Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
Unidad de Posgrado

Evaluación de dos métodos enzimáticos para aislamiento de células primarias de placenta de alpaca (*Vicugna pacos*)

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

Carlos Enrique CISNEROS HUAMANÍ

ASESOR

Dr. Alexei Vicent SANTIANI ACOSTA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cisneros C. Evaluación de dos métodos enzimáticos para aislamiento de células primarias de placenta de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2019

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0003-2081-6149
DNI o pasaporte del autor	70441791
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0001-9740-5490
DNI o pasaporte del asesor	10650758
Grupo de investigación	-
Agencia financiadora	**PAIS**
	Perú
	NOMBRE Y SIGLAS DE LA AGENCIAFINANCIADORA
	Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA)
	NOMBRE DEL PROGRAMA FINANCIERO:
	Beca de Postgrado – Maestrías 2017
	N° DE CONTRATO
	Nº 006-2017-INIA-PNIA-MAESTRÍA
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	**LUGAR**
	Perú, Lima, Lima, Distrito de Villa el Salvador, Carretera Panamericana Sur Km. 19.
	COORDENADAS GEOGRAFICAS
	Latitud: -12.219751 | Longitud: -76.978449
Año o rangos de años en que se realizó la investigación	2018 - 2019
Disciplinas OCDE	Ciencias médicas, Ciencias de la Salud https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.02

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día jueves 24 de octubre del 2019, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por la Mg. Mercy Ramírez Velásquez y conformado por los siguientes miembros docentes: Dr. Alexei Santiani Acosta (Asesora), Mg. Hugo Mauricio González Molfino, Dr. Luis Ramiro Luna Espinoza**,** se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"Evaluación de dos métodos enzimáticos para aislamiento de células primarias de placenta de alpaca (*Vicugna pacos*)", presentado por el Bachiller:

CARLOS ENRIQUE CISNEROS HUAMANÍ

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **APROBADO, (14) CATORCE.**

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal, al Bachiller Carlos Enrique Cisneros Huamaní.

Siendo las 11:30 horas del día jueves 24 de octubre de 2019, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

Mg. Mercy Ramírez Velásquez (P.A.D.E)
Presidenta

Dr. Alexei Santiani Acosta (P.P.T.C)
Miembro (Asesor)

Mg. Hugo Mauricio González Molfino
Miembro Externo

Mg. Luis Ramiro Luna Espinoza (P.Ax.D.E)
Miembro

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado UNMSM

DEDICATORIA

A mis amados padres Nelly y Florencio, grandes médicos veterinarios a quienes admiro y respeto por todo su esfuerzo para llevarme a este punto de mi vida.

A mi tía abuela Carmen, como una segunda madre, por brindarme el amor, apoyo incondicional, enseñanzas y consejos que me formaron como persona y profesional.

A mis hermanos Litzia y Luis, ingenieros de profesión y pasión, a quienes tengo mucha admiración y respeto, me enseñaron a siempre dar lo mejor de mí mismo y que la familia es muy importante.

Al Dr. Javier Enciso, médico veterinario investigador de gran trayectoria, quien, con su sabiduría y experiencia, me ha conducido en la formación como investigador en Medicina Regenerativa Veterinaria.

A la Dra. Ana Lucía Mayanga, por la asesoría, el ánimo y apoyo incondicional, que me ha brindado desde que gané el proyecto de investigación por el PNIA.

A mi Alma Máter y a las personas que la conforman, por ser parte de mi formación profesional y estar muy orgulloso de pertenecer a esta gran institución.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por darme un día más de vida y brindarme buena salud y una familia amorosa.

Al Dr. José Amiel, por sus sabios consejos y motivaciones que han conducido en mi formación profesional.

Al equipo administrativo del Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA), por haberme dado la beca de maestría para culminar mis estudios posgrados y permitir desarrollar el trabajo de investigación para la innovación.

Al Dr. Percy Mayta, por permitirme hacer uso de los laboratorios de investigación de la Universidad Científica del Sur para el desarrollo de la investigación.

A los gestores de la Municipalidad Provincial de Huancavelica y encargados del Camal Municipal, por haberme apoyado en la obtención de placentas de alpaca.

Al Dr. Alexei Santiani, por la asesoría, apoyo y buenos consejos que ha conducido en el desarrollo del estudio.

A los miembros del Jurado de Tesis, por sus sugerencias, comentarios y revisiones para la mejora del manuscrito.

Gracias a todos, considero que es un paso importante en una carrera que espero hacerla brillar y continuar investigando aún más.

INDICE DEL CONTENIDO

Pág.

DEDICATORIA ii
AGRADECIMIENTOS iii
RESUMEN vi
ABSTRACT vii
INDICE DE CUADROS viii
INDICE DE FIGURAS ix
APÉNDICE x
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3
2.1. Placentación en Camélidos 3
2.1.1. Histología de Placenta de Alpaca 4
2.2. Potencialidades de la Placenta 6
2.3. Cultivos Celulares de Tejidos Mamíferos 7
2.3.1. Transporte de Tejidos 7
2.3.2. Medios de Cultivo Empleados 9
2.3.3. Cultivos primarios 10
2.3.4. Técnicas de obtención de células primarias 10
2.3.5. Enzima Colagenasa 11
2.3.6. Enzima Tripsina 12
2.3.7. Aislamiento primario con Colagenasa y Tripsina 12
2.4. Cinética de Crecimiento Celular 13
2.5. Factores de Transcripción de Pluripotencia en Tejidos Extrafetales 16
2.6. Células Primarias de Tejidos Extrafetales 17
2.7. Aislamiento de Células Madre en Camélidos 20
III. MATERIALES Y MÉTODOS 22
3.1. Lugar de Ejecución 22
3.2. Colección de muestras 22
3.3. Tamaño Muestral 23
3.4. Aislamiento y Cultivo de Células Primarias de Placenta 23
3.4.1. Análisis Estadístico 24
3.5. Morfometría de células primarias de placenta 24

3.5.1. Análisis Estadístico 25
3.6. Evaluación de la Cinética de Crecimiento 25
3.6.1. Análisis Estadístico 25
3.7. Expresión relativa de transcriptos de pluripotencia 26
3.7.1. Diseño de oligonucleótidos 26
3.7.2. Extracción de ARN de Células Primarias de Placenta 27
3.7.3. Síntesis de ADN Complementario (ADNc) 28
3.7.4. Expresión Génica por PCR en Tiempo Real (qPCR) 28
3.7.5. Cuantificación Relativa 29
3.7.6. Análisis Estadístico 29
IV. RESULTADOS 30
4.1. Rendimiento de Aislamiento Celular 30
4.2. Evaluación Morfométrica 31
4.3. Cinética de Crecimiento 33
4.4. Expresión Génica de Oct4, Sox-2, c-Myc y Nanog: 35
V. DISCUSIÓN 36
VI. CONCLUSIONES 40
VII. SUGERENCIAS 41
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA 42
IX. APÉNDICE 53

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar dos métodos enzimáticos para el aislamiento de células primarias de placenta de alpaca (*Vicugna pacos*) utilizando colagenasa y tripsina como agentes disgregantes. Para este fin, se utilizó como control negativo el aislamiento de las células de alpaca por el método de explante. En los dos grupos de experimentación y en el grupo control se evaluó el número de células vivas post disgregación, observación morfológica de las células, cinética de crecimiento y expresión de cuatro genes de pluripotencia: Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog. Se colectaron 25 placentas de alpaca obtenidas en el camal municipal de la ciudad de Huancavelica, departamento de Huancavelica, en los meses de agosto del 2018 hasta Junio del 2019. Para ambos grupos se obtuvo 10g de tejido de las 25 placentas de alpaca obtenidas del corion fetal. Para el control negativo se obtuvo los 10g de 5 placentas de alpacas tornadas al azar. Los resultados muestran que el número de células vivas obtenidas con la enzima colagenasa y tripsina fue de $6.37x10^5$ y $5.12x10^4$células/g de tejido, respectivamente. La morfometría de las células mediante el empleo de colagenasa y en el método explante, mostraron incremento de longitud y ancho mayores a 82% y 25%, respectivamente con respecto a sus cultivos iniciales. En cuanto a la cinética de crecimiento evidenciaron un nivel de doblaje poblacional de 60.26 ± 4.9 y 66.75 ± 0.08 hrs, respectivamente. La expresión de los factores de transcripción de Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog por el método colagenasa mostraron niveles de expresión relativa de 5.97, 1.76, 0.71 y 81.68 respectivamente. En conclusión, se obtuvo mayor rendimiento de células primarias de placenta de alpaca con el método colagenasa, y los parámetros de morfometría, cinética de crecimiento y expresión de genes de pluripotencia evaluados, denotan signos de envejecimiento celular de acuerdo a las condiciones de cultivo realizados, denotando sólo así al gen Nanog, el gen que muestra mayor expresión relativa a diferencia de los demás genes evaluados.

Palabras Clave: alpaca, placenta, células, método de aislamiento, morfometría, pluripotencia.

ABSTRACT

The objective of study was to evaluate two enzymatic methods for the isolation of primary cells from alpaca's placenta (*Vicugna pacos*) using collagenase and trypsin as disintegrating agents. For this purpose, it was isolated alpaca's cells by explant method as negative control. In the two experimental groups and in the control group, it was evaluated the number of live cells after of disintegration, morphology cellular, growth kinetics and expression of four pluripotency genes: Oct4, Sox2, c-Myc and Nanog. It was collected 25 alpaca's placentas in the municipal slaughterhouse of the city of Huancavelica, department of Huancavelica, during the months of August 2018 to June 2019. For both groups, 10g of tissue were obtained from the 25 alpaca's placentas obtained from the fetal chorion. For the negative control, 10g of 5 alpaca's placentas were obtained by randomly selection. The results show that the number of live cells obtained with the enzyme collagenase and trypsin was $6.37x10^5$ and $5.12x10^4$ cells/g of tissue, respectively. The morphometry of the cells obtained from collagenase method and explant method, were increased in length and width in 82% and 25% respectively, greater than respect initial cultures. Regarding growth kinetics, they showed a population doubling level of 60.26 ± 4.9 and 66.75 ± 0.08 hrs, respectively. The expression of factors transcription Oct4, Sox2, c-Myc and Nanog by the collagenase method, were showed relative expression levels of 5.97, 1.76, 0.71 and 81.68 respectively, being the Nanog gene of the highest expression. In conclusion, it was obtained a higher yield of primary cells from alpaca's placenta with the collagenase method, and the parameters of morphometry, growth kinetics and expression of pluripotency genes evaluated, denote signs of cellular aging according to the culture conditions carried out, thus denoting only the Nanog gene, the gene that shows the highest relative expression unlike the others genes evaluated.

Keywords: alpaca, placenta, cells, isolation method, morphometry, pluripotency.

INDICE DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Comparación de la cinética de proliferación celular 15
Cuadro 2. Referencias de aislamiento de células primarias de tejidos extrafetales. 18
Cuadro 3. Mediciones teóricas del diámetro biparietal fetal 22
Cuadro 4. Oligonucléotidos de cada par de gen diana para ajuste de temperatura de anillamiento..... 26
Cuadro 5. Oligonucleótidos empleados para la PCR en tiempo real cuantitativa de los genes diana..... 27
Cuadro 6. Componentes del Kit BrightGreen 2X qPCR MasterMix-Low ROX..... 29

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Placenta de alpaca de parto normal. 3
Figura 2. Membrana epidermal del feto de alpaca. 4
Figura 3. Proyecciones coriónicas de la placenta de alpaca a los 264 días de preñez. 5
Figura 4. Interfase materno-fetal de alpaca. 5
Figura 5. Envases estériles para transporte de tejidos. 8
Figura 6. Duración del ciclo celular. 14
Figura 7. Pellet celular obtenida con colagenasa clostridial y tripsina. 30
Figura 8. Número de células vivas obtenidas según enzima utilizada para disgregación tisular. 31
Figura 9. Número de células muertas según agente enzimático utilizado para disgregación tisular 31
Figura 10. Microfotografía de células primarias de placenta de alpaca en cultivo primario 32
Figura 11. Longitud (Long.) y ancho de células obtenidas por explante y mediante colagenasa 33
Figura 15. Cinética de crecimiento de células primarias obtenidas por explante y colagenasa en pasaje 1 34
Figura 16. Nivel de doblaje poblacional acumulativo en células del método explante (control) y método colagenasa 34
Figura 17. Niveles de expresión relativa de Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog 35

APÉNDICE

Pág.

Cuadro A. 1. Comparación del recuento celular del método de colagenasa, tripsina y explante 54
Cuadro A. 2. Normalidad del recuento de células vivas por método de aislamiento..... 55
Cuadro A. 3. Normalidad del recuento de células muertas por método de aislamiento.. 55
Cuadro A. 4. Análisis micrométrico en células fusiformes del método explante en pasaje 0 y 1. 56
Cuadro A. 5. Análisis micrométrico en células fusiformes del método colagenasa en pasaje 0 y 1..... 57
Cuadro A. 6. Normalidad del análisis micrométrico en células fusiformes del método explante y del método colagenasa 58
Cuadro A. 7. Recuentos de células primarias cada 24hrs por 6 días del método explante 58
Cuadro A. 8. Recuentos de células primarias cada 24hrs por 6 días del método colagenasa 59
Cuadro A. 9. Normalidad del recuento celular en cada hora determinada del método colagenasa 60
Cuadro A. 10. Promedio de ΔCt del calibrador para el gen Oct4 60
Cuadro A. 11. Promedio de ΔCt del calibrador para el gen Sox2..... 60
Cuadro A. 12. Promedio de ΔCt del calibrador para el gen c-Myc 61
Cuadro A. 13. Promedio de ΔCt del calibrador para el gen Nanog. 61
Cuadro A. 14. Valores promedio del ciclo umbral (Ct) y temperatura de disociación (Tm) de los genes Gapdh, Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog..... 62
Cuadro A. 15. Valores promedio Ct y 2-ΔΔCt de genes Gapdh, Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog..... 63

Figura A. 1. Medición biparietal del feto de alpaca en último tercio de gestación..... 53
Figura A. 2. Curvas de amplificación de genes Gapdh, Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog.... 64
Figura A. 3. Curva de disociación del gen Gapdh 65
Figura A. 4. Curvas de disociación de los genes Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog. 66

I. INTRODUCCIÓN

La alpaca como producto bandera del Perú, es un animal productor de fibra fina muy valorizado en el mundo por su calidad textil, que, a pesar de ser muy valorada en la industria de la moda, también posee peculiaridades biológicas que generan gran interés para la ciencia y medicina (Revets *et al*., 2005; Arbabi-Ghahroudi, 2017).

La población de alpacas (*Vicugna pacos*) en el Perú concentra 3'685,516 cabezas, cuya mayor proporción se concentra en los pequeños criadores de la zona altoandina, que albergan gran cantidad de estos camélidos a diferencia de las diversas formas organizativas presentes en el país (INEI, 2012); los últimos registros del Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS) posiciona al Perú como el país que alberga la mayor población de alpacas en el mundo con 87%, seguido de Bolivia con 9.5% (Schmid, 2006).

Entre los camélidos sudamericanos mayormente estudiados bajo el contexto de investigación científica, es la alpaca, el cual ha demostrado su aporte en la producción de líneas celulares para replicaciones virales y parasitarias (Sánchez, 2006; Franceschi *et al*., 2014), así como la producción de nanoanticuerpos con fines de diagnóstico viral (Rubio, 2018), su utilidad como biomarcador de proteínas endocelulares (Rajan *et al*., 2015), y prometedora terapéutica contra enfermedades infecciosas, desórdenes sanguíneos y cáncer (Revets *et al*., 2005; Muyldermans *et al*., 2009; Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Por otro lado, las células de alpaca se investigaron también con fines comerciales de moda textil en la manipulación de pigmentación del color de la capa epidérmica (Bai *et al*., 2010), así como la criopreservación de células madre espermatogoniales para fines biotecnológicos reproductivos (Valdivia *et al*., 2019); sin embargo, la evaluación del rendimiento de células de alpaca frente a los distintos métodos de aislamiento, aún son muy poco conocidas.

Dado que las fuentes extrafetales de camélidos son desechables durante el parto, así como en centros de beneficio (Fayemi y Muchenje, 2013; Benaissa *et al*., 2016), permite de alguna manera aprovechar los recursos extrafetales para aislamientos de diferentes tipos de células madre con fines terapéuticos para la clínica veterinaria. Diversos autores

caracterizaron la potencialidad de las células de placenta de las distintas especies mamíferas en relación a la capacidad de diferenciación multipotencial, tolerancia inmunológica, eficiencia de reprogramación y alcances de regeneración tisular (Abdulrazzak *et al*., 2010; Caruso *et al*., 2012; Vadakke-Madathil *et al*., 2019) que sin duda alguna, ayudan a discernir la calidad de células de placenta para tratamientos regenerativos.

El procesamiento tradicional para la disgregación celular primaria de tejidos requiere de tratamientos mecánicos y/o enzimáticos (Buttery y Bishop, 2005), que de alguna manera altera la viabilidad celular (Cunningham, 2010), además, las condiciones de cultivo *in vitro* como enriquecer el medio de cultivo con nutrientes, hormonas, factores de crecimiento, entre otros, también intervienen en el mantenimiento y rendimiento celular (Ethier *et al*., 1987; Lee *et al*., 1997; Vargas *et al*., 2013).

Las técnicas que se usan para aislar células primarias son diversas, sin embargo, para la liberación celular, se requieren enzimas que desintegren componentes estromales, uniones de adherencia intercelular y extracelular, cuya gama de enzimas comerciales son aptos para la desintegración tisular (Buttery y Bishop, 2005); las enzimas de mayor uso enzimático son la colagenasa clostridial y tripsina, que al ser aplicadas en diferentes tejidos animales y humanos revelan diferencias significativas en la cantidad celular obtenida, rendimiento *in vitro* y expresión génica (Araujo *et al*., 2018; Feng *et al*., 2018; Miersch *et al*., 2018), además, los cultivos primarios de tejidos mamíferos son diversas, pudiendo presentar diferencias en el nivel de proliferación celular, cambios en el fenotipo y variación en la expresión de factores transcripcionales en los primeros pasajes del cultivo (Phipps *et al.*, 2007; Januszyk *et al*., 2015).

El objetivo del trabajo consistió en evaluar dos métodos enzimáticos para aislar células primarias de placenta de alpaca, con uso de agentes disgregantes de colagenasa y tripsina, seguidamente de la evaluación de morfología celular, cinética de crecimiento y expresión de 4 genes de pluripotencia Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Placentación en Camélidos

La placenta de mamíferos es un órgano extracorpóreo transitorio que sustituye las funciones de soporte del pulmón, hígado, intestino, riñones y glándulas endócrinas durante el desarrollo fetal (Burton y Fowden, 2015), cuyo desarrollo comienza desde la formación del trofoectodermo en la fase embrionaria hasta la formación de la placentación corioalantoica en la fase fetal (Wooding y Burton, 2008).

Las particularidades morfológicas que caracteriza a la placenta de alpaca son su forma bicornual, aspecto frondoso, textura aterciopelada y ausencia de vellosidad coriónica en la zona medial de los cuernos placentarios (Figura 1). Además, tienen un peso promedio de 0.8 ± 0.19 Kg, que representa el 10.3% del peso corporal del feto, y presenta dimensiones macroscópicas del área superficial del alantoamnios y el corion fetal de 87.6 ± 15.56 dm^2 y 72.3 ± 9.28 dm^2, y volúmenes de 0.14 ± 0.079 L y 0.37 ± 0.078 L respectivamente (Meesters *et al*., 2019).



Figura 1. Placenta de alpaca de parto normal.
Presenta aspecto frondoso, de color rojo borgoña y textura aterciopelada; presenta pocas zonas de vellosidad coriónica en el aspecto medial de los cuernos (flechas). Adaptado de Meesters *et al*. (2019).

Generalmente, la placenta de mamíferos se constituye de 3 membranas extrafetales que incluyen el corion, alantoides y amnios, no obstante, en camélidos y porcinos resaltan la existencia de una cuarta membrana extrafetal denominada membrana epidermal o epitelión (figura 2), que va adherida al cuerpo del feto y tiene la función de nutrir y facilitar el parto por su aspecto resbaladizo (Fowler y Olander, 1990; Pearson *et al*., 2015; Meesters *et al*., 2019).



Figura 2. Membrana epidermal del feto de alpaca.
Adaptado de Meester *et al.* (2019)

2.1.1. Histología de Placenta de Alpaca

La estructura histológica de la placenta de camélidos, se asemejan mucho a los camellos, equinos y porcinos, por el aspecto difuso velloso y por el tipo de placentación epiteliocorial (Iturrizaga *et al*., 2007; Eisa, 2008; Schaefer *et al*., 2012) sin embargo, a pesar de tener el mismo tipo de placenta, éstas difieren entre placentas epiteliocoriales (Olivera y Bevilacqua, 2014).

