Incubar 1h a temperatura ambiente con agitación gentil

7. Descartar solución. Repetir el lavado en el paso 3.

8. Añadir 100 ul de HRP-streptadivina 1x a cada pocillo. Incubar 45 minutos a temperatura ambiente con agitación gentil

9. Descartar solución. Repetir el lavado del paso 3

10. Añadir 100 ul de Agente TMB colorimétrico para ELISA (Componente H) a cada pocillo. Incubar por 30 minutos en un cuarto oscuro con agitación gentil.
11. Añadir 50 ul de solución STOP a cada pocillo.
12. Leer a 450 nm inmediatamente