La placenta de alpaca se caracteriza por presentar profundas vellosidades coriónicas en forma de globo (Figura 3), plegados de forma intrincada con presencia de depósitos minerales en los ápices semicirculares, estroma coriónico y epitelio trofoblástico (Schaefer *et al*., 2012). El tipo de placentación es epiteliocorial difusa (Olivera *et al*., 2003), muy similar a las especies del orden Pholidota, Perissodactyla, Artiodactyla, Cetácea y Primate (Carter y Enders, 2013), donde la interfase materno-fetal que es el límite tisular entre el corion maternal y el corion fetal (Figura 3 y Figura 4), ocurre las funciones de nutrición histiotrófica, producción de hormonas e intercambio de moléculas para la sobrevivencia y desarrollo fetal (Olivera *et al*., 2003), además se cumple también la función de tipo hemotrófica y de transporte de oxígeno (Steven *et al*., 1980; Wooding y Burton, 2008).



Figura 3. Proyecciones coriónicas de la placenta de alpaca a los 264 días de preñez.
Proyecciones del corion fetal al corion maternal; tinción de células trofoblásticas en la interfase materno-fetal. (me) mesénquima, (vm) vaso sanguíneo materno, (T) capa celular trofoblástica, (*) estroma endometrial, (E) epitelio uterino. Historesina azul de toluidina, 640X. Adaptado de Olivera y Bevilacqua (2014).

Por otro lado, en la porción maternal, las células poliédricas del epitelio uterino muestran proyecciones irregulares con gran actividad biosintética, debido al incremento de organelos y vesículas citoplasmáticas, y se reducen áreas tisulares del estroma endometrial y glandular por la profundización de vellosidades coriónicas fetales propia del desarrollo placentario (Olivera *et al*., 2003).

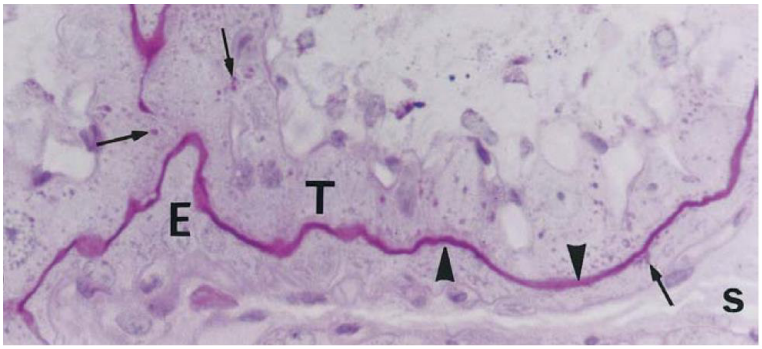


Figura 4. Interfase materno-fetal de alpaca.
Delimitación materno-fetal ondulada de color violeta (puntas de flecha). Trofoblasto (T), epitelio uterino (E), estroma endometrial (S) y gránulos internos del trofoblasto (flechas). Tinciòn de PAS x1,260. Adaptado de Olivera *et al*. (2003).

La placenta de mamíferos generalmente se compone de tipos celulares como células del trofoblasto, fibroblastos mesenquimales, fibroblastos vasculares, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales del alantoides y células epiteliales del amnios, cuyos grupos celulares comparten las mismas características fenotípicas con estructuras extrafetales de la Alpaca (Olivera *et al*., 2003; Furukawa *et al*., 2014; Barrios-Arpi *et al*., 2017).

2.2. Potencialidades de la Placenta

La placenta es una fuente de células madre mesenquimales por las características multipotenciales que poseen, cuya capacidad refleja gran actividad proliferativa y de diferenciación celular hacia linajes mesodérmicos y endodérmicos (Marcus y Woodbury, 2008); también se caracteriza por tener capacidad inmunomoduladora e hipoinmunogénica que las convierten en fuentes óptimas para trasplantes celulares de la misma especie y de diferente especie (Oliveira y Barreto-Filho, 2015; Abumaree *et al*., 2017).

En caninos, indican que células madre derivadas de placenta presenta particularidades comunes a las células madre mesenquimales de tejidos adultos (Saulnier *et al*., 2016), con repercusión en la práctica veterinaria pudiendo trasladarse a la clínica humana, empleando modelos animales domésticos obteniéndose efectos favorables en enfermedades musculoesqueléticas así como en procesos de cicatrización (Barboni *et al*., 2018). Por otra parte, debido a la gran plasticidad que poseen, éstas pueden tener aplicaciones en diversas enfermedades metabólicas, osteoarticulares, ortopédicas y mamarias (Fan *et al*., 2012; Peng *et al*., 2017; Hill *et al*., 2019).

La placenta de mamíferos domésticos puede ser importante en la clínica veterinaria por sus características regenerativas, y por su facilidad de obtención, porque de ella se pueden obtener en grandes cantidades y de diferentes especies domésticas (Yadav *et al*., 2012) con fines de industrialización terapéutica así como para propósitos biotecnológicos (Hill *et al*., 2019). Además, ante la disponibilidad de residuos extrafetales de animales en partos y mataderos, se pueden obtener distintos tipos de células madre con gran plasticidad celular que servirán para tratamientos de diversas enfermedades (Meierhenry *et al*., 2015; Antoniadou y David, 2016), que en un futuro cercano pueden ser de utilidad para la aplicación clínica en camélidos sudamericanos de gran valor económico.

Dada la conformación anatómica de la placenta, Wu *et al*. (2018), determinaron la potencialidad de las células madre según el lugar de residencia tisular, donde establece que células madre de la región fetal presentan mayor capacidad proliferativa que células madre de la región materna, asimismo secretan en mayor proporción factores paracrinos (factor de crecimiento hepático (HGF), factor de crecimiento transformante beta1 (TGF-β1)) indispensables para la homeostasis, quiescencia, autorrenovación y proliferación de células madre, que repercute también de manera externa en la aceleración de reparación/ regeneración de tejidos enfermos (Ho *et al*., 2018).

2.3. Cultivos Celulares de Tejidos Mamíferos

2.3.1. Transporte de Tejidos

La clave del desarrollo de los cultivos primarios en mamíferos, radica en mantener la integridad y esterilidad del tejido minimizando los riesgos de contaminación microbiana que ocurren al extraer y al transportar muestras de tejidos animales (Vierck *et al*., 2000).

Las principales causas de contaminación tisular ocurren por 2 formas, y son, por manipulación incorrecta y por contacto con superficies sucias; el personal colector que no usa la indumentaria el material estéril, contamina directamente el tejido, arrastrando carga microbiana como ocurre accidentalmente cuando está en contacto con superficies del ambiente o material no esterilizado (Coecke *et al*., 2007); asimismo, la inexperiencia del personal colector también forma parte del riesgo de contaminación, debido al escaso conocimiento o falto de practicidad que se requiere para el transporte de muestras estériles (Vaught y Henderson, 2012).

Los contenedores para transporte tisular pueden ser bolsas al vacío, envases de polipropileno o poliestireno (Figura 5), que pueden contener medios de soporte como solución tampón fosfato, cloruro de sodio, medios de cultivo o sueros biológicos con antibiótico y antimicótico (Grizzle *et al*., 2010; Annaratone *et al*., 2013; Phelan y May, 2015).



Figura 5. Envases estériles para transporte de tejidos.
A. Tubos centrífuga de 15ml y 50ml de base cónica y base plana con tapa rosca. **B.** Frasco roscado y graduado, de capacidad 150ml. **C.** Frasco roscado y graduado, de capacidad 50ml. **D.** Sellador al vacío con Bolsas. **E.** Órgano empaquetado en bolsa al vacío.

Por otra parte, la preocupación de mantener el estado funcional de los tejidos desde el momento en que se corta la circulación sistémica del organismo, también influye el modo de conservación del tejido en un medio de soporte; dado que los fenómenos hipóxicos e isquémicos que alteran el metabolismo celular por la ausencia de energía ATP, conducen al desequilibrio osmótico e iónico afectando a los organelos que conllevan a la necrosis celular (Michiels, 2004); por tales consecuencias, es que se suplen los requerimientos energéticos con diferentes medios de soporte para la estabilización de la homeostasis celular. Por otro lado, el tipo de preservación, la elección del medio de soporte y el tiempo de transporte, también influirían en la sobrevivencia de células primarias, como ocurre con la preservación y transporte de células madre para tratamientos clínicos (Celikkan *et al*., 2019; Wu *et al*., 2019).

Se ha demostrado que las óptimas soluciones para transporte de tejidos son los medios de cultivo básico como el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y el medio de cultivo L-15 (Leibovitz's L-15), que al ser suplementado con suero fetal bovino, estas pueden mantener la viabilidad de las células hasta 4 días sin que ocurran muchos procesos de autólisis (Ward-Kischer *et al*., 1989; Wright *et al*., 2014). La preservación tisular también puede ser transportada en bolsas al vacío a 4ºC, manteniendo en más del 80% la viabilidad celular (Annaratone *et al*., 2013).

Los cultivos primarios que se desarrollan de muestras humanas, se obtienen en gran mayoría por medio de asistencias quirúrgicas o asistencias en partos de ambientes sanitizados (Grizzle *et al*., 2010; Yoshizawa *et al*., 2015); en la clínica veterinaria, también se cumple de forma similar (Clevenger *et al*., 2018), obteniendo tejidos sin mucho riesgo de contaminación microbiana, pero al obtenerse en ambientes como en granjas donde no cumplen tales condiciones de asepsia, la integridad estéril del tejido corre riesgo de contaminarse con superficies sucias y fómites (Dockery, 2012; Wong *et al*., 2012).

En camales, las áreas de faenamiento son limpios e higiénicos, sin embargo, en los procesos de faenamiento se contaminan, al dispersar contaminantes propios del ganado, como la gran cantidad de microbios que residen en la piel del animal, así como el esparcimiento de floras microbianas en los procesos de evisceración (Sheridan, 1998), que dificulta la recolección de tejidos estériles.

2.3.2. Medios de Cultivo Empleados

A lo largo de la historia se han desarrollado varios medios de cultivo para mantener la viabilidad de células animales, descubriendo así las necesidades nutricionales, metabólicas y de crecimiento que implica en su desarrollo *in vitro*; actualmente en la investigación básica se siguen empleando medios sintéticos suplementados con suero de origen animal (Yao y Asayama, 2017).

Los medios sintéticos básicos más comunes que se emplean en cultivo celular son medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI1640), medios de cultivo 109 y 199 (199/109 Medium), medio F10 de Ham/medio F12 de Ham (HamF10/HamF12) y medio McCoy's 5A (McCoy´s 5A), cuyos medios fueron diseñados para el mantenimiento básico de una variedad de tipos celulares de mamíferos (Yang y Xiong, 2012).

El medio de cultivo se puede enriquecer con una variedad de suplementos tales como sales, nutrientes, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, extractos de tejidos, sueros de origen animal, factores de adherencia, concentrado lipídico entre otros (Whitford, 2005); sin embargo, los suplementos más comunes empleados en la investigación básica de células derivadas de tejidos extrafetales de animales son suero fetal bovino, glucosa, L-glutamina, antibiótico y antimicótico (Cuadro 2).

2.3.3. Cultivos primarios

Cultivo primario refiere al cultivo de células que son aisladas de tejidos bajo condiciones *in vitro*, cuyas formas de aislamiento celular pueden obtenerse por medio de la disgregación de tejidos o por cultivo de tejidos (Uysal *et al*., 2018). Muchos conocimientos de la biología celular de vertebrados se dieron a conocer por el desarrollo de cultivos primarios en 2D, cuyas formas de cultivo se continúan realizando en placas Petri o matraces de cultivo, que son mantenidas en medios de cultivo estándar o altamente enriquecidos con nutrientes, hormonas y factores de crecimiento (Freshney, 2010).

Las células en cultivo 2D, crecen en monocapa, con una densidad de siembra que abarca desde los $5x10^3$ a $16x10^3$ células/cm^2, con cinética de crecimiento y confluencia correspondiente a la cantidad de células sembradas *in vitro* (Adolphe *et al*., 1997; Zhou *et al*., 2011); al subcultivo o pasaje celular, el operario previamente asigna por calificación subjetiva un grado de confluencia celular, el cual está relacionado a la distribución y llenado celular en la superficie del recipiente (Masters & Stacey, 2007; Prathalingam *et al*., 2012). En cultivo de células madre, el límite de confluencia celular permitido es de 80%, debido a los efectos negativos que se generan en las células por el fenómeno de inhibición de contacto (Abo-Aziza y Zaki, 2017; Kim *et al*., 2017).

A pesar que el recipiente 2D no es óptimo para el crecimiento celular por alteración morfológica así como los cambios de expresión génica y proteica (Kapałczyńska *et al*., 2016), se ha seguido empleando hasta ahora por la accesibilidad, eficiencia y bajo costo para investigadores y clínicos que utilizan constantemente (Duval *et al*., 2017; Gómez de Vírgala, 2019).

2.3.4. Técnicas de obtención de células primarias

Las células primarias pueden obtenerse por medio de varias técnicas, que pueden ser por explante, separación celular por gradiente de Ficoll, fragmentación tisular por láser, disgregación celular por tratamiento enzimático o por combinaciones de técnicas (Jaatinen y Laine, 2007; Min Zhu *et al*., 2013; Araujo *et al*., 2018; Hendijani, 2017).

La técnica por explante refiere al cultivo de tejidos finamente picados en placas Petri o botellas de cultivo, del cual en un período prolongado emergen células que migran a la superficie del recipiente para la adhesión y expansión celular (Freshney, 2010); esta forma

de cultivo permite el mejor enriquecimiento *in vitro* debido a la matriz extracelular del explante, por la migración de diferentes tipos celulares, factores de crecimiento y citoquinas, que semejan a pequeños nichos sistémicos, cuyos roles participan en la homeostasis tisular, autorrenovación y diferenciación de células (Hendijani, 2017).

La separación celular por centrifugación en gradiente de Ficoll, aplica solamente a fluidos corporales como sueros sanguíneos, linfas, fluidos fetales entre otros, el cual se pueden obtener hasta $2.68x10^9$ células mononucleares por litro de cordón sanguíneo (Jaatinen y Laine, 2007). Otra forma de aislamiento es por fragmentación del tejido por láser, el cual licúa de manera rápida los tejidos blandos liberando células (Chung *et al*., 2013), además, en la actualidad se ha revolucionado la técnica por tecnología de aislamiento por microscopio, el cual identifica desde un inicio las células diana del tejido para luego ser aisladas (Brasko *et al*., 2018).

La disgregación celular por tratamiento enzimático fue uno de los métodos tradicionales y mayormente usados para liberar células a partir de tejidos sólidos, el cual permite la rapidez del análisis celular a favor del investigador en el menor tiempo posible. Bajo esta metodología de aislamiento, comprende una gama de enzimas que pueden utilizarse para aislamiento de células primarias, no obstante, entre las enzimas que se usan con mayor frecuencia son las colagenasas del tipo clostridial y las tripsinas purificadas de origen animal; ambos reactivos hidrolizan proteínas estructurales como el colágeno, que actúa como andamios de tejidos para el crecimiento de células, que al ser hidrolizados liberan y facilitan la separación de células del tejido (Dresner y Schubert, 1955), y son muy comercializados por reconocidos proveedores comerciales como Sigma Aldrich, Thermo Fisher Scientific, Worthington, Biowest, entre otros.

2.3.5. Enzima Colagenasa

Las colagenasas que actualmente se comercializan en diversos tipos, surgen de investigaciones desarrolladas por Mandl y colaboradores (1958), quienes formaron la colagenasa cruda a partir del filtrado del cultivo de *Clostridium hystoliticum*, el cual compone de diferentes enzimas que disgregan tejidos mamíferos rápidamente. Hasta ahora se han identificado 7 tipos de enzimas clostridiales, que son clasificados en clase I (α, β, γ, and η) y clase II (δ, ε and ζ); dichas enzimas hidrolizan colágenos nativos de triple hélice I, II y III en pequeñas cadenas de péptidos, y descomponen los tejidos a diferentes cinéticas

de digestión; la diferencia entre ambas clases radica por la estructura química y especificidad que tienen hacia residuos aminoácidos (Van-Wart, 2013).

Las diferentes colagenasas que se distribuyen tienen varias denominaciones, son relacionadas de acuerdo a la purificación de enzimas proteolíticas que realizan a partir de las colagenasas crudas, y que éstas digieren diferentes tejidos unos mejor que otros; los tipos de colagenasas se presentan en distintos tipos de acuerdo a la clasificación efectuada por el proveedor comercial (Yamamoto *et al.*, 2007; Bertuzzi *et al.*, 2009).

2.3.6. Enzima Tripsina

La tripsina, es una proteasa serina encontrada en el sistema digestivo de muchos vertebrados, que hidroliza proteínas de la porción carboxílica de aminoácidos lisina y arginina (Kaphalia, 2014); se comercializa bajo la forma líquida o liofilizada, y pueden estar suplementados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o con el inhibidor de fenilalanilclorometilcetona (TPCK).

La EDTA, aúna la acción enzimática reduciendo la concentración de iones metálicos que inhiben la tripsina (Oviedo y Rodríguez, 2003), mientras que la TPCK, inhibe la actividad de la quimotripsina que en ocasiones se encuentran trazas en el filtrado de tripsina, e inhibe su acción enzimática (Shaw, 1967). La acción enzimática de la tripsina-EDTA rompe las uniones de adherencia de la matriz extracelular con las células del tejido, permitiendo su liberación en el medio de suspensión, además, se utilizan también para realizar pasajes celulares de una placa de cultivo confluente a otros recipientes para la continua expansión celular (Vogel, 1978; Gilbert *et al*., 2006).

2.3.7. Aislamiento primario con Colagenasa y Tripsina

Las enzimas colagenasa clostridial y tripsina, pueden aplicarse en diversos tejidos animales como en humanos para aislamiento de células, sin embargo, la composición tisular de cada región anatómica es diferente en el organismo, así como ocurre entre especies (Silvipriya *et al*., 2015).

Además de los métodos de aislamiento enzimático en que se puede obtener mayor densidad celular, puede afectar la calidad celular por el uso de diferentes enzimas (Dehkordi *et al*., 2016). La evolución de las técnicas de aislamiento celular en tejidos extrafetales, llevó a que muchos autores demanden más la colagenasa clostridial por su

gran efecto disgregador en muchos tejidos (Seo *et al*., 2012; Kinzer *et al*., 2014; Proudfit *et al*., 2014; Dehkordi *et al*., 2016; Lange-Consiglio *et al*., 2017; Miniawy *et al*., 2017) a comparación de la tripsina (Beeravolu *et al*., 2017; Choi *et al*., 2017).

Algunos autores realizan combinaciones enzimáticas de colagenasa/tripsina para obtener mayor densidad celular, asimismo infieren que no altera la expresión de ciertos marcadores de pluripotencia como CD117/c-Kit y Oct4, a diferencia del método de digestión con tripsina y de otras combinaciones enzimáticas como colagenasa/hialuronidasa/tripsina (Salehinejad *et al*., 2012).

2.4. Cinética de Crecimiento Celular

El ciclo de una célula comprende de interfase, mitosis y fase G_0 (Figura 6), cuya fase más duradera ocurre en la interfase por los procesos que involucra crecimiento, síntesis y replicación del material genético que la prepara a la célula para su división (Bavle, 2014).

El tiempo de duración aproximada del ciclo celular en las fases de pre-implantación y post-implantación son de 4.4 horas, mientras que en el proceso de gastrulación se incrementa hasta 16 o más horas (Dalton y Coverdell, 2015); asimismo, a medida que las células embrionarias continúan diferenciándose a diversos fenotipos celulares, también se incrementa la duración del ciclo en su interfase (Soufi y Dalton, 2016).

Dado que cada línea celular presenta distintos ritmos de proliferación celular, es indispensable la caracterización proliferativa de las células diana por los propósitos que sirven a los investigadores en el desarrollo de estudios posteriores, así como el reporte del crecimiento celular con fines terapéuticos (Samsonraj *et al*., 2015).

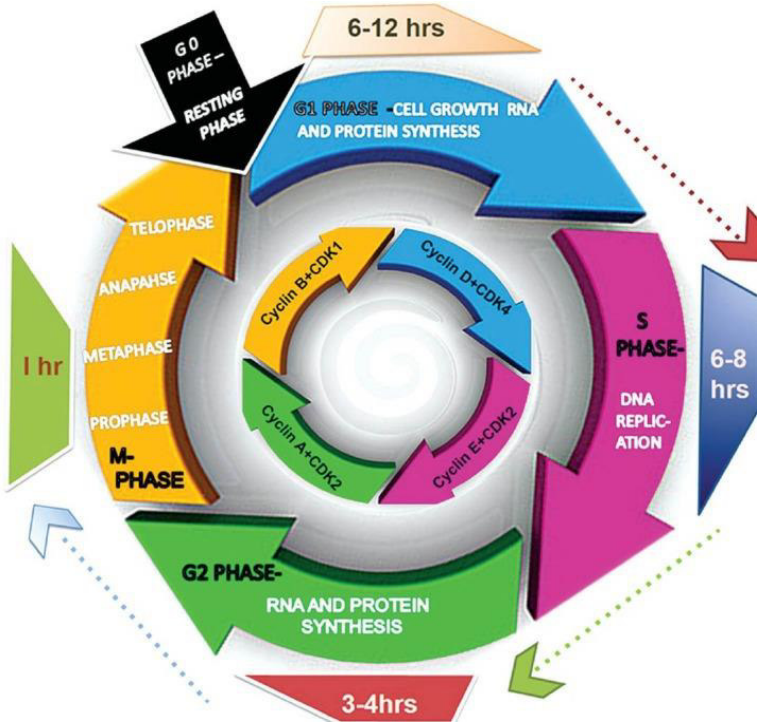


Figura 6. Duración del ciclo celular.
Adaptado de Bavle (2004)

La forma tradicional de evaluar la cinética de crecimiento de una línea celular comienza con el recuento celular a determinados tiempos en cultivo y según el nivel de subcultivo en que se encuentran; las herramientas con las que se permite contabilizar las células son la cámara de Neubauer y sistemas automatizados como contador celular por microscopio y citómetros de flujo; muchos autores respaldan el uso de sistemas automatizados por la rapidez de registro de gran número de muestras, sin embargo, consideran que existen errores de exactitud y precisión en el recuento celular (Cadena-Herrera *et al*., 2015; Camacho-Fernández *et al*., 2018).

Los parámetros que se necesitan para evaluar la cinética de crecimiento celular son el tiempo de cultivo determinado, la cantidad de células sembradas al inicio y la cantidad celular cosechada; del cual se aplican cálculos matemáticos para determinar el estado de una línea celular en cuanto al tiempo en que la población celular se duplica y el nivel de doblaje que produce (Benyumovich, 1966; Greenwood *et al*., 2004).

Diversos autores han realizado evaluaciones de la cinética de proliferación celular derivadas de tejidos extrafetales de humano y animales domésticos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de la cinética de proliferación celular

Referencia	Muestra Tisular de la Especie	N° Subcultivo	Densidad de siembra (células/cm^2)	Nivel de Doblaje Poblacional Acumulativo (CPDL)	Tiempo de Doblaje Poblacional (DT)	Medio de cultivo
(Li et al. 2014)	Placenta de Humano	2	1.00E+04	1.69	56.47hrs	α-MEM + 10%FBS
(Wu et al. 2018)	Placenta de Humano	3	8.50E+04	-	38.71±9.27hrs	DMEM/F12 + 10%FBS
(Chen et al. 2011)	Fluido Amniótico de Porcino	6	2.10E+03	2.43	34.6hrs	AMM + α-MEM + 15%FBS
(Gupta et al. 2005)	Piel de Camello	1	1.60E+03	3	32.80±0.47hrs	DMEM/F12 + 10%FBS
(Seo et al. 2013)	Membrana Amniótica de Equino	3	5.00E+03	3.95	30.34hrs	LG- DMEM + 10%FBS
(Coli et al. 2011)	Membrana Amniótica de Equino	1	1.00E+05	3.25	30hrs	α-MEM + EGF
		1	1.00E+05	2	80hrs	α-MEM + FCS + HS
(Saadeldin et al. 2017)	Trofoblasto Embrionario Bovino	1	2.50E+04	-	48hrs	DMEM-199+ céls Granul+ NEAA + β - Mercapt + Nucléosidos
(Zhan et al. 2019)	Placenta de Canino	3	5.20E+03	8.71	21.20hrs	DMEM + 10%FBS + 1% L-Glut
(Feng et al. 2000)	Cotiledón Placentario de Bovino	0	1.05E+05	3.99	18hrs	Medio 199 + 10%FBS
(Ribitsch et al., 2017)	Cotiledón Placentario de Ovino	1	3.00E+03	-	39hrs	LG -DMEM + 10%SFB+1% L-Glut+ 1% strep/penicil/anfo
(Somal et al., 2016)	Placenta y Cordón Umbilical de Caprino	3	2.00E+04	-	cAF=39.45hrs, cAS=53.11hrs, cWJ=33.70hrs, cCB=34.98hrs	HG- DMEM + 15%FBS + 50µg Gentam

Medios de cultivo comerciales: DMEM, DMEM/F12, Medio 199 y α-MEM
AMM: Medio Mesenquimal amniótico (elaborado)
EGF: Factor de Crecimiento Epidermal
FBS y FCS: Suero Fetal Bovino y Suero Fetal de Ternera
HS: Suero equino
Granul: capa de células de la granulosa
NEAA: Aminoácidos No Esenciales
Mercapt: β-Mercaptoetanol
L-Glut: L- Glutamina
LG-DMEM: DMEM de baja glucosa
HG-DMEM: DMEM de alta glucosa
Gentam: Sulfato de gentamicina
cAF: Fluido amniótico caprino
cAS: saco amniótico caprino
cWJ: gelatina de wharton caprino
cCB: sangre del cordón umbilical caprino

2.5. Factores de Transcripción de Pluripotencia en Tejidos Extrafetales

La pluripotencia es un indicativo del potencial diferencial de las células madre embrionarias, en cuyas fases de diferenciación conservan cierto pool de genes que permiten mantener la autorrenovación de las células madre hasta la fase adulta (Smith, 2017; Labusca y Mashayekhi, 2019).

Son muchos los genes que participan en el estado de pluripotencia, sin embargo, de acuerdo a la fase de desarrollo, ciertos genes permanecen activos para desencadenar la transcripción de otros genes, así como también apagar la expresión de otros para permitir la diferenciación celular (Tsai y Hung, 2012; Theunissen y Jaenisch, 2017).

Dentro de la red de regulación génica, Oct4 y Sox2, se encuentran dentro de la cima jerárquica del estado de pluripotencia, cuyo complejo de interacción induce la transcripción de Nanog, participando también en la autorrenovación celular como en la mantención del estado de pluripotencia (Rodda *et al*., 2005), asimismo la baja de expresión de Nanog ayuda en el desarrollo embrionario a la diferenciación celular, visto de otro modo también tiene una participación positiva en la reprogramación celular (Yu *et al*., 2018). El gen c-Myc, también está involucrado en procesos de proliferación y mantención de la pluripotencia, además de participar en la diferenciación, apoptosis y progresión del ciclo celular, sin embargo, también se ha descubierto que está íntimamente relacionado en la formación de diversas neoplasias (Smith & Dalton, 2010; Ospina Pérez y Muñetón Peña, 2011).

Por otro lado, como Sox2 se ha visto que participa en la formación del trofectodermo embrionario (Keramari *et al*., 2010), esta disminuye en la maduración de placenta de mamíferos, notándose casi nula su expresión en las últimas fases de gestación (Weber *et al*., 2016). Conocer la red de regulación génica en fases de formación embrionaria, desarrollo fetal y placentación de animales domésticos, aún sigue siendo desconocida, sin embargo, pocos estudios realizados en cerdos, ratones y humano, se ha descrito que los genes Oct4, Sox2 y Nanog tienen diferente interacción génica en la sobreexpresión

de un gen con respecto a otro, así como la baja regulación de un gen clave con respecto a otros (Barreto *et al*., 2011).

Desde que Takahashi, and Yamanaka (2006) descubrieron que las células somáticas se pueden reprogramar al estado pluripotente con los factores de transcripción de Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, se han desarrollado oportunidades de reprogramación celular derivadas de tejidos extrafetales para aplicaciones de ingeniería tisular fetal y medicina regenerativa (Jiang *et al*. 2014), cuya utilidad en el futuro puede servir como una opción terapéutica en animales domésticos.

2.6. Células Primarias de Tejidos Extrafetales

Desde que se conoce las potencialidades de las células madre en médula ósea, sangre y grasa, se ha visto la oportunidad de desarrollar investigaciones en diversos tejidos como las fuentes extrafetales de animales y humano, del cual se obtienen con facilidad en los partos (Yadav *et al*., 2012).

Los reportes de aislamiento y caracterización de células madre realizados en diferentes especies domésticas y humano muestran complejidad en la forma aislamiento, medios de cultivo y las diferentes densidades de siembra a la que se puede cultivar, los cuales estos repercuten en la cinética de crecimiento celular, así como la expresión de genes de pluripotencia (Cuadro 2).

Cuadro 2. Referencias de aislamiento de células primarias de tejidos extrafetales.

Referencia	Método de Aislamiento	Línea Celular	Medio de cultivo	Densidad de Siembra	Nº de Pasaje Celular	Cinética de Crecimiento	Expresión Génica Pluripotente
FASE EMBRIONARIA							
(Saadeldin *et al*., 2017)	Obtención mecánica por aspiración	Línea celular trofoblasto de camello	DMEM+L-Glutamina+ 10%SFB+Mercaptoetanol+aa esenciales+EFG+FGF+Selenio, transferrina e insulina+1% Antibiótico	-	Psje1	-	Oct4, Sox2 (expresión elevada) y C-Myc (expresión elevada)
(Beeravolu *et al*., 2017)	Tripsina 0.25%	Células primarias de placenta fetal de humano	DMEM+L-Glutamina+ 10%SFH+1% Antibiótico	$10^4/cm^2$	Psje1	**Tiempo de Doblaje:** 94hrs	Oct4, Nanog y Sox2
(Suasnavas, 2013)	Tripsina 0.05%	Células de trofoblasto porcino	Medio para trofoblasto	-	Psje1	-	Oct4 (Expresión en el día 15) y C-Myc (mayor expresión al día 30)
			Medio para Fibroblasto	-	Psje 1	-	Oct4 (Expresión en el día 15) y C-Myc (mayor expresión al día 15)

ÚLTIMO TERCIO DE GESTACIÓN							
(Dev *et al*., 2012)	Tripsina 0.25%	Células primarias de placenta de búfalo	DMEM + 16%SFB+1%Solución de Vitamina+ 1% Antibiótico	$10^3/cm^2$	Psje2	-	Oct4 (regular), Nanog y Sox2 (débil expresión)
(Peng *et al*., 2017)	Tripsina 0.25%	Células primarias de placenta de bovino	αMEM + 10%SFB+ 1% Antibiótico	-	-	-	-
(Ribitsch *et al*., 2017)	Colagenasa tipo I 1%	Células primarias de cotiledón placentario de ovino	DMEM (baja Glucosa) + 10%SFB+1% L- Glutamina+ 1% Antibiótico-antimicótico.	$3x10^3/cm^2$	Psje1	**Tasa de Doblaje:** 0.729. **Tiempo de Doblaje:** 39hrs	-
(Seo *et al*., 2013)	Tripsina 0.05%/Colagenasa tipo I	Células primarias de membrana amniótica equina	DMEM (baja Glucosa) + 10%SFB+ 1% Antibiótico-antimicótico.	$5x10^3/cm^2$	Psje3 al Psje14	**Nivel de Doblaje acumulativo:** 3.95 **Tiempo de Doblaje:** 30.34hrs	-
(Long *et al*., 2018)	Digestión enzimática/Explante: Tripsina 0.25%	Células primarias de placenta canino	DMEM (Alta Glucosa + 10%SFB+ 1% Antibiótico-antimicótico.	$10^4/cm^2$	Psje 4 al Psje 9	**Tiempo de doblaje:** 19.94hrs (Psje4) y 48.69hrs (Psje9)	-
(Araujo *et al*., 2018)	Colagenasa tipo I 0.1%	Células primarias de placenta humana	DMEM + 20%SFB+1% L-Glutamina+ 1% Antibiótico-antimicótico.	$5x10^3/cm^2$	Psje 1 y Psje 15	**Nivel de doblaje:** 4 (hasta el psje 9)	-
(Chen *et al*., 2011)	Aspiración mecánica	Fluido Amniótico de Porcino	AMM + α-MEM + 15%FBS	$2.1x10^3/cm^2$	Psje 6	**Tiempo de doblaje:** 34.6hrs	Oct4 y Nanog (Regular expresión)

En el Cuadro 2, se muestran un comparativo de aislamiento de células derivadas de linajes embrionarios versus células de tejidos extrafetales en último tercio de gestación, el cual denota que la expresión génica en la fase embrionaria muestra mayor expresión de genes Oct4, Sox2 y Nanog, a comparación de la placenta terminalmente diferenciada. Por otro lado, las células de placenta que se aislaron por (Beeravolu *et al*., 2017), se cultivó inicialmente por explante, cuya cinética de crecimiento denotó ralentización a comparación de las diferentes células de placenta de último tercio de gestación.

2.7. Aislamiento de Células Madre en Camélidos

Las células madre surgen a partir de los cultivos primarios, cuya purificación se logra de la eliminación de células heterogéneas y eritrocitos en los primeros estadios del cultivo (Soleimani y Nadri, 2009), y se han investigado en diversos tejidos animales por diferentes tipos de aislamiento y formas cultivo (Cuadro 2).

En la actualidad, existen muy pocos reportes de aislamiento de células madre en camélidos con fines de investigación clínica; cuyos primeros reportes fueron realizados en camélidos del viejo mundo y luego en alpacas (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al*., 2013; Enciso-Benavides *et al*., 2017; Miniawy *et al*., 2017; Saadeldin *et al*., 2017; Valdivia *et al*., 2019).

Mohammadi-Sangcheshmeh *et al*. (2013) aisló células madre adiposas del camello arábigo aplicando colagenasa de tipo I al 0.2%, cultivó *in vitro* con suplementos nutritivos estándar que consistía en DMEM de baja glucosa, más 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico, cuyas células presentaron buen ritmo proliferativo hasta el pasaje 6, y presentaban habilidades de transdiferenciación a linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico.

Saadeldin *et al*. (2017), obtuvo células madre del trofectodermo embrionario del camello arábigo por aspiración mecánica, al cultivo *in vitro* evidenció que la morfología celular era de forma epitelial cuboidal y mantenía ese fenotipo hasta los siguientes pasajes, no especifica análisis de proliferación, pero caracterizó la expresión de transcriptos de pluripotencia, y evidenció que presentan alta expresión en los genes Cdx2, Krt8, Oct4, c-Myc y Sox2.

Miniawy *et al*. (2017): realizó xenotrasplante de células madre mesenquimales derivadas de la gelatina de wharton de camello en ratas con diabetes inducida, en cuyo trabajo describe la forma de aislamiento celular con colagenasa de tipo II al 0.3%, cultivados con suplementos estándar igual al trabajo de Mohammadi-Sangcheshmeh y colaboradores; el autor comunica características superficiales del cultivo, como su morfología fusiforme y formación de colonias celulares en el pasaje 0, además que presentan marcadores de superficie CD29 y CD90 en más del 90% de las células en cultivo, mas no evidencia mayores características de la capacidad proliferativa o expesión génica pluripotente.

Por otro lado, en alpacas se ha reportado caracterización parcial de células madre derivadas del tejido adiposo y del testículo, mas no en tejidos extrafetales. Enciso-Benavides *et al*. (2017), y caracterizó parcialmente células madre del tejido adiposo de alpaca con colagenasa tipo I, cultivó con DMEM más 10% de suero fetal de alpaca a una densidad de siembra de 7,000/cm^2 y reveló por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa la expresión de genes Oct4, Runx2, Sox9, Ppar y Mmp-2 al pasaje 3.

Mientras que Valdivia *et al*. (2019), aisló células madre espermatogoniales disgregando el tejido testicular con procesos de combinaciones enzimáticas de hialuronidasa, colagenasa, DNAsa y cultivando en 2 medios de cultivo diferentes para evaluar el mantenimiento de las capacidades potenciales de las células madre; los medios de cultivo fueron DMEM y STEMPRO, ambos añadidos con suplementos de glutamina, solución MEM de aminoácidos no esenciales, selenito de sodio, transferrina, insulina, ácido pirúvico, ácido láctico, suero de albumina bovina, suero fetal bovino y suero de leche humana. Estos autores no encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las células madre en pasaje 0, en relación con la expresión de la lectina *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) de mayor marcación y débil marcación; por lo que ambos medios de cultivo son buenos para el mantenimiento celular al pasaje 0, sin embargo, no se sabe si los medios de cultivo mantendrían el estado normal de los genes pluripotentes y multipotentes de las células primarias.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Ejecución

La colección de placentas de fetos de alpacas se realizó en el camal municipal de la ciudad de Huancavelica, provincia de Huancavelica y departamento de Huancavelica (Perú) entre los meses de agosto del 2018 a junio del 2019, los estudios biológicos in vitro se realizaron en los laboratorios de Cultivo Celular e Inmunología y de Genética Molecular y Bioquímica de la Universidad Científica del Sur.

3.2. Colección de muestras

Respecto al criterio de evaluación del tiempo gestacional de la alpaca, se calculó en base a la fórmula propuesta por Gazitua *et al*. (2001), que consiste en medir el diámetro biparietal del feto para conocer la edad gestacional (Figura A.1), aplicando la siguiente ecuación:

$$GA = (BPD - 0.11376) \times 47.23287$$

- GA = Edad Gestacional
- BPD = Diámetro Biparietal Fetal

Como el tiempo gestacional de la alpaca varía entre 11 a 12 meses, el inicio del último tercio de gestación se calcula entre los 220 a 240 días respectivamente, asimismo, según los cálculos teóricos aplicados con la ecuación, corresponderían respectivamente a los 4.78cm y 5.20cm de diámetro biparietal fetal (Cuadro 3).

Cuadro 3. Mediciones teóricas del diámetro biparietal fetal

CALCULO DE TIEMPO GESTACIONAL DEL ÚLTIMO TERCIO DE GESTACIÓN DE ALPACA, CORRESPONDIENTES ENTRE LOS 11 Y 12 MESES DE GESTACIÓN COMPLETA		
Tiempo Gestacional de la Alpaca (Meses)	**11**	**12**
Primer tercio de gestación (Meses)	3.67	4.00
Segundo tercio de Gestación (Meses)	7.33	8.00
Segundo tercio de Gestación (Días)	220.00	240.00
Inicio del Último Tercio de Gestación (Días)	221	241
Diámetro Biparietal del Feto de Alpaca (cm)	4.78	5.2
Tiempo Gestacional de la Alpaca del último tercio- Calculado (Días)	220.40	240.24

Las muestras de placenta de alpaca se obtuvieron de fetos en último tercio de gestación, separando la envoltura uterina de las membranas extrafetales. Luego las muestras son lavadas con suero fisiológico al 0.9% y de inmediato se colocan en recipientes estériles con medio de transporte consistente en una base de DMEM-F12, adicionado por 5% de suero fetal bovino, 2% de solución de ciprofloxacino (200mg/100ml) y 2% de solución de fluconazol (200mg/100ml) (Protocolo establecido por el Laboratorio de Cultivo Celular e Inmunología de la Universidad Científica del Sur). Los frascos conteniendo las muestras son colocados en una caja térmica con geles refrigerantes para su transporte.

3.3. Tamaño Muestral

El tamaño muestral se calculó de acuerdo a la diferencia de medias (Talavera *et al.*,2011), mediante un ensayo piloto de aislamiento de células primarias de placenta de alpaca, se eligió 25 muestras por metodología de aislamiento.

$$n = 2\left[\frac{(Z_\alpha - Z_\beta)\ DE}{\mu_1 - \mu_2}\right]^2$$

Donde:

n: es el número de muestras que se requieren por cada grupo a evaluar.

Z_α: es el valor de Z relacionado con $\alpha = 0.05$

Z_β: es el valor de Z relacionado con un $\beta = 0.20$ (poder de 80%)

DE: es la desviación estándar de ambas distribuciones.

μ_1: es la media obtenida con el método de colagenasa

μ_2: es la media obtenida con el método de solución de tripsina

Mientras que para el grupo control por explante, se estableció por criterio personal, 5 muestras de placenta de alpaca.

3.4. Aislamiento y Cultivo de Células Primarias de Placenta

Las muestras de placenta de alpaca se lavaron con solución buffer fosfato 1X a pH 7.4 dentro de una cabina de bioseguridad tipo A2 (Telstar), las muestras se procesaron en paralelo aplicando los métodos de digestión enzimática con solución de colagenasa tipo IA al 0.05% (Sigma Aldrich) y solución de tripsina al 0.05% (Biowest). Previo a los

tratamientos de digestión, se cortaron los tejidos de placenta con hojas bisturí en pequeños trozos tisulares de aproximado $1cm^2$, para el mayor efecto enzimático.

En el procedimiento de digestión enzimática con tripsina se aplicó el protocolo modificado de aislamiento celular por Suasnavas, (2013), que en resumen consiste en incubar los pequeños trozos de tejido con solución de Tripsina-EDTA al 0.05% en baño maría a 39ºC por 10 min., se tamizó con un colador celular de celdillas de 1mm, después se centrifugó a 300g x 10 minutos y se eliminó el sobrenadante; se lavó nuevamente con solución buffer fosfato y posteriormente se realizó conteo celular con cámara de Neubauer previamente tiñendo con el reactivo Azul de Tripán (Sigma Aldrich); después se realizó siembra celular en placas Petri tratadas para cultivo a una densidad de $2x10^4$ células/cm^2 (Wegmeyer et al., 2013), donde se usó medio de cultivo compuesto de DMEM F-12 con 15mM de Hepes (Biowest) suplementado con 15% de suero fetal bovino (Biowest) y una solución de penicilina 10,000 unidades/ml, estreptomicina 10mg/ml y anfotericina B 25ug/ml (Biowest); por último, se sometió a incubación de 37.5ºC con 5% de CO_2, ~21% de oxígeno atmosférico y 95% de humedad.

En cuanto a la digestión enzimática con solución de colagenasa tipo IA (Sigma Aldrich), se aplicó el protocolo modificado de Zhu y colaboradores (2013), cuya metodología de procesamiento fue muy similar al método de digestión con solución de tripsina, con la diferencia que se incubó a 38ºC en baño maría por 10 minutos.

Como control se empleó cultivos primarios de explantes de placenta, en base a experiencia de otros investigadores (Beeravolu *et al*., 2017).

3.4.1. Análisis Estadístico

Se aplicó la técnica estadística U de Mann Whitney y T-Student pareado con ayuda del software Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA), para la comparación significativa entre los grupos en base a la viabilidad y muerte celular.

3.5. Morfometría de células primarias de placenta

Para identificar la morfología de las células primarias en base a las condiciones de cultivo, se tomó microfotografías de células del método explante y del método

colagenasa, en los pasajes 0 y 1, para el análisis ~~de~~ morfométrico de las células en base a su longitud y ancho; para ello, se usó el software Image J (Instituto Nacional de Salud, MD, USA) para realizar las mediciones en micras (µm).

3.5.1. Análisis Estadístico

Se aplicó la técnica estadística de T-Student pareado con ayuda del software Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA), para la comparación significativa entre los grupos en base a la longitud y ancho de las células fusiformes en pasaje 0 y 1.

3.6. Evaluación de la Cinética de Crecimiento

Al cosechar las células primarias obtenidas por explante y por colagenasa, se subcultivaron en placas de 6 pocillos a una densidad de $5x10^3$ células/cm^2, en estas se evaluó la cinética de crecimiento de las células primarias en pasaje 1 (P1). El recuento celular se realizó mediante la cámara de Neubauer empleando la tinción con el reactivo de Azul de Tripán (Sigma Aldrich).

Los parámetros usados fueron el tiempo de doblaje (DT) y nivel de doblaje poblacional acumulativo (CPDL) (Araujo *et al*., 2018), realizándose 6 recuentos uno por cada 24hrs y determinándose mediante las siguientes fórmulas:

$$DT = (T * Ln\,(2))/Ln\,(N_{(t)}/\,N_{(to)})$$

$$CPDL = Ln(N_{(t)}/\,N_{(to)})/Ln(2)$$

Donde: T: Es el tiempo en el que se cosechan las células.

$N_{(t)}$: Es el número de células cosechadas a un tiempo de cultivo.

$N_{(to)}$: Es el número de células sembradas al inicio.

S: Nivel de doblaje del inóculo usado al inicio del subcultivo.

3.6.1. Análisis Estadístico

Se aplicó la prueba T-Student pareado para la comparación de la cinética de crecimiento en determinadas horas del recuento celular de los grupos control y colagenasa; asimismo, se calculó también la media aritmética y desviación estándar del promedio de conteo celular registrado para cada hora determinada.

3.7. Expresión relativa de transcriptos de pluripotencia

3.7.1. Diseño de oligonucleótidos

Los cebadores se diseñaron en el Laboratorio de Cultivo Celular e Inmunología de la UCSUR con el programa PRIMER-BLAST (Centro Nacional de Información Biotecnológica – NCBI), del cual se extrajo secuencias nucleotídicas de Gapdh, Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog de Alpaca (Cuadro 4), publicadas en GenBank (Centro Nacional de Información Biotecnológica- NCBI), además para la determinación del nivel de expresión de los genes diana, se usó al Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (Gapdh) como gen de referencia.

Se probó 2 pares de cebadores de cada gen diana de tamaños de longitud de 100 a 300 pares de bases, ajustando las temperaturas de anillamiento brindadas por el software Primer-Blast, con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; y se eligieron los cebadores que demostraron especificidad a través de la curva de disociación (Cuadro 5).

Cuadro 4. Oligonucléotidos de cada par de gen diana para ajuste de temperatura de anillamiento

Genes Diana	Secuencia de oligonucleótidos[1]: 5' - 3'	Nro Acceso al Banco Genético[2]	Temperatura de anillamiento[3] (°C)	Tamaño de longitud (pb)[4]
Gapdh #1	F: ACATCAAATGGGGCAACGC	XM_006210852.1	59.41°C	269pb
	R:TCCTTCCACGATGCCAAAGT		59.60°C	
Gapdh #2	F. GCCTCTAAGGAGTAAGAGT		56.63°C	111pb
	R: TGTGTTGGGGGATCGAGTTG		59.96°C	
Oct4 #1	F: TCAGGGGGACCAGTATCCTT	XM_006215309.1	59.92°C	232pb
	R: GGGTTCTCTCCCTAGCTCTC		58.30°C	
Oct4 #2	F: TTGTACCAGGGCTTTGGGAT		58.92°C	102p
	R: CCTTCCCTCCAATCAGTTAC		60°C	
Sox2 #1	F: AGAACCCCAAGATGCACAA	XM_006201067.1	60°C	154pb
	R: CGGGGCCGGTATTTATAATC		60.4°C	
Sox2 #2	F: TTTTGTCGGAGACGGAAAAG		56.3°C	119pb
	R: CATGAGCGTCTTGGTTTTCC		57.3°C	
c-Myc #1	F: CTGGAGGGAGAGAAGCACT	XM_015242508.1	59.5°C	278pb
	R: GCCTTCGCGGTATCAAACAC		59.90°C	
c-Myc #2	F: CGCACATGGATGCACTGAAG		56.9°C	218pb
	R: AGCAGACGCGTGTATGAGC		60.5°C	
Nanog #1	F: CACCAATGCCTGAGCCTTAT	XM_006218386.1	58.6°C	196pb
	R: TGCTTCTCTGTGCTGCTTTC		59.05°C	
Nanog #2	F: AAAACCACTGCCCACTTCTG		58.6°C	119pb
	R: TGTCATTGAGCACACACAGC		59°C	

1: Los cebadores de inicio directo se representan como F, mientras que los cebadores de regreso, R.

2: Identifica a los códigos de acceso de transcriptos de genes de pluripotencia.

3: Temperaturas de anillamiento de cebadores de cada gen diana brindada por el software Primer Blast.

4: Longitud del producto expresado en número de pares de bases (pb)

Cuadro 5. Oligonucleótidos empleados para la PCR en tiempo real cuantitativa de los genes diana

Genes Diana	Secuencia de Oligonucleótidos: 5' - 3'	Nº Acceso al Banco Genético	Temperatura de Anillamiento[1] (ºC)	Tamaño de longitud (pb)
Gapdh	F: GCCTCTAAGGAGTAAGAGTC R: TGTGTTGGGGGATCGAGTTG	XM_006210852.1	60ºC	111
Oct.4	F: TCAGGGGGACCAGTATCCTT R: GGGTTCTCTCCCTAGCTCTC	XM_006215309.1	60ºC	232
Sox2	F: AGAACCCCAAGATGCACAAC R: CGGGGCCGGTATTTATAATC	XM_006201067.1	60ºC	154
c-Myc	F: CTGGAGGGAGAGAAGCACTG R: GCCTTCGCGGTATCAAACAC	XM_015242508.1	60ºC	278
Nanog	F: AAAACCACTGCCCACTTCTG R: TGTCATTGAGCACACACAGC	XM_006218386.1	58ºC	119

1: Temperaturas de anillamiento ajustados para cada gen diana.

3.7.2. Extracción de ARN de Células Primarias de Placenta

A los 6 días del cultivo del pasaje 1 de células primarias de placenta, se extrajo ARN para los análisis posteriores de expresión génica, siguiendo las instrucciones del kit innuPREP (Analytik-Jena), las cuales se describen a continuación:

- Se lisó $1x10^6$ células con la solución de lisis RL, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente; a continuación se pipeteó de forma constante hasta que no quedó ningún grumo visible, luego se centrifugó a 30,000g por 1 minuto; después se vertió el contenido en un microtubo receptor con filtro spin, donde el ADN se concentró al centrifugarse a 10,000g por 2 minutos, y el sobrenadante que quedó en el microtubo mantiene aún el ARN de las células.
- El sobrenadante se mezcló con 400ul de etanol al 70% y se vertió a un nuevo microtubo receptor con filtro spin específico para ARN; el ARN se concentró después al centrifugar a 10,000g por 2 minutos.
- Se añadió 500ul de solución HS al filtro spin de ARN para lavar restos de impurezas que quedaron en el filtro, después se centrifugó a 10,000g por 1 minuto.
- Se añadió 700ul de solución LS, y después se centrifugó a 10,000g por 2 minutos para la remoción de impurezas.

- Por último, se agregó 30µl de agua libre de RNAsas incubando por 1 minuto a temperatura ambiente, después se centrifugó a 6,000g por 1 minuto, para la elución del ARN adherido al filtro spin; después se colectó el filtrado en un microtubo y se almacenó a -86ºC, para la preservación del ARN.
- Adicionalmente, se midió la pureza del ARN extraído con el sistema Nanodrop ™ One (Thermo Scientific ™) a lecturas de absorbancia de 230, 260 y 280nm.

3.7.3. Síntesis de ADN Complementario (ADNc)

Se siguió las instrucciones para la síntesis de ADNc establecidas por el fabricante del kit Onescript® (Applied Biological Materials - abm) para la preparación de reacciones de 20µl como se describe a continuación:

- En un microtubo de 0.2ml se colocaron pequeñas cantidades de reactivos recomendados según el Kit OneScript®, los cuales se incluyeron 1µl de Oligo(dt)(10uM), 1µl de dNTP Mix (10mM), 14.5µl de agua libre de nucleasas, 4µl de Buffer RT 5X, 0.5µl de inhibidor ribonucleasa (40U/µl), 1µl de transcriptasa OneScript®RTase (200U/µl) y 2µl del total de ARN extraído.
- Se centrifugó el microtubo de forma rápida para la mezcla de los reactivos añadidos y se reunió las microgotas dispersas en el microtubo por pipeteo.
- Se colocó el microtubo en el termociclador Boeco B-96G (Boeco Germany, Alemania) y se retrotranscribió en un tiempo de 56 minutos con la programación insertada en el equipo, el cual consistió en incubar el microtubo a temperaturas de 42ºC por 50 minutos y terminar la retrotranscripción a 85ºC por 5 minutos.
- Después de finalizada la retrotranscripción, el ADNc se preservó a -20ºC para el análisis de expresión génica pluripotente por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

3.7.4. Expresión Génica por PCR en Tiempo Real (qPCR)

Se evaluó la expresión génica de Gapdh como gen de referencia y los genes diana Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog a partir del ADNc sintetizado; para ello se usó el kit BrightGreen 2X qPCR MasterMix-Low ROX (Applied Biological Materials - abm), cuyo procedimiento consistió en reunir los componentes del Kit más el ADNc, para el análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, con el termociclador– STEPONE

(Applied Biosystem). Se prepararon reacciones de 20ul, cuyas cantidades recomendadas se añadieron según el protocolo que se describe a continuación (cuadro 6).

Cuadro 6. Componentes del Kit BrightGreen 2X qPCR MasterMix-Low ROX

Componentes	20ul Reacción	Concentración Final
BrightGreen 2X qPCR Master Mix	10ul	1X
Cebador de inicio directo (10uM)	0.6ul	300nM
Cebador de retorno (10uM)	0.6ul	300nM
Plantilla de ADNc	2ul	≤ 500ng/reacción
Agua libre de nucleasas	6.8ul	

3.7.5. Cuantificación Relativa

La expresión génica de Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog se midió de acuerdo al método Delta Delta Ct (Livak y Schmittgen, 2001), determinando el número de veces que se expresan los genes diana con sus respectivos calibradores. Para ello, se aplicó la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Donde:

ΔCt = Ct (gen diana) – Ct (gen de referencia)

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct$ (calibrador)

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Cantidad relativa del gen diana con respecto al calibrador

Para el presente estudio, los valores Ct (ciclo umbral) de cada gen calibrador provino de células primarias de placenta de alpaca obtenidas por el método explante, para determinar el incremento de expresión de los genes diana.

3.7.6. Análisis Estadístico

Los resultados de la expresión génica de factores de transcripción de pluripotencia Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog, fueron expresados en base a la media aritmética y desviación estándar del ciclo de umbral (Ct) y temperatura de disociación (Tm).

IV. RESULTADOS

4.1. Rendimiento de Aislamiento Celular

La disgregación tisular de 10gr de placenta alpaca de último tercio de gestación muestra que la colagenasa tipo IA al 0.05% disuelve mejor la placenta que la tripsina al 0.05%, obteniéndose mayor cantidad de pellet celular en los 25 pellets obtenidos tras la colagenización (Figura 7).

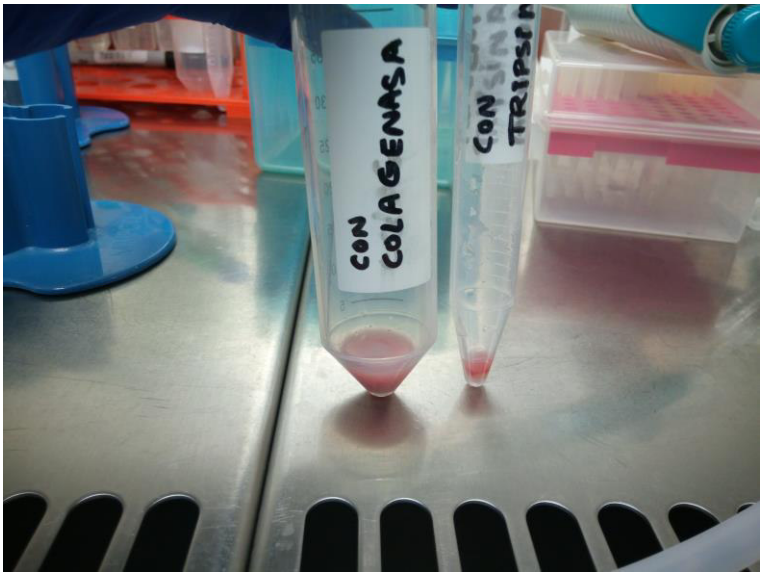


Figura 7. Pellet celular obtenida con colagenasa clostridial y tripsina.

El promedio del recuento de células nucleadas obtenidas en las 25 muestras usando colagenasa fue de $6.37\pm1.75x10^6$ de células vivas y $48.7\pm7.55x10^5$ de células muertas; en cambio, empleando tripsina se obtuvo un promedio de $5.12\pm1.97x10^5$ de células vivas y $7.93\pm2.52x10^6$ de células muertas; en cambio mediante explante se obtuvo $10\pm3.35x10^4$ de células vivas y $10\pm2.61x10^4$ de células muertas (Cuadro A.1).

La comparación del recuento de células vivas obtenidas empleando colagenasa y tripsina se analizaron por T-Student pareado, mientras que la comparación del explante con cada prueba enzimática se realizó mediante la prueba U de Mann Whitney. En todos los casos se determinó diferencias estadísticas a un intervalo de confianza del 99.9% ($p< 0.001$) (Figura 8).

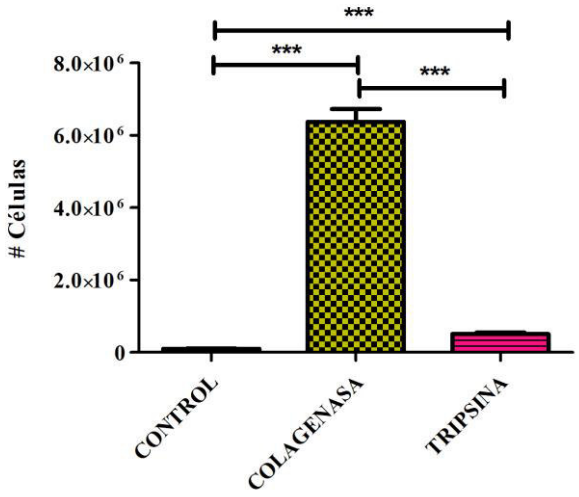


Figura 8. Número de células vivas obtenidas según enzima utilizada para disgregación tisular.
*** p<0.001. U de Mann-Whitney y T-student pareado.

La comparación del recuento de células muertas, se analizaron entre ambos grupos empleando la prueba T-Student pareado los métodos de colagenasa y tripsina, mientras que la comparación del método de explante con cada prueba enzimática se realizó mediante la prueba U de Mann Whitney. En todos los casos se determinó diferencias estadísticas a un intervalo de confianza del 99.9% (p< 0.001) (Figura 9).

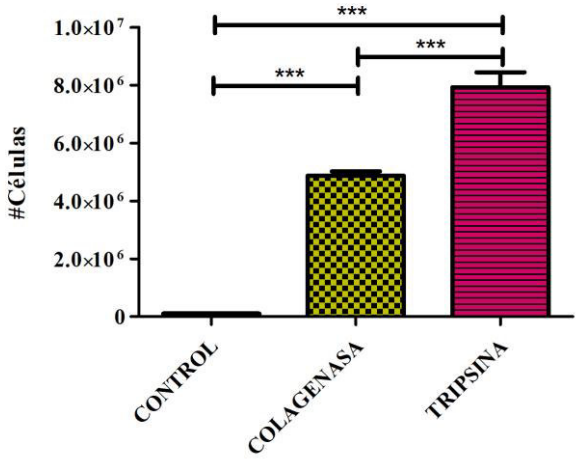


Figura 9. Número de células muertas según agente enzimático utilizado para disgregación tisular
*** p<0.001. U de Mann-Whitney y T-student pareado.

4.2. Evaluación Morfométrica

Las células primarias obtenidas por explante y mediante colagenasa lograron subsistir al cultivo primario, mientras que las células obtenidas mediante tripsina no lograron sobrevivir al cultivo.

Las células obtenidas por explante y colagenasa desarrollaron colonias con morfología fusiforme (Figura 10Ay 10B), notando mayor población fusiforme en los pasajes 0 hasta el pasaje 1 (Figura 10C y 10D).

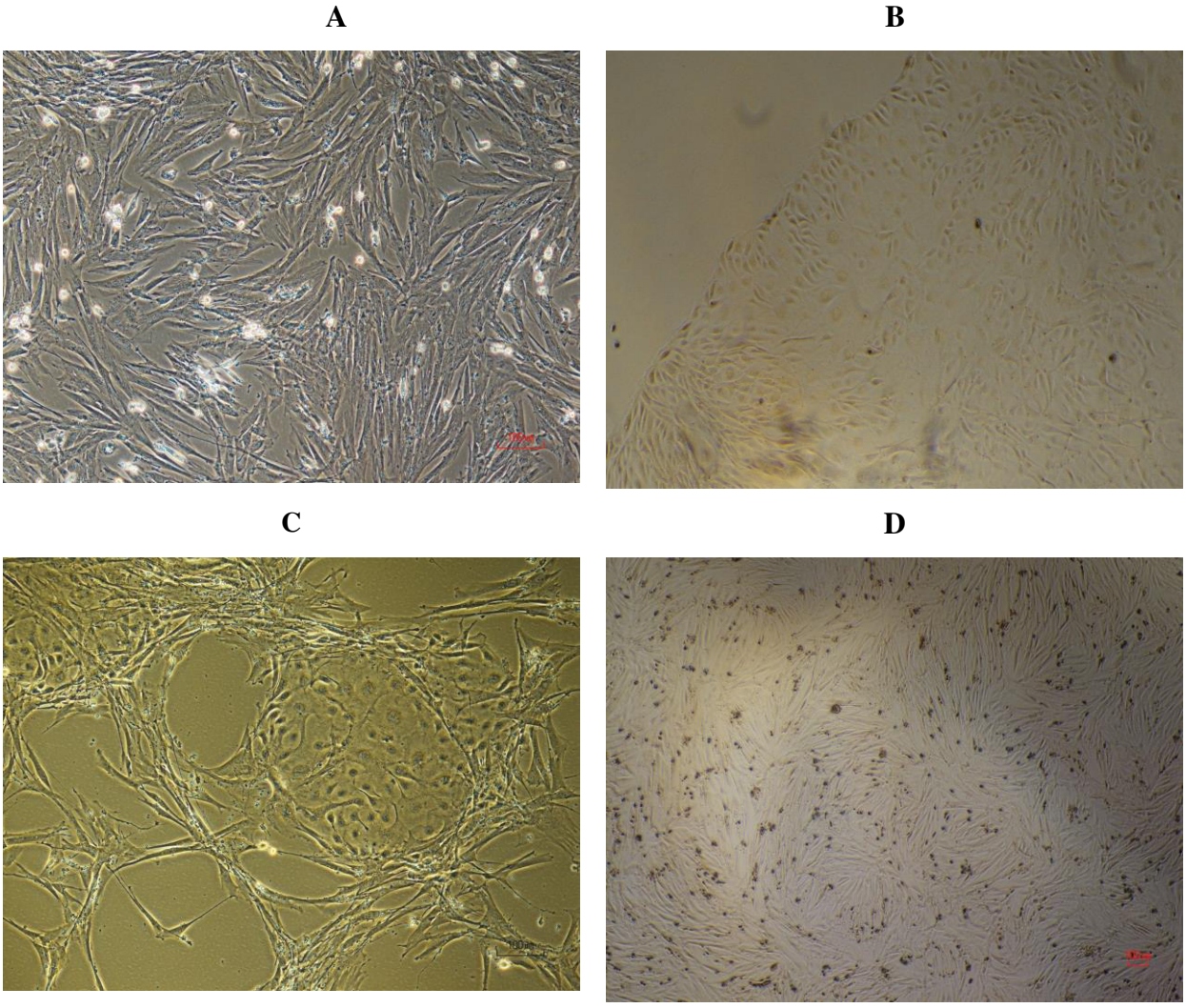


Figura 10. Microfotografía de células primarias de placenta de alpaca en cultivo primario.
A. Predominio de células fusiformes obtenidas por explante, con una confluencia del 100%, 10X; **B.** Moderada cantidad de células fusiformes obtenidas por explante, 4X; **C.** Células fusiformes rodeando células de diferente linaje, obtenidas mediante colagenasa, 10X; **D.** Confluencia del 90% de células fusiformes obtenidas mediante colagenasa, 4X.

Se tomaron microfotografías en cada pasaje y se evaluó la morfometría de las células fusiformes en longitud y ancho.

Las células obtenidas por explante tenían una longitud entre 89-205µm en el pasaje 0 (Cuadro A.4), mientras que las células obtenidas mediante colagenasa tenían una longitud de 60-280µm (Cuadro A.5). Mientras que en el pasaje 1 las células incrementaron su longitud en 82% las de explante y 112% las obtenidas por colagenasa.

Mientras que el ancho de las células de explante fue de 14-44µm y las obtenidas por colagenasa midieron 20-45µm en el pasaje 0, aumentando de ancho en el pasaje 1 hasta 63% las de explante y 25% las de colagenasa. Estos resultados en longitud y ancho de las células estudiadas no presentan diferencias significativas (Figura 11).

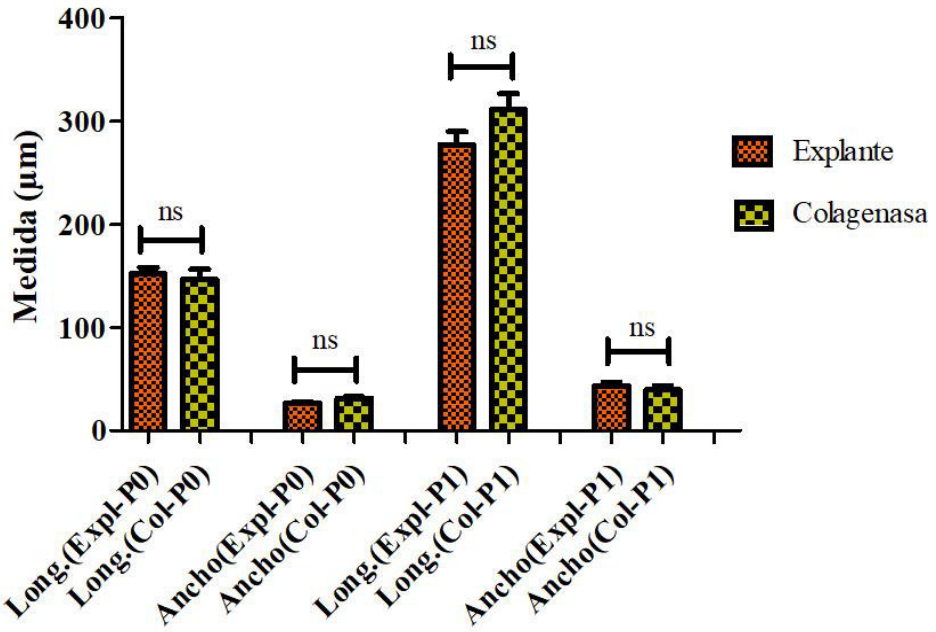


Figura 11. Longitud (Long.) y ancho de células obtenidas por explante y mediante colagenasa

4.3. Cinética de Crecimiento

Los aislados primarios del pasaje 1 mediante colagenasa alcanzaron 80-90% de confluencia entre 4-6 días mientras que los aislados por explante lo hicieron en 2-3 semanas.

A las 144hrs de cultivo en pasaje 1, ocurre 2 duplicaciones poblacionales, con tiempos determinados a las 65.20hrs y a las 127.33hrs, con cálculo promedio de 60.26 ± 4.94hrs en células del método colagenasa, similar aproximación presentó también las células del método explante con 66.82hrs y 138.67hrs, con cálculo promedio de 66.75hrs ± 0.08hrs.

La comparación de la velocidad en crecimiento de las células primarias entre la obtención por colagenasa y por tienen diferencias significativas a las 48 y 72hrs con un intervalo de confianza de 95% ($p<0.05$), por el análisis U de Mann Whitney, no siendo significante en las demás horas determinadas del recuento (Figura 15).

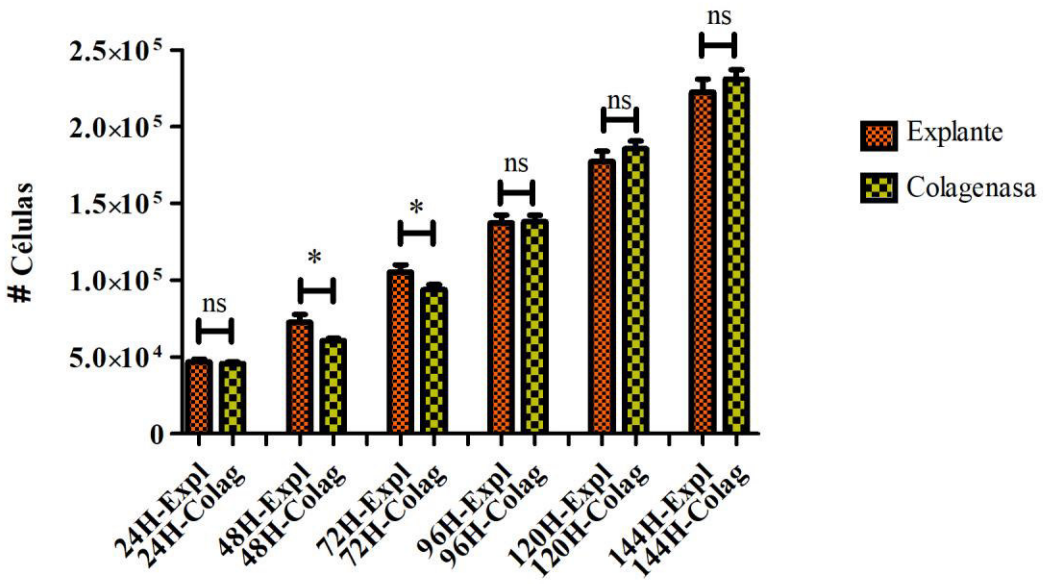


Figura 12. Cinética de crecimiento de células primarias obtenidas por explante y colagenasa en pasaje 1

Diferencia significativa a las 48hrs y 72hrs.*$p<0.05$. U de Mann-Whitney.

Los niveles de doblajes poblacionales acumulativos en células obtenidas por explante y mediante Colagenasa fueron 2.15 y 2.21 respectivamente (Figura 16).

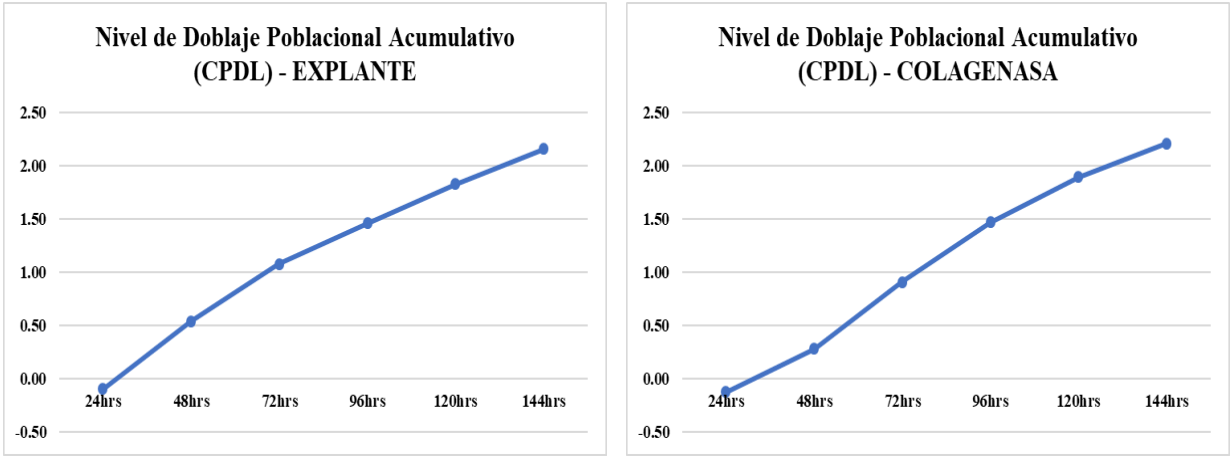


Figura 13. Nivel de doblaje poblacional acumulativo en células del método explante (control) y método colagenasa

4.4. Expresión Génica de Oct4, Sox-2, c-Myc y Nanog:

La cantidad de ARN extraído en las 25 muestras celulares obtenidas por el método de colagenasa clostridial, mostró radios de absorbancia de 2.02 a 2.12 (260/280), y 1.81 a 2.0 (260/230).

Los valores promedio de curvas de amplificación de los genes Gapdh, Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog fueron 15.30, 30.79, 32.24, 25.46 y 21.72 respectivamente, mientras que los valores de temperatura de disociación mostraron promedios de 86.61ºC, 84.68ºC, 85.92ºC, 90.03ºC y 84.54ºC respectivamente (Cuadro A.14).

Los valores promedio de expresión relativa calculados para Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog fueron 5.97, 1.76, 0.71 y 81.68 respectivamente (Figura 18).

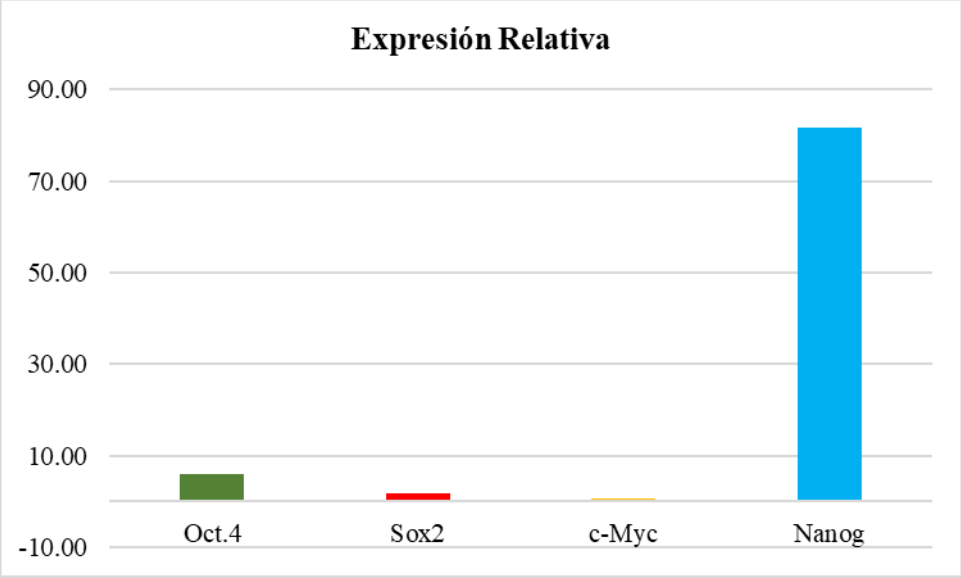


Figura 14. Niveles de expresión relativa de Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog

V. DISCUSIÓN

En este trabajo la digestión de la placenta de alpaca empleando colagenasa tipo IA al 0.05% produjo un mayor rendimiento en cuanto a población de células nucleadas que la tripsina al 0.05%, en tanto que la tripsina produjo un mayor porcentaje de células muertas, estos resultados serían coincidentes con otro trabajo que demostró que la tripsina altera la integridad de las células madre de tipo muscular al dañar las proteínas de superficie de la membrana celular (Danoviz, y Yablonka-Reuveni, 2012), además para disociación de tejidos primarios como la placenta de alpaca no fue tan efectivo para disociar proteínas de la matriz extracelular como lo realizó la colagenasa clostridial para la liberación de células, a pesar que la tripsina evidenció efectividad de aislamiento en placenta fetal de humano (Beeravolu *et al.*, 2017), placenta de búfalo (Dev *et al.*, 2012), placenta de bovino (Peng *et al.*, 2017) y músculo bovino (Miersch *et al.,* 2018).

En los cultivos primarios obtenidos, se observaron diferentes fenotipos celulares, entre epiteliales y fusiformes, la histología placentaria consta principalmente de esos fenotipos (Olivera *et al*., 2003); en el cultivo primario se adhirieron las células de forma epitelial como las células fusiformes de diferentes fuentes; las células epiteliales provendrían del trofoblasto, útero, endotelios capilares maternales y fetales, y amnios; mientras que los de tipo fusiforme provendrían mayormente del estroma placentario, y que clásicamente se relacionarían más a los fibroblastos (Virchow *et al*., 1858).

Por otra parte, las células primarias adheridas en los primeros días de cultivo evidenciaron mayor predominancia proliferativa de células fusiformes a comparación de las células epiteliales, que crecían en forma de pequeñas colonias rodeados de células fusiformes; evento de cultivo que se asemeja a lo descrito por otros autores que realizaron con el desarrollo de líneas de células comerciales para diagnóstico e investigación científica (Mather y Roberts, 1998; Owen *et al*., 2016). Además, la disminución de la población celular epitelial obtenida por colagenización, disminuyó aún más en el primer subcultivo por el proceso de pasaje celular con tripsina; evento que también se describe por otros autores en subcultivos de células mamíferas por tripsinización (Huang *et al*., 2010).

Las dimensiones del tamaño celular en células fusiformes variaron significativamente entre el pasaje 0 y 1, elongándose hasta en un 82%¸este evento es atribuido al fenómeno de envejecimiento celular (Shall, 1996 y Echave *et al*. 2007), pudiendo elongarse hasta un 500% de su longitud inicial; además, la forma de cultivo tradicional normóxico, también suma el estrés celular conllevándolo a la senescencia, disminuyendo así las potencialidades de proliferación y expresión génica de pluripotencia que también ocurren con células madre de anexos fetales de caprino (Somal *et al.,* 2016). El cultivo *in vitro* con baja presión de oxígeno, ayudaría en mantener las propiedades funcionales de las células madre como podría también ocurrir con las células primarias (Kwon *et al*., 2017; Yazdani, 2016).

La elongación celular ocurrida en células primarias de placenta de alpaca, también ocurre con células madre de médula ósea felina y con células madre adiposas de felino, que cultivadas bajo condiciones de normoxia, también incrementan su longitud y ancho celular pero en menores proporciones (Maciel *et al*., 2014; Nissar *et al.,* 2018); el evento de mayor elongación de las células primarias de placenta de alpaca podría explicarse también a la resistencia de mantener las propiedades funcionales según la especie, origen tisular, interacción con el medio de cultivo y tiempo de aislamiento celular.

Otros autores señalan que los cultivos 2D carecen de acondicionamiento físico ideal para el cultivo celular, pudiendo alterar el citoesqueleto y núcleo modificando la expresión de genes y proteínas (McKee y Chaudhry, 2017), que puede inducir el envejecimiento o la alteración epigenética (Kapałczyńska *et al*., 2016).

Los niveles de doblaje poblacional acumulativo de las células de placenta del método explante y colagenasa fueron similares, con ligera superioridad en células obtenidas por colagenasa; estos niveles calculados comparados con otros trabajos desarrollados en diferentes especies animales (cuadro 1), guardan cercanías similares a los niveles de doblaje de las células de placenta humana, células amnióticas de equino y células amnióticas de caprino (Coli *et al.*, 2011; Li *et al*., 2014; Somal *et al.*, 2016).

La cinética de proliferación comparativa en células primarias obtenidas por explante mostraron altos crecimientos de proliferación significativa a las 48 y 72hrs de cultivo que en células obtenidas por colagenasa, esos incrementos poblacionales se puede

relacionar debido a que las células primarias de placenta que provenían por explante podrían haber conservado mayor concentración de factores de crecimiento del tejido placentario a comparación de las células obtenidas por digestión enzimática en el que se pierden los factores de crecimiento (Yoon *et al.*, 2013; Zhou et al., 2013); este evento de alta proliferación se contrasta también con la cinética de crecimiento de células madre mesenquimales de médula ósea de rata en los primeros pasajes evaluados (Ridzuan *et al.*, 2016).

Los cultivos primarios realizados en el presente trabajo se procesaron aproximadamente a las 22hrs de su colecta, el cual existe la posibilidad que tanto la viabilidad celular por digestión enzimática, como el nivel de proliferación celular *in vitro* pudieron verse afectados por el tiempo en que se transporta la muestra hasta que sea procesado en laboratorio; ya que algunos autores mencionan que mientras la técnica de aislamiento celular se efectúe lo más pronto posible en el tejido diana, el rendimiento de aislamiento celular viable será mayor y no presentarían alteraciones o cambios de expresión génica en las células diana (Grizzle *et al*., 2010).

Como es el primer reporte en la expresión de factores de transcripción de pluripotencia en células primarias de placenta de alpaca, se procede a comparar los resultados hallados con camélidos similares y con especies domésticas analizadas por diversos autores. El nivel de expresión del gen Oct4 hallados en el presente estudio demuestra superioridad a los valores presentados por I. M. Saadeldin *et al*. (2017), que evalúa en células embrionarias y del trofectodermo de camello a muy bajos niveles, cuya implicancia se debería al incremento de expresión del gen Cdx2 que suprimiría al gen Oct4 en las células embrionarias. La expresión de Sox2 muestra similaridad resultado con las células embrionarias de camello, pero inferior a las células de trofoblasto; de la misma manera ocurre con el gen c-Myc que muestra inferioridad con ambas líneas celulares. El bajo nivel de expresión de Sox2 en el estudio, puede relacionarse al cultivo predominante de células de tipo fusiforme que las del tipo epitelial, resultado que se contrasta con las células epiteliales de origen ectodérmico y endodérmico analizados por Arnold *et al*. (2011), que muestran expresión de Sox2 en ciertas poblaciones de células madre.

Otros autores también determinaron positividad de factores de transcripción de pluripotencia de Oct4, Sox2, Nanog y c-Myc en los diferentes anexos fetales de distintas

especies domésticas como el caprino, ovino, bovino, equino y canino (Somal *et al.*, 2016); identificaron diferencias en niveles de expresión de los factores de transcripción en células madre mesenquimales derivadas de los diferentes anexos fetales del caprino en pasaje 3, mostrando mayor expresión en los factores Oct4 y Nanog a comparación de los factores Sox2 y c-Myc (Somal *et al.*, 2016), evento también ocurrido en las células primarias de placenta de alpaca en pasaje 1.

El factor de transcripción c-Myc generalmente fue muy relacionada a los procesos de formación tumoral (Gabay et al., 2014), sin embargo, su función normal en células en desarrollo participa en los procesos de proliferación celular, diferenciación a linajes, apoptosis y progresión del ciclo celular (Melnik *et al.*, 2019); los resultados hallados en las células primarias de placenta de alpaca al pasaje 1, mostraron bajos niveles de expresión relativa de c-Myc, y también bajo nivel de proliferación celular con respecto a su cultivo inicial; Somal et al. (2016), también halla bajos niveles de c-Myc en células derivadas de anexos fetales del caprino en pasaje 3. La baja expresión de c-Myc, también puede deberse a la señalización de estrés celular por las condiciones microambientales en que se cultivaron (Huang, 2004; Amiri *et al.,* 2015).

Por otro lado, los niveles de expresión de Nanog, en el estudio, fueron muy superiores con respecto a los demás genes diana, el único gen de pluripotencia que al parecer trata de mantener la capacidad proliferativa de las células, a pesar de que los niveles de Oct4, Sox2 y c-Myc son muy inferiores. Pierantozzi *et al*. (2011), resalta la habilidad de Nanog de manifestarse en condiciones de crecimiento *in vitro* a comparación del reciente aislamiento de células madre.

VI. CONCLUSIONES

- La enzima colagenasa clostridial al 0.05% permite obtener $6.37x10^5$ células nucleadas/gr de placenta de alpaca, mientras que la tripsina permite obtener $5.12x10^4$ células nucleadas/gr.

- Las células fusiformes obtenidas en este trabajo por explante o con colagenasa muestran signos de envejecimiento al pasaje 1.

- Según el protocolo usado en este trabajo, las células fusiformes del pasaje 1 aisladas de la placenta de alpaca mediante colagenasa, tienen mayor expresión relativa del gen Nanog que los genes Oct4, Sox2 y c-Myc

VII. SUGERENCIAS

- Probar diferentes tipos de colagenasas comerciales para evaluar rendimientos celulares en placenta de alpaca.

- Buscar el medio óptimo para mantenimiento y crecimiento de las células primarias de placenta son suplementos de suero fetal de alpaca, lisado plaquetario, hormonas y factores de crecimiento y evaluar la potencialidad proliferativa y expresión de factores transcripción pluripotentes en las células primarias de placenta de alpaca.

- Se sugiere subcultivar las células primarias de placenta a una densidad mayor a 5,000 células/cm^2 para conservar la capacidad proliferativa de las células primarias de placenta.

- Probar la marcación por citometría de flujo de células madre de placenta de alpaca con anticuerpos monoclonales de uso humano, murino, equino o porcino para comprobar reactividad cruzada.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ***Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. 2010.*** Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. J R Soc, Interface 7 Suppl 6(Suppl 6), S689-S706. doi:10.1098/rsif.2010.0347.focus
2. ***Abo-Aziza FAM, Zaki AA. 2017.*** The impact of confluence on bone marrow mesenchymal stem (BMMSC) proliferation and osteogenic differentiation. In J Hematol Oncol Stem Cell Res 11(2), 121-132.
3. ***Abumaree MH, Abomaray FM, Alshabibi MA, AlAskar AS, Kalionis B. 2017.*** Immunomodulatory properties of human placental mesenchymal stem/stromal cells. Placenta, 59, 87-95. doi: 10.1016/j.placenta.2017.04.003.
4. ***Adolphe M, Thenet-Gauci S, Demignot S. 1997.*** Chondrocyte Culture: A target system to evaluate: Pharmacotoxicological effects of drugs. In J. V. Castell & M. J. Gómez-Lechón (Eds.), *In Vitro* Methods in Pharmaceutical Research (pp. 181-207). San Diego: Academic Press.
5. ***Amiri F, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. 2015.*** In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments. Cell Stress Chaperones. 20(2), 237-251. doi.org/10.1007/s12192-014-0560-1.
6. ***Annaratone L, Marchiò C, Russo R, Ciardo L, Rondon-Lagos SM, et al. 2013.*** A Collection of primary tissue cultures of tumors from vacuum packed and cooled surgical specimens: A feasibility study. Plos One, 8(9), e75193. doi.org/10.1371/journal.pone.0075193.
7. ***Antoniadou E, David AL. 2016.*** Placental stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 31, 13-29. doi:10.1016/j.bpobgyn.2015.08.014.
8. ***Araujo AB, Furlan JM, Salton GD, Schmalfuss T, Rohsig LM, Silla LMR, et al. 2018.*** Isolation of human mesenchymal stem cells from amnion, chorion, placental decidua and umbilical cord: comparison of four enzymatic protocols. Biotechnol Lett, 40(6), 989-998. doi:10.1007/s10529-018-2546-z.
9. ***Arbabi-Ghahroudi M. 2017.*** Camelid single-domain antibodies: Historical perspective and future outlook. Front Immunol, 8, 1589-1589. doi: 10.3389/fimmu.2017.01589.
10. ***Arnold K, Sarkar A, Yram MA, Polo JM, Bronson R, Sengupta S, et al. 2011.*** Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. Cell Stem Cell, 9(4), 317-329. doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.001.
11. ***Vaught JB, Henderson MK. 2012.*** Biological sample collection, processing, storage and information management. IARC Sci Publ, (163), 23-42.
12. ***Bai R, Sen A, Yu Z, Yang G, Wang H, Fan R, et al. 2010.*** Validation of methods for isolation and culture of alpaca melanocytes: A novel tool for in vitro studies of mechanisms controlling coat color. Asian-Australas J Anim Sci, 23(4), 430-436. doi.org/10.5713/ajas.2010.90465.
13. ***Barboni B, Russo V, Berardinelli P, Mauro A, Valbonetti L, Sanyal H, et al. 2018.*** Placental stem cells from domestic animals: Translational potential and clinical relevance. Cell Transplant, 27(1), 93-116. doi.org/10.1177/0963689717724797.
14. ***Barreto RS, Bressan FF, Oliveira LJ, Pereira FT, Perecin F, Ambrosio CE, et al. 2011.*** Gene expression in placentation of farm animals: an overview of gene function during development. Theriogenology, 76(4), 589-597. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.001.

15. ***Barrios-Arpi L, Rodríguez-Gutiérrez J, Lopez-Torres B. 2017.*** Histological characterization of umbilical cord in alpaca (*Vicugna pacos*). Anat Histol Embryol 46(6):533-538. doi.org/10.1111/ahe.12298.
16. ***Bavle RM. 2014.*** Mitosis at a glance. JOMFP, 18(Suppl 1), S2-S5. doi.org/10.4103/0973-029X.141175.
17. ***Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikhael S, Brown C, Perez-Cruet M, et al. 2017.*** Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. JoVE (122), 55224. doi.org/10.3791/55224.
18. ***Benaissa M, Faye B, Youngs C, Kaidi R. 2016.*** Slaughterhouse survey of culled female camels (*Camelus dromedarius*) in southeast Algeria: Fetal wastage and pregnancy characteristics. Em J Food Agr, 28(11). doi.org/10.9755/ejfa.2016-06-735.
19. ***Benyumovich MS. 1966.*** Determination of the time of population doubling in monolayer cultures. Bull Exp Biol Med, 62(1), 840-843. doi.org/10.1007/BF00805288.
20. ***Bertuzzi F, Cainarca S, Marzorati S, Bachi A, Antonioli B, Nano R, et al. 2009.*** Collagenase isoforms for pancreas disgestion. Cell Traspl, 18(2), 203-206. doi. 10.3727/096368909788341270.
21. ***Brasko C, Smith K, Molnar C, Farago N, Hegedus L, Balind A, et al. 2018.*** Intelligent image-based in situ single-cell isolation. Nature Communications, 9(1), 226. doi.org/10.1038/s41467-017-02628-4.
22. ***Burton GJ, Fowden AL. 2015.*** The placenta: a multifaceted, transient organ. Phil Trans R Soc B 370: 20140066. doi.org/10.1098/rstb.2014.0066.
23. ***Buttery LDK, Bishop AE. 2005.*** Introduction to tissue engineering. In L. L. Hench & J. R. Jones (Eds.), Biomater Artif Organs Tissue Eng. 193-200. doi.org/10.1533/9781845690861.4.193.
24. ***Cadena-Herrera D, Esparza-De Lara, JE, Ramírez-Ibañez ND, López-Morales CA, Pérez NO, Flores-Ortiz LF, et al. 2015.*** Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated. Biotech Reports, 7, 9-16. doi.org/10.1016/j.btre.2015.04.004.
25. ***Camacho-Fernández C, Hervás D, Rivas-Sendra A, Marín MP, Seguí-Simarro JM. 2018.*** Comparison of six different methods to calculate cell densities. Plant methods, 14, 30-30. doi.org/10.1186/s13007-018-0297-4.
26. ***Carter A, Enders A. 2013.*** The evolution of epitheliochorial placentation. Annu Rev Anim Biosci 1, 443-467. doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103653.
27. ***Caruso M, Evangelista M, Parolini O. 2012***. Human term placental cells: phenotype, properties and new avenues in regenerative medicine. Int J Mol Cell Med 1(2), 64-74.
28. ***Celikkan F, Mungan C, Sucu M, Ulus A, Cinar O, Ili EG, et al. 2019.*** Optimizing the transport and storage conditions of current Good Manufacturing Practice -grade human umbilical cord mesenchymal stromal cells for transplantation (HUC-HEART Trial). Cytotherapy, 21(1), 64-75. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.10.010.
29. ***Chen J, Lu Z, Cheng D, Peng S, Wang H. 2011.*** Isolation and Characterization of Porcine Amniotic Fluid-Derived Multipotent Stem Cells. Plos One, 6(5), e19964. doi.org/10.1371/journal.pone.0019964.
30. ***Choi YS, Park YB, Ha CW, Kim JA, Heo JC, Han WJ, et al. 2017.*** Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. Plos One, 12(2), e0172642. doi.org/10.1371/journal.pone.0172642.

31. ***Chung MT, Zimmermann AS, Paik KJ, Morrison SD, Hyun JS, Lo DD, et al. 2013.*** Isolation of human adipose-derived stromal cells using laser-assisted liposuction and their therapeutic potential in regenerative medicine. Stem Cells Trans Med, 2(10), 808-817. doi.org/10.5966/sctm.2012-0183.

32. ***Clevenger R, Bernal J, Talcott M, Gleason T, Rindfield T, Hoyt R. (2018).*** Management of animal care and use programs in research, education, and testing. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. ISSN: 9781498748445 1498748449.
33. ***Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, et al. 2007.*** Guidance on good cell culture practice. In book: Cell Tech Cell Prod (Vol. 33, pp. 313-315).
34. **Coli, A., Nocchi, F., Lamanna, R., Iorio, M., Lapi, S., Urciuoli, P., *et al*. 2011.** Isolation and characterization of equine amnion mesenchymal stem cells. Cell Biol Int Rep, 18(1), e00011-e00011. doi.org/10.1042/CBR20110004.

35. ***Cunningham RE. 2010.*** Tissue disaggregation. Methods Mol Biol, 588, 327-330. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0_32.
36. ***Dalton S, Coverdell P. 2015.*** Linking the cell cycle to cell fate decisions. Trend Cell Biol 25(10), 592-600. doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.007.

37. ***Danoviz ME, Yablonka-Reuveni Z. 2012.*** Skeletal muscle satellite cells: background and methods for isolation and analysis in a primary culture system. Methods Mol Biol, 798, 21-52. doi.org/10.1007/978-1-61779-343-1_2.
38. ***Dehkordi MB, Madjd Z, Chaleshtori MH, Meshkani R, Nikfarjam L, Kajbafzadeh AM. 2016.*** A simple, rapid, and efficient method for isolating mesenchymal stem cells from the entire umbilical cord. Cell Transplant, 25(7), 1287-1297. doi: 10.3727/096368915X582769.
39. ***Dev K, Giri SK, Kumar A, Yadav A, Singh B, Gautam SK. 2012***. Expression of transcriptional factor genes (Oct-4, Nanog, and Sox-2) and embryonic stem cell-like characters in placental membrane of Buffalo (*Bubalus bubalis*). J Membr Biol, 245(4), 177-183. doi.org/10.1007/s00232-012-9427-5.
40. ***Dockery GD. 2012***. Aseptic techniques. In G. D. Dockery & M. E. Crawford (Eds.), Lower Extremity Soft Tissue & Cutaneous Plastic Surgery (Second Edition) (pp. 53-68). Oxford: W.B. Saunders.
41. ***Dresner E, Schubert M. 1955.*** The comparative susceptibility to collagenase and trypsin of collagen, soluble collagens and renal basement membrane. J Hist Cyto, 3(5), 360-368. doi.org/10.1177/3.5.360.
42. ***Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro, et al. 2017.*** Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. Physiology (Bethesda, Md.), 32(4), 266-277. doi.org/10.1152/physiol.00036.2016.

43. ***Echave P, Conlon IJ, Lloyd AC. 2007.*** Cell size regulation in mammalian cells. Cell Cycle, 6(2), 218-224. doi: 10.4161/cc.6.2.3744.
44. ***Eisa EI. 2008.*** Foetal membranes and placenta of the dromedary camel. Morphology and histochemistry. Thesis Ph Degree. Khartoum State. University of Khartoum. 291p.
45. ***Enciso-Benavides N, Enciso-Benavides J, Enciso J, Tejero C. 2017.*** Characterization of alpaca (*Vicugna pacos*) adipose derived mesenchymal stem cell population. J Tissue Sci Eng, 8: 4 (Suppl). doi: 10.4172/2157-7552-C1-040.
46. ***Ethier SP, Kudla A, Cundiff KC. 1987.*** Influence of hormone and growth factor interactions on the proliferative potential of normal rat mammary epithelial cells in vitro. J Cell Phys 132(1), 161-167. doi:10.1002/jcp.1041320123.

47. ***Fan ZX, Lu Y, Deng L, Li XQ, Zhi W, Li-Ling J, et al. 2012.*** Placenta- versus bone-marrow-derived mesenchymal cells for the repair of segmental bone defects in a rabbit model. The FEBS Journal, 279(13), 2455-2465. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08625.x.
48. ***Fayemi PO, Muchenje V. 2013.*** Maternal slaughter at abattoirs: history, causes, cases and the meat industry. SpringerPlus, 2(1), 125-125. doi.org/10.1186/2193-1801-2-125.
49. ***Feng X, Liu L, Yu BQ, Huang JM, Gu LD, Xu DF. 2018.*** Effect of optimized collagenase digestion on isolated and cultured nucleus pulposus cells in degenerated intervertebral discs. Medicine, 97(44), e12977. doi.org/10.1097/MD.0000000000014142.
50. ***Fowler ME, Olander HJ. 1990.*** Fetal membranes and ancillary structures of llamas (*Lama glama*). Am J Vet Res, 51(9), 1495-1500.
51. ***Franceschi V, Jacca S, Sassu EL, Stellari FF, van-Santen VL, Donofrio G. 2014.*** Generation and characterization of the first immortalized alpaca cell line suitable for diagnostic and immunization studies. Plos One 9(8), e105643. doi.org/10.1371/journal.pone.0105643.
52. ***Freshney R. 2010.*** Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications, Sixth Edition (Vol. 346). doi:10.1002/9780470649367.
53. ***Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. 2014.*** A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. J Toxicol Pathol *27*(1), 11–18. doi.org/10.1293/tox.2013-0060.
54. ***Gabay M, Li Y, Felsher DW. 2014.*** Myc activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. Cold Spring Harb Perspect Med ;4(6). pii: a014241. doi.org/10.1101/cshperspect.a014241.
55. ***Gazitua FJ, Corradini P, Ferrando G, Raggi LA, Parraguez VH. 2001.*** Prediction of gestational age by ultrasonic fetometry in llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Lama pacos*). Anim Reprod Sci, 66(1-2), 81-92. doi: 10.1016/s0378-4320(01)00083-5.
56. ***Gibson-D'ambrosio RE, Samuel M, D'Ambrosio SM. 1986.*** A method for isolating large numbers of viable disaggregated cells from various human tissues for cell culture establishment. In Vitro Cell Dev Biol 22(9), 529-534. doi.org/10.1007/BF02621139.
57. ***Gilbert T, Sellaro T, Badylak S. 2006.*** Decellularization of tissues and organs. Biomaterials, 27(19), 3675-3683. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
58. ***Gómez-de-Vírgala, A. 2019.*** Comparativa de cultivos en 2D versus 3D como modelo de ensayo para fases preclínicas del desarrollo de fármacos anti-tumorales y su aplicación al cribado de alto rendimiento de una librería de compuestos comerciales. Trabajo de Maestría. La Coruña. Universidad de Coruña. 46p.
59. ***Greenwood SK, Hill RB, Sun JT, Armstrong MJ, Johnson TE, Gara JP, et al. 2004.*** Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. Environ Mol Mutagen, 43(1), 36-44. doi: 10.1002/em.10207.
60. ***Grizzle WE, Bell WC, Sexton KC. 2010.*** Issues in collecting, processing and storing human tissues and associated information to support biomedical research. Cancer biomarkers : section A of Disease markers, 9(1-6), 531-549. doi: 10.3233/CBM-2011-0183.
61. ***Gupta SC, Gupta N, Ahlawat SPS, Kumar A, Taneja R, Sharma R, et al. 2005.*** In vitro culture of skin fibroblast cells for potential cloning by nuclear transfer. In: Makkar H.P., Viljoen G.J. (eds) Applications of Gene-Based Technologies for

Improving Animal Production and Health in Developing Countries. Springer, Dordrecht. doi.org/10.1007/1-4020-3312-5_47.
62. ***Hendijani F. 2017.*** Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. Cell Prolif, 50(2). doi: 10.1111/cpr.12334.
63. ***Hill ABT, Bressan FF, Murphy BD, Garcia JM. 2019.*** Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. Stem cell Res Ther, 10(1), 44-44. doi.org/10.1186/s13287-019-1145-9.
64. ***Ho SS, Hung BP, Heyrani N, Lee MA, Leach JK. 2018.*** Hypoxic preconditioning of mesenchymal stem cells with subsequent spheroid formation accelerates repair of segmental bone defects. Stem Cells, 36(9), 1393-1403. doi:10.1002/stem.2853.
65. ***Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, et al. 2010.*** Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J biomed sci*, *17*(1), 36. doi.org/10.1186/1423-0127-17-36.
66. ***Huang Z. 2004.*** Stress signaling and Myc downregulation: implications for cancer. Cell Cycle, 3(5), 593-596. doi.org/10.4161/cc.3.5.863.
67. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012.** IV Censo Nacional Agropecuario 2012. (CENAGRO, 2012). Lima: Resultados Preliminares. 91pp.
68. ***Iturrizaga DM, Verechia FT, Santos TC, Bombonato PP, Teixeira DG, Miglino MA. 2007.*** The materno-fetal interface in llama (*Lama guanicoe glama*). Pesq Veter Bras, 27, 221-228. doi.org/10.1590/S0100-736X2007000600001.
69. ***Jaatinen T, Laine J. 2007.*** Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. Curr Protoc Stem Cell Biol, Chapter 2, Unit 2A.1.
70. ***Januszyk M, Rennert RC, Sorkin M, Maan ZN, Wong LK, Whittam A, et al. 2015.*** Evaluating the effect of cell culture on gene expression in primary tissue samples using microfluidic-based single cell transcriptional analysis. Microarrays, *4*(4), 540–550. doi.org/10.3390/microarrays4040540.
71. ***Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2016.*** 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. Arch Med Sci, 14(4), 910-919. doi.org/10.5114/aoms.2016.63743.
72. ***Kaphalia BS. 2014.*** Chapter 16 - Biomarkers of acute and chronic pancreatitis. In R. C. Gupta (Ed.), Biomarkers in Toxicology (pp. 279-289). Boston: Academic Press.
73. ***Keramari M, Razavi J, Ingman KA, Patsch C, Edenhofer F, Ward C, et al. (2010).*** Sox2 Is Essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo. Plos One, 5(11), e13952. doi: 10.1371/journal.pone.0013952.
74. ***Kim DS, Lee MW, Lee TH, Sung KW, Koo HH, Yoo KH. 2017.*** Cell culture density affects the stemness gene expression of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Biomed Rep, 6(3), 300-306. doi.org/10.3892/br.2017.845.
75. ***Kinzer M, Hingerl K, Konig J, Reinisch A, Strunk D, Huppertz B, et al. 2014.*** Mesenchymal stromal cells from the human placenta promote neovascularization in a mouse model in vivo. Placenta, 35(7), 517-519.
76. ***Kwon SY, Chun SY, Ha YS, Kim DH, Kim J, Song PH, et al. 2017.*** Hypoxia enhances cell properties of human mesenchymal stem cells. Tiss Eng. Reg Med 14(5), 595-604. doi: 10.1007/s13770-017-0068-8.
77. ***Labusca L, Mashayekhi K. 2019.*** Human adult pluripotency: Facts and questions. World J Stem Cells, 11(1), 1-12. doi.org/10.4252/wjsc.v11.i1.1.

78. ***Lange-Consiglio A, Perrini C, Bertero A, Esposti P, Cremonesi F, Vincenti L. 2017.*** Isolation, molecular characterization, and in vitro differentiation of bovine Wharton jelly-derived multipotent mesenchymal cells. Theriogenology, 89, 338-347. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.042.
79. ***Lee JJ, Kwon JH, Park YK, Kwon O, Yoon TW. 1997.*** The effects of various hormones and growth factors on the growth of human insulin-producing cell line in serum-free medium. Exp Mol Med 29(4), 209-216. doi.org/10.1038/emm.1997.32.
80. ***Li X, Bai J, Ji X, Li R, Xuan Y, Wang Y. 2014.*** Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. Int J Mol Med 34(3), 695-704. doi: 10.3892/ijmm.2014.1821.
81. ***Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.*** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25(4), 402-408. doi.org/10.1006/meth.2001.1262.
82. ***Long C, Lankford L, Kumar P, Grahn R, Borjesson DL, Farmer D, et al. 2018.*** Isolation and characterization of canine placenta-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of neurological disorders in dogs. Cytometry Part A, 93(1), 82-92. doi: 10.1002/cyto.a.23171.
83. ***Mandl I, Zipper H, Ferguson LT. 1958.*** Clostridium histolyticum collagenase: Its purification and properties. Arch Biochem Bioph, 74(2), 465-475. doi.org/10.1016/0003-9861(58)90017-1.
84. ***Marcus AJ, Woodbury D. 2008.*** Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. J Cell Mol Med, 12(3), 730-742. doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00221.x.
85. ***Masters JR, Stacey GN. 2007.*** Changing medium and passaging cell lines. Nat Protoc, 2(9), 2276-2284. doi: 10.1038/nprot.2007.319.
86. ***Mather J, Roberts P. 1998.*** Introduction to cell and tissue culture: Theory and technique. In N. Y. P. Press. (Ed.). doi:10.1007/b102298.
87. ***McKee C, Chaudhry GR. 2017.*** Advances and challenges in stem cell culture. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 159, 62-77. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.051.
88. ***Meesters M, Opsomer G, Govaere J. 2019.*** Macroscopic evaluation of the placenta of the alpaca (Vicugna pacos). Reprod Domest Anim. 54(7): 996-1002. doi.org/10.1111/rda.13453.
89. ***Meierhenry JA, Ryzhuk V, Miguelino MG, Lankford L, Powell JS, Farmer D, et al. 2015.*** Placenta as a source of stem cells for regenerative medicine. Cur Path Rep, 3(1), 9-16. doi.org/10.1007/s40139-015-0070-6.
90. ***Melnik S, Werth N, Boeuf S, Hahn EM, Gotterbarm T, Anton, M, et al. 2019.*** Impact of c-MYC expression on proliferation, differentiation, and risk of neoplastic transformation of human mesenchymal stromal cells. Stem Cell Research & Therapy, *10*(1).73-91. doi.org/10.1186/s13287-019-1187-z.
91. ***Michiels C. 2004.*** Physiological and pathological responses to hypoxia. Am J Pathol 164(6), 1875-1882. doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63747-9.
92. ***Miersch C, Stange K, Röntgen M. 2018.*** Effects of trypsinization and of a combined trypsin, collagenase, and DNase digestion on liberation and in vitro function of satellite cells isolated from juvenile porcine muscles. In Vitro Cell Dev Biol Anim 54(6), 406-412. doi: 10.1007/s11626-018-0263-5.

93. ***Miniawy H, Ahmed K, Ibrahem E, Sabry D, Tahany A, Amer I, et al. 2017.*** Camel's wharton jelly mesenchymal stem cell is a novel tool for regeneration of induced diabetes mellitus. J Trans Sci 3(5), 1-6. doi: 10.15761/JTS.1000196.
94. ***Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shafiee A, Seyedjafari E, Dinarvand P, Toghdory A, Bagherizadeh I, et al. 2013.*** Isolation, characterization, and mesodermic differentiation of stem cells from adipose tissue of camel (*Camelus dromedarius*). In Vitro Cell Dev Biol Anim, 49(2), 147-154. doi: 10.1007/s11626-012-9578-9.
95. ***Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, Baetselier PD, Genst ED, Kinne J, et al. 2009.*** Camelid immunoglobulins and nanobody technology. Veter Immunol Immunopath, 128(1), 178-183. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.299.
96. ***Nissar S, Ramesh G, Kannan T, Basha S, Narayansamy A, Seerangan R, et al. 2018.*** Morphometry of feline adipose tissue derived mesenchymal stem cells in culture. J Liv Res, 8(12), 182-187. doi.org/10.5455/ijlr.20180424075007.
97. ***Olivera L, Zago D, Leiser R, Jones C, Bevilacqua E. 2003.*** Placentation in the alpaca Lama pacos. Anat Embryol (Berl), 207(1), 45-62. doi: 10.1007/s00429-003-0328-3.
98. ***Oliveira MS, Barreto-Filho JB. 2015***. Placental-derived stem cells: Culture, differentiation and challenges. World J Stem Cells, 7(4), 769-775. doi.org/10.4252/wjsc.v7.i4.769.
99. ***Olivera L, Bevilacqua E. 2014.*** Interacción trofoblasto-epitelio uterino en la formación de la placenta epiteliocorial, alpacas. Rev. Investig. Altoandin. 16(2):17-24. doi.org/10.18271/ria.2014.54.
100. ***Ospina-Pérez M, Muñetón-Peña CM. 2011.*** Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. Iatreia, 24, 389-401.
101. ***Oviedo C, Rodríguez J. 2003***. EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny. Química Nova, 26, 901-905. doi.org/10.1590/S0100-40422003000600020.
102. ***Owen JH, Graham MP, Chinn SB, Darr OF, Chepeha DB, Wolf GT, et al. 2016.*** Novel method of cell line establishment utilizing fluorescence-activated cell sorting resulting in 6 new head and neck squamous cell carcinoma lines. Head Neck, 38 Suppl 1, E459-467. doi.org/10.1002/hed.24019.
103. ***Pearson JM, Smith MC, Schlafer DH. 2015.*** Gross and histological description of the epidermal membrane found on normal neonatal piglets. Lab Animal, 44, 445. doi: 10.1038/laban.890.
104. ***Peng SY, Chou CW, Kuo YH, Shen PC, Shaw SWS. 2017.*** Potential differentiation of islet-like cells from pregnant cow-derived placental stem cells. Taiwan J Obstet Gynecol, 56(3), 306-311. doi.org/10.1016/j.tjog.2017.04.007.
105. ***Phelan K, May KM. 2015.*** Basic techniques in mammalian cell tissue culture. Curr Prot in Cell Biol, 66(1), 1.1.1-1.1.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0101s66.
106. ***Phipps SM, Berletch JB, Andrews LG, Tollefsbol TO. 2007.*** Aging cell culture: methods and observations. Methods Mol Biol, *371*, 9–19. doi: 10.1007/978-1-59745-361-5_2.
107. ***Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G, Chiavarelli M, et al. 2011.*** Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of Oct-4 and Sox-2. Stem Cells Dev, 20(5), 915-923. doi: 10.1089/scd.2010.0353.
108. ***Prathalingam N, Ferguson L, Young L, Lietz G, Oldershaw R, Healy L, et al. 2012.*** Production and validation of a good manufacturing practice grade human fibroblast line for supporting human embryonic stem cell derivation and culture. Stem cell Res & Ther, 3(2), 12. doi: 10.1186/scrt103.

109. ***Proudfit CL, Chan MK, Basch RS, Young BK. 2014.*** Identification and isolation of putative stem cells from the murine placenta. J Perinat Med, 42(6), 675-683. doi: 10.1515/jpm-2014-0266.
110. ***Rajan M, Mortusewicz O, Rothbauer U, Hastert FD, Schmidthals K, Rapp A, et al. 2015.*** Generation of an alpaca-derived nanobody recognizing γ-H2AX. FEBS Open Bio, 5, 779-788. doi.org/10.1016/j.fob.2015.09.005.
111. ***Revets H, De-Baetselier P, Muyldermans S. 2005.*** Nanobodies as novel agents for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther 5(1): 111-124.doi: 10.1517/14712598.5.1.111.
112. ***Ribitsch I, Chang-Rodriguez S, Egerbacher M, Gabner S, Gueltekin S, Huber J, et al. 2017.*** Sheep placenta cotyledons: A noninvasive source of ovine mesenchymal stem cells. Tissue Eng Part C Methods, 23(5), 298-310. doi: 10.1089/ten.tec.2017.0067.
113. ***Ridzuan N, Al-Abbar A, Yip WK, Maqbool M, Ramasamy R. 2016.*** Characterization and expression of senescence marker in prolonged passages of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Int. 8487264. doi.org/10.1155/2016/8487264.
114. ***Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, et al. 2005.*** Transcriptional regulation of Nanog by Oct4 and Sox2. J Biol Chem 280(26), 24731-24737. doi: 10.1074/jbc.M502573200.
115. ***Rubio V. 2018.*** Identificación de nanocuerpos recombinantes de alpaca contra el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B. Tesis de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular. Lima. Univ Per Cayetano Heredia. 85p.
116. ***Silvipriya KS, Krishna-Kumar K, Bhat AR, Kumar BD, John A, Lakshmanan P. 2015.*** Collagen: Animal sources and biomedical application. J App Pharm Sci 5(3): 123-127. doi: 10.7324/JAPS.2015.50322.
117. ***Saadeldin IM, Abdelfattah-Hassan A, Swelum AAA. 2017.*** Feeder cell type affects the growth of in vitro cultured bovine trophoblast cells. BioMed Res Int 2017, 6. doi.org/10.1155/2017/1061589.
118. ***Saadeldin IM, Swelum AA, Elsafadi M, Moumen AF, Alzahrani FA, Mahmood A, et al. 2017.*** Isolation and characterization of the trophectoderm from the Arabian camel (*Camelus dromedarius*). Placenta, 57, 113-122. doi.org/10.1016/j.placenta.2017.06.015.
119. ***Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, et al. 2012.*** Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 48(2), 75-83. doi: 10.1007/s11626-011-9480-x.
120. ***Samsonraj RM, Rai B, Sathiyanathan P, Puan KJ, Rötzschke O, Hui JH, et al. 2015.*** Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. Stem cells, 33(6), 1878-1891. doi: 10.1002/stem.1982.
121. ***Sánchez M. 2006.*** Permisibilidad de cultivos secundarios de alpaca y llama a multiplicación viral de herpesvirus bovino, virus de la diarrea viral bovina, virus parainfluenza 3 bovina y virus respiratorio sincitial bovino. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 59p.
122. ***Saulnier N, Loriau J, Febre M, Robert C, Rakic R, Bonte T, et al. 2016.*** Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells?. Vet Immunol Immunopathol, 171, 47-55. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.005.
123. ***Schaefer DL, Bildfell RJ, Long P, Lohr CV. 2012.*** Characterization of the microanatomy and histopathology of placentas from aborted, stillborn, and normally

delivered alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*). Vet Pathol, 49(2), 313-321. doi: 10.1177/0300985811406889.

124. ***Schmid S. 2006.*** The value chain of alpaca fiber in Peru, An economic analysis. Master Thesis. Zurich: Swiss Federal Institute of Technology. 154p

125. ***Seo MS, Park SB, Kim HS, Kang JG, Chae JS, Kang KS. 2013***. Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. J Vet Sci 14(2), 151-159. doi.org/10.4142/jvs.2013.14.2.151.

126. ***Seo MS, Park SB, Kang KS. 2012.*** Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Cell Transplant, 21(7), 1493-1502. doi: 10.3727/096368912X647207.

127. ***Shall S. 1996.*** Aging of cells in vitro. In S. I. S. Rattan & O. Toussaint (Eds.), Molecular Gerontology: Res Stat Strat (pp. 75-85). Boston, MA: Springer US. doi.org/10.1007/978-1-4615-5889-7_6.

128. ***Shaw E. 1967.*** Site-specific reagents for chymotrypsin and trypsin. In Meth in Enzym (Vol. 11, pp. 677-686): Academic Press. doi.org/10.1016/S0076-6879(67)11084-7.

129. ***Sheridan JJ. 1998.*** Sources of contamination during slaughter and measures for control. J Food Safety 18(4), 321-339. doi.org/10.1111/j.1745-4565.1998.tb00223.x.

130. ***Smith A. 2017.*** Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. Development, 144(3), 365-373. doi: 10.1242/dev.142679.

131. ***Smith K, Dalton S. 2010.*** Myc transcription factors: key regulators behind establishment and maintenance of pluripotency. Regen Med, 5(6), 947-959. doi: 10.2217/rme.10.79.

132. ***Soleimani M, Nadri S. 2009.*** A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. Nat Protoc, 4(1), 102-106. doi.org/10.1038/nprot.2008.221.

133. ***Soufi A, Dalton S. 2016.*** Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. Dev 143(23), 4301. doi: 10.1242/dev.142075.

134. ***Steven DH, Burton G, Sumar J, Nathanielsz PW. 1980***. Ultrastructural observations on the placenta of the alpaca (*Lama pacos*). Placenta 1(1): 21-32. doi.org/10.1016/S0143-4004(80)80013-0.

135. ***Suasnavas E. 2013.*** Characterization and potential utility of porcine trophoblast-derived stem-like cells. Master Thesis of Science. Utah: Utah State University. 65p.

136. ***Takahashi K, Yamanaka S. 2006.*** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126(4), 663-676. doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024.

137. ***Talavera J, Rivas-Ruiz R, Bernal-Rosales LP. 2011.*** Investigación clínica V. Tamaño de muestra. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 49(5), 517-522.

138. ***Theunissen T, Jaenisch R. 2017.*** Mechanisms of gene regulation in human embryos and pluripotent stem cells. Development, 144(24), 4496. doi: 10.1242/dev.157404.

139. ***Tsai C, Hung S. 2012.*** Functional roles of pluripotency transcription factors in mesenchymal stem cells. Cell Cycle, 11(20), 3711-3712. doi.org/10.4161/cc.22048.

140. ***Uysal O, Sevimli T, Sevimli M, Gunes S, Eker-Sariboyaci A. 2018.*** Chapter 17 - Cell and Tissue Culture: The Base of Biotechnology. In D. Barh & V. Azevedo (Eds.), Omics Tech Bio-Engin (pp. 391-429): Academic Press. doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00017-8.

141. ***Vadakke-Madathil S, LaRocca G, Raedschelders K, Yoon J, Parker S, Tripodi J, et al. 2019.*** Multipotent fetal-derived Cdx2 cells from placenta regenerate the heart. Proc Natl Acad Sci, 116(24), 11786-11795. doi.org/10.1073/pnas.1811827116.
142. ***Valdivia M, Reyes J, Bravo Z, Cancho C, Castañeda S, Limaymanta, et al. 2019.*** In vitro culture of spermatogonial stem cells isolated from adult alpaca (Vicugna pacos) testes analysed with Dolichos biflorus by flow cytometry. Andrologia, 51(6), e13269. doi: 10.1111/and.13269.
143. ***Van-Wart H. 2013.*** Chapter 126 - Clostridium Collagenases. In N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition) (pp. 607-611): Academic Press. doi.org/10.1016/C2009-1-60990-4.
144. ***Vargas AL, Marques I, Machado M, Bordin DL, Bergter L, Prá D, et al. 2013.*** The influence of micronutrients in cell culture: A reflection on viability and genomic stability. BioMed Research International, 2013, 22. doi: 10.1155/2013/597282.
145. ***Vierck J, Byrne K, Mir P, Dodson M. 2000.*** Ten commandments for preventing contamination of primary cell cultures. Methods Cell Sci, 22(1), 33-41. doi.org/10.1023/A:1009826012986.
146. ***Virchow R, Sittenfeld J, Berliner Pathologisches I, August H, August H, et al. 1858.*** Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre : zwanzig Vorlesungen, gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 in pathologischen Institute zu Berlin. Retrieved from the Library of Congress, https://www.loc.gov/item/06041231/.
147. ***Vogel K. 1978.*** Effects of hyaluronidase, trypsin and edta on surface composition and topography during detachment of cells in culture. Exp Cell Res 113(2), 345-357. doi.org/10.1016/0014-4827(78)90375-0.
148. ***Ward-Kischer C, Leibovitz A, Pindur J. 1989.*** The use of a transport medium (L15M15) for bulk tissue storage and retention of viability. Cytotechnology, 2(3), 181-185. doi: 10.1007/BF00133243.
149. ***Watanabe R. 2016.*** Respuesta inmune celular en la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) clínicamente sanas. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 114p.
150. ***Weber M, Gohner C, San-Martin S, Vattai A, Hutter S, Parraga M, et al. 2016.*** Unique trophoblast stem cell- and pluripotency marker staining patterns depending on gestational age and placenta-associated pregnancy complications. Cell Adh Migr, 10(1-2), 56-65. doi.org/10.1080/19336918.2016.1142035.
151. ***Wegmeyer H, Bröske AM, Leddin M, Kuentzer K, Nisslbeck AK, Hupfeld J, et al. 2013.*** Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. Stem cells Dev 22(19), 2606-2618. doi: 10.1089/scd.2013.0016.
152. ***Whitford W. 2005.*** Supplementation of animal cell culture media. *BioProcess Int*, *3*(6)28-36.
153. ***Wong PB, Wiley EO, Johnson WE, Ryder OA, O'Brien SJ, Haussler D, et al. 2012.*** Tissue sampling methods and standards for vertebrate genomics. Gigascience, 1(1), 8. doi.org/10.1186/2047-217X-1-8.
154. ***Wooding F, Burton G. 2008.*** Comparative placentation: Structures, functions and evolution. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1, 301. doi: 10.1007/978-3-540-78797-6.
155. ***Wright GJ, BrockBank KG, Rahn E, Halwani DO, Chen Z, Yao H. 2014.*** Impact of storage solution formulation during refrigerated storage upon chondrocyte viability and cartilage matrix. Cells Tissues Organs, 199(1), 51-58. doi: 10.1159/000363134.
156. ***Wu M, Zhang R, Zou Q, Chen Y, Zhou M, Li X, et al. 2018.*** Comparison of the biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human

placenta and umbilical cord. Sci Re, 8(1), 5014. doi.org/10.1038/s41598-018-23396-1.

157. ***Wu YD, Li M, Liao X, Li SH, Yan JX, Fan L, et al. 2019.*** Effects of storage culture media, temperature and duration on human adiposederived stem cell viability for clinical use. Mol Med Rep, 19(3), 2189-2201. doi: 10.3892/mmr.2019.9842.
158. ***Yadav PS, Singh RK, Singh B. 2012.*** Fetal stem cells in farm animals: Applications in health and production. Agric Res 1(1), 67-77. doi.org/10.1007/s40003-011-0001-7.
159. ***Yamamoto T, Ricordi C, Messinger S, Sakuma Y, Miki A, Rodríguez R, et al. 2007***. Deterioration and variability of highly purified collagenase blends used in clinical islet isolation.Transplant, 84(8), 997-1002. doi: 10.1097/01.tp.0000284979.48497.de.
160. ***Yang Z, Xiong HR. 2012.*** Culture conditions and types of growth media for mammalian cells. Biomed Tiss Cult. IntechOpen. doi:10.5772/52301.
161. ***Yao T, Asayama, Y. 2017.*** Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. Reprod Med Biol, 16(2), 99-117. doi.org/10.1002/rmb2.12024.

162. ***Yazdani M. 2016.*** Technical aspects of oxygen level regulation in primary cell cultures: A review. Interd Toxicol 9(3-4), 85-89. doi.org/10.1515/intox-2016-0011.

163. ***Yoon JH, Roh EI, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, et al. 2013.*** Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from wharton´s jelly. Biomed Res. Int. 428726. doi: 10.1155/2013/428726.

164. ***Yoshizawa RS, Osis MJ, Nascimento SL, Bento SF, Godoy AC, Coelho S, et al. 2015.*** Postpartum women's perspectives on the donation of placentas for scientific research in campinas, Brazil. J Empir Res Hum Res Ethics, 10(1), 76-87. doi: 10.1177/1556264614559889.
165. ***Yu P, Nie Q, Tang C, Zhang L. 2018.*** Nanog induced intermediate state in regulating stem cell differentiation and reprogramming. BMC Syst Biol, 12(1), 22. doi.org/10.1186/s12918-018-0552-3.
166. ***Zhan XS, El-Ashram S, Luo DZ, Luo HN, Wang BY, Chen SF, et al. 2019.*** A comparative study of biological characteristics and transcriptome profiles of mesenchymal stem cells from different canine tissues. Int J Mol Sci, 20(6). doi.org/10.3390/ijms20061485.
167. ***Zhou H, Weir MD, Xu HH. 2011.*** Effect of cell seeding density on proliferation and osteodifferentiation of umbilical cord stem cells on calcium phosphate cement-fiber scaffold. Tissue Eng Part A, 17(21-22), 2603-2613. doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0048.
168. ***Zhou X, Barsky LW, Adams GB. 2013.*** Placental growth factor expression is required for bone marrow endothelial cell support of primitive murine hematopoietic cells. Plos ONE. 8(8), e67861. doi.org/10.1371/journal.pone.0067861.
169. ***Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. 2013.*** Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. J Vis Exp(79), e50585. doi: 10.3791/50585.

IX. APÉNDICE



Figura A. 1. Medición biparietal del feto de alpaca en último tercio de gestación

Cuadro A. 1. Comparación del recuento celular del método de colagenasa, tripsina y explante

	GRUPO CONTROL (EXPLANTE)		MÉTODO ENZIMÁTICO - COLAGENASA CLOSTRIDIAL AL 0.05%		MÉTODO ENZIMÁTICO - SOLUCIÓN DE TRIPSINA AL 0.05%	
# Muestra	Células Vivas	Células muertas	Células Vivas	Células muertas	Células Vivas	Células muertas
#1	1.00E+05	8.00E+04	2.19E+06	6.30E+06	6.50E+05	1.15E+07
#2	1.60E+05	1.50E+05	4.50E+06	5.40E+06	8.00E+05	1.05E+07
#3	8.00E+04	1.00E+05	9.60E+06	5.00E+06	7.50E+05	9.30E+06
#4	1.00E+05	8.00E+04	7.13E+06	5.60E+06	4.50E+05	8.50E+06
#5	6.00E+04	9.00E+04	6.50E+06	4.00E+06	2.30E+05	7.50E+06
#6			7.50E+06	4.30E+06	4.50E+05	7.50E+05
#7			7.15E+06	6.30E+06	1.00E+06	6.80E+06
#8			6.20E+06	4.00E+06	4.30E+05	9.80E+06
#9			4.80E+06	4.50E+06	3.50E+05	8.50E+06
#10			9.50E+06	5.40E+06	4.10E+05	9.50E+06
#11			9.00E+06	5.00E+06	8.60E+05	7.55E+06
#12			6.54E+06	4.50E+06	3.80E+05	6.50E+06
#13			5.40E+06	5.00E+06	6.90E+05	7.80E+06
#14			7.70E+06	5.20E+06	2.40E+05	9.62E+06
#15			5.35E+06	5.25E+06	5.70E+05	8.24E+06
#16			4.80E+06	3.50E+06	7.10E+05	8.70E+06
#17			5.25E+06	5.60E+06	5.10E+05	9.45E+06
#18			8.35E+06	4.50E+06	4.80E+05	8.70E+06
#19			6.44E+06	4.20E+06	3.60E+05	1.02E+07
#20			6.00E+06	5.45E+06	6.20E+05	8.30E+06
#21			4.80E+06	5.25E+06	4.30E+05	4.86E+05
#22			8.40E+06	5.60E+06	2.50E+05	7.24E+06
#23			6.65E+06	3.80E+06	3.60E+05	5.47E+06
#24			5.40E+06	3.90E+06	3.80E+05	9.25E+06
#25			4.20E+06	4.13E+06	4.40E+05	8.12E+06
Media Aritmética	1.00E+05	1.00E+05	6.37E+06	4.87E+06	5.12E+05	7.93E+06
Desviación Estándar	3.35E+04	2.61E+04	1.75E+06	7.55E+05	1.97E+05	2.52E+06

Cuadro A. 2. Normalidad del recuento de células vivas por método de aislamiento

Normalidad - Shapiro Wilk - 3 Grupos

	CONTROL	COLAGENASA	TRIPSINA
Number of values	5	25	25
Minimum	60000	2.190e+006	230000
25% Percentile	70000	5.025e+006	370000
Median	100000	6.440e+006	450000
75% Percentile	130000	7.600e+006	670000
Maximum	160000	9.600e+006	1000000
Mean	100000	6.374e+006	512000
Std. Deviation	37417	1.791e+006	201143
Std. Error	16733	358152	40229
Lower 95% CI of mean	53541	5.635e+006	428973
Upper 95% CI of mean	146459	7.113e+006	595027
Shapiro-Wilk normality test			
W	N too small	0.9746	0.9370
P value		0.7606	0.1260
Passed normality test (alpha=0.05)?		Yes	Yes
P value summary		ns	ns
Sum	500000	1.594e+008	1.280e+007

Cuadro A. 3. Normalidad del recuento de células muertas por método de aislamiento.

Normalidad - Shapiro Wilk - 3 grupos

	CONTROL	COLAGENASA	TRIPSINA
Number of values	5	25	25
Minimum	80000	3.500e+006	486000
25% Percentile	80000	4.165e+006	7.370e+006
Median	90000	5.000e+006	8.500e+006
75% Percentile	125000	5.425e+006	9.475e+006
Maximum	150000	6.300e+006	1.150e+007
Mean	100000	4.867e+006	7.931e+006
Std. Deviation	29155	770376	2.570e+006
Std. Error	13038	154075	513998
Lower 95% CI of mean	63799	4.549e+006	6.870e+006
Upper 95% CI of mean	136201	5.185e+006	8.992e+006
Shapiro-Wilk normality test			
W	N too small	0.9570	0.8034
P value		0.3574	0.0003
Passed normality test (alpha=0.05)?		Yes	No
P value summary		ns	***
Sum	500000	1.217e+008	1.983e+008

Cuadro A. 4. Análisis micrométrico en células fusiformes del método explante en pasaje 0 y 1.

	EXPLANTE			
	PASAJE 0		PASAJE 1	
# CÉLULAS EVALUADAS	LARGO (µm)	ANCHO (µm)	LARGO (µm)	ANCHO (µm)
1	205.72	21.08	241.10	43.86
2	186.34	24.04	381.67	27.19
3	150.41	14.91	212.24	27.74
4	137.44	22.36	305.73	37.39
5	121.66	29.81	208.91	31.06
6	135.73	17.00	267.62	44.37
7	159.03	26.87	279.13	59.81
8	181.41	16.67	289.87	23.92
9	153.23	23.57	283.04	31.86
10	162.79	31.62	292.58	47.30
11	193.51	21.34	251.09	29.64
12	108.83	18.86	258.12	58.41
13	143.95	28.28	310.36	48.10
14	154.09	26.03	230.54	45.60
15	158.08	33.33	195.24	55.22
16	145.34	36.67	235.65	55.42
17	167.76	31.45	231.35	38.09
18	122.93	44.72	400.39	35.96
19	166.67	36.06	387.69	80.03
20	89.44	28.67	281.76	52.13
Promedio (µm)	152.22	26.67	277.20	43.65
Desvest ± (µm)	27.80	7.45	56.88	13.64
Tamaño máximo (µm)	205.72	44.72	400.39	80.03
Tamaño mínimo (µm)	89.44	14.91	195.24	23.92

Cuadro A. 5. Análisis micrométrico en células fusiformes del método colagenasa en pasaje 0 y 1.

	COLAGENASA			
	PASAJE 0		PASAJE 1	
# CÉLULAS EVALUADAS	LARGO (µm)	ANCHO (µm)	LARGO (µm)	ANCHO (µm)
1	119.01	20.34	186.79	21.08
2	130.00	29.01	204.67	75.57
3	162.72	31.55	310.16	40.28
4	128.39	35.16	365.18	16.67
5	60.27	24.06	276.69	18.86
6	130.80	29.64	312.27	26.03
7	119.72	37.69	286.69	26.03
8	112.81	26.24	221.61	70.63
9	172.88	41.91	236.76	40.00
10	154.31	31.11	365.53	35.90
11	153.41	25.96	256.15	30.00
12	176.83	35.37	349.29	33.50
13	145.04	28.12	436.99	53.44
14	199.30	40.02	324.17	53.75
15	280.12	35.70	368.92	63.25
16	111.83	24.47	387.03	37.27
17	137.38	25.50	296.52	23.57
18	150.20	35.78	364.81	43.46
19	180.85	31.43	416.67	36.82
20	107.59	45.17	254.06	50.44
Promedio (µm)	146.67	31.71	311.05	39.83
Desvest ± (µm)	43.31	6.38	68.95	16.46
Tamaño máximo (µm)	280.12	45.17	436.99	75.57
Tamaño mínimo (µm)	60.27	20.34	186.79	16.67

Cuadro A. 6. Normalidad del análisis micrométrico en células fusiformes del método explante y del método colagenasa

Normalidad en Céls del Grupo Control

	Long.(Expl-P0)	Ancho(Expl-P0)	Long.(Expl-P1)	Ancho(Expl-P1)
Number of values	20	20	20	20
Minimum	89.44	14.91	195.2	23.92
25% Percentile	136.2	21.15	232.4	31.26
Median	153.7	26.45	273.4	44.12
75% Percentile	167.5	31.58	302.4	54.45
Maximum	205.7	44.72	400.4	80.03
Mean	152.2	26.67	277.2	43.66
Std. Deviation	28.52	7.644	58.36	13.99
Std. Error	6.378	1.709	13.05	3.129
Lower 95% CI of mean	138.9	23.09	249.9	37.11
Upper 95% CI of mean	165.6	30.24	304.5	50.20
Shapiro-Wilk normality test				
W	0.9874	0.9733	0.9133	0.9455
P value	0.9927	0.8234	0.0737	0.3042
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Sum	3044	533.3	5544	873.1

Normalidad en Céls del Grupo Colag

	Long.(Col-P0)	Ancho(Col-P0)	Long.(Col-P1)	Ancho(Col-P1)
Number of values	20	20	20	20
Minimum	60.27	20.34	186.8	16.67
25% Percentile	119.2	26.03	254.6	26.03
Median	141.2	31.27	311.2	37.05
75% Percentile	170.3	35.76	365.4	52.69
Maximum	280.1	45.17	437.0	75.57
Mean	146.7	31.71	311.0	39.83
Std. Deviation	44.43	6.547	70.74	16.89
Std. Error	9.936	1.464	15.82	3.777
Lower 95% CI of mean	125.9	28.65	277.9	31.92
Upper 95% CI of mean	167.5	34.78	344.2	47.73
Shapiro-Wilk normality test				
W	0.9085	0.9757	0.9747	0.9437
P value	0.0597	0.8677	0.8492	0.2810
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Sum	2933	634.2	6221	796.6

Cuadro A. 7. Recuentos de células primarias cada 24hrs por 6 días del método explante

		HORAS					
Densidad de siembra en P1 = 5000 Céls/cm^2		**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
GRUPO CONTROL (EXPLANTE)	**#1**	5.00E+04	7.67E+04	1.13E+05	1.47E+05	1.87E+05	2.43E+05
	#2	4.00E+04	5.67E+04	8.67E+04	1.13E+05	1.50E+05	1.93E+05
	#3	4.33E+04	6.33E+04	1.00E+05	1.37E+05	1.73E+05	2.23E+05
	#4	4.67E+04	7.33E+04	1.07E+05	1.50E+05	1.77E+05	2.07E+05
	#5	5.33E+04	9.33E+04	1.20E+05	1.40E+05	2.00E+05	2.47E+05
	PROMEDIO	4.67E+04	7.27E+04	1.05E+05	1.37E+05	1.77E+05	2.23E+05
	Desv Estándar	4.71E+03	1.25E+04	1.15E+04	1.29E+04	1.65E+04	2.06E+04
	Valor superior	5.33E+04	9.33E+04	1.20E+05	1.50E+05	2.00E+05	2.47E+05
	Valor inferior	4.00E+04	5.67E+04	8.67E+04	1.13E+05	1.50E+05	1.93E+05

Cuadro A. 8. Recuentos de células primarias cada 24hrs por 6 días del método colagenasa

		HORAS					
Densidad de siembra en P1 = 5000 Céls/cm^2		**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
GRUPO COLAGENASA	**#1**	4.58E+04	6.00E+04	1.03E+05	1.23E+05	1.84E+05	2.17E+05
	#2	4.00E+04	5.67E+04	8.25E+04	1.03E+05	1.54E+05	1.78E+05
	#3	4.42E+04	5.92E+04	8.92E+04	1.21E+05	1.80E+05	2.27E+05
	#4	3.42E+04	5.08E+04	9.33E+04	1.40E+05	1.94E+05	2.66E+05
	#5	4.17E+04	6.00E+04	8.25E+04	1.10E+05	1.56E+05	1.97E+05
	#6	5.00E+04	7.08E+04	1.06E+05	1.33E+05	1.63E+05	2.04E+05
	#7	4.92E+04	6.08E+04	8.25E+04	1.53E+05	1.89E+05	2.43E+05
	#8	4.67E+04	6.33E+04	1.60E+05	1.87E+05	2.14E+05	2.23E+05
	#9	4.58E+04	5.92E+04	9.67E+04	1.23E+05	1.50E+05	1.87E+05
	#10	4.92E+04	7.00E+04	8.33E+04	1.16E+05	1.40E+05	2.04E+05
	#11	4.42E+04	5.42E+04	7.33E+04	1.27E+05	1.77E+05	2.13E+05
	#12	4.00E+04	6.00E+04	8.00E+04	1.43E+05	1.90E+05	2.27E+05
	#13	5.08E+04	5.75E+04	7.67E+04	1.39E+05	1.63E+05	1.86E+05
	#14	4.33E+04	5.58E+04	8.33E+04	1.59E+05	2.08E+05	2.47E+05
	#15	4.92E+04	6.00E+04	1.10E+05	1.73E+05	1.97E+05	2.83E+05
	#16	4.67E+04	4.92E+04	8.25E+04	1.37E+05	1.63E+05	2.10E+05
	#17	4.75E+04	5.42E+04	8.92E+04	1.29E+05	1.71E+05	2.16E+05
	#18	5.08E+04	6.33E+04	1.03E+05	1.53E+05	2.07E+05	2.40E+05
	#19	5.33E+04	7.25E+04	9.33E+04	1.33E+05	1.83E+05	2.50E+05
	#20	5.58E+04	6.33E+04	9.67E+04	1.43E+05	2.13E+05	2.77E+05
	#21	3.67E+04	5.67E+04	9.33E+04	1.57E+05	2.23E+05	2.83E+05
	#22	4.08E+04	6.33E+04	9.58E+04	1.36E+05	2.07E+05	2.71E+05
	#23	4.58E+04	7.00E+04	1.13E+05	1.60E+05	2.30E+05	2.50E+05
	#24	4.33E+04	5.58E+04	7.92E+04	1.13E+05	1.73E+05	2.50E+05
	#25	5.08E+04	7.33E+04	9.58E+04	1.48E+05	2.18E+05	2.30E+05
	PROMEDIO	4.58E+04	6.08E+04	9.38E+04	1.38E+05	1.86E+05	2.31E+05
	Desv Estándar	5.04E+03	6.37E+03	1.70E+04	1.96E+04	2.44E+04	3.01E+04
	Valor superior	5.58E+04	7.33E+04	1.60E+05	1.87E+05	2.30E+05	2.83E+05
	Valor inferior	3.42E+04	4.92E+04	7.33E+04	1.03E+05	1.40E+05	1.78E+05

Cuadro A. 9. Normalidad del recuento celular en cada hora determinada del método colagenasa

Normalidad del recuento celular en cada hora determinada del grupo Colagenasa

	(24H)-Colag	(48H)-Colag	(72H)-Colag	(96H)-Colag	(120H)-Colag	(144H)-Colag
Number of values	25	25	25	25	25	25
Minimum	34167	49167	73333	103333	140000	177500
25% Percentile	42500	56250	82500	122917	163333	207084
Median	45833	60000	93333	136667	184167	226667
75% Percentile	49584	63333	99584	152917	207084	250000
Maximum	55833	73333	160000	186667	230000	283333
Mean	45833	60800	93767	138300	185804	231100
Std. Deviation	5143	6502	17384	20037	24870	30752
Std. Error	1029	1300	3477	4007	4974	6150
Lower 95% CI of mean	43711	58116	86591	130029	175538	218406
Upper 95% CI of mean	47956	63484	100942	146571	196070	243794
Shapiro-Wilk normality test						
W	0.9829	0.9456	0.7824	0.9827	0.9735	0.9669
P value	0.9364	0.1989	0.0001	0.9323	0.7332	0.5677
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	***	ns	ns	ns
Sum	1.146e+006	1.520e+006	2.344e+006	3.457e+006	4.645e+006	5.778e+006

Cuadro A. 10. Promedio de ΔCt del calibrador para el gen Oct4

CALIBRADOR PARA EL GEN OCT4	GAPDH (Ct)	OCT4 (Ct)	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
CMPF- P1 - Obtenido por Dig. Enz. Colagenasa Clostridial	15.615	31.66	16.05	-1.57	**2.97**
	16.081	30.60	14.52	-3.09	**8.54**
	16.075	31.44	15.37	-2.25	**4.75**
CMPF- P1 - Explante	12.71	31.94	19.23	1.62	**0.33**
	15.92	31.32	15.40	-2.21	**4.64**
	14.07	32.28	18.21	0.60	**0.66**
Promedio de ΔCt del calibrador para OCT4			17.61		

Cuadro A. 11. Promedio de ΔCt del calibrador para el gen Sox2.

CALIBRADOR PARA EL GEN SOX2	GAPDH (Ct)	SOX2 (Ct)	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
CMPF- P1 - Obtenido por Dig. Enz. Colagenasa Clostridial	15.615	29.12	13.51	-2.99	**7.92**
	16.081	29.89	13.81	-2.68	**6.41**
	16.075	29.77	13.70	-2.80	**6.94**
CMPF- P1 - Explante	12.71	30.49	17.78	1.29	**0.41**
	15.92	30.41	14.49	-2.00	**4.00**
	14.07	31.27	17.20	0.71	**0.61**
Promedio de ΔCt del calibrador para SOX2			16.49		

Cuadro A. 12. Promedio de ΔCt del calibrador para el gen c-Myc

CALIBRADOR PARA EL GEN C-MYC	GAPDH (Ct)	C-MYC (Ct)	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
CMPF- P1 - Obtenido por Dig. Enz. Colagenasa Clostridial	15.615	23.75	8.14	-0.76	**1.69**
	16.081	24.56	8.48	-0.41	**1.33**
	16.075	24.32	8.25	-0.65	**1.57**
CMPF- P1 - Explante	12.71	22.74	10.03	1.14	**0.45**
	15.92	22.94	7.02	-1.87	**3.66**
	14.07	23.7	9.63	0.74	**0.60**
Promedio de ΔCt del calibrador para C-MYC			8.89		

Cuadro A. 13. Promedio de ΔCt del calibrador para el gen Nanog.

CALIBRADOR PARA NANOG	GAPDH (Ct)	NANOG (Ct)	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
CMPF- P1 - Obtenido por Dig. Enz. Colagenasa Clostridial	15.615	19.38	3.77	-8.21	**295.57**
	16.081	19.63	3.55	-8.42	**343.06**
	16.075	20.66	4.59	-7.39	**167.54**
CMPF- P1 - Explante	12.71	26.62	13.91	1.94	**0.26**
	15.92	25.87	9.95	-2.02	**4.07**
	14.07	26.13	12.06	0.09	**0.94**
Promedio de ΔCt del calibrador para NANOG			11.97		

Cuadro A. 14. Valores promedio del ciclo umbral (Ct) y temperatura de disociación (Tm) de los genes Gapdh, Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog.

	GAPDH		OCT4		SOX2		c-MYC		NANOG	
# Muestras	**Ct**	**Tm (ºC)**	**Ct**	**Tm (ºC)**	**Ct**	**Tm (ºC)**	**Ct**	**Tm (ºC)**	**Ct**	**Tm (ºC)**
#1	15.96	87.22	30.95	86.80	31.42	87.36	26.93	89.03	19.51	86.01
#2	13.96	86.03	30.25	87.21	34.23	86.76	25.92	90.08	19.53	81.05
#3	15.10	86.62	30.13	87.39	34.55	87.50	26.41	90.25	20.90	86.74
#4	14.26	86.47	31.94	87.69	31.91	87.09	23.40	90.19	19.38	81.79
#5	16.48	86.17	31.92	87.67	31.94	87.37	27.09	90.05	19.63	81.63
#6	14.20	86.32	29.61	80.21	27.30	86.62	27.44	90.34	21.04	83.98
#7	16.78	87.66	30.95	87.66	30.94	87.36	26.27	90.05	19.36	83.68
#8	14.60	87.63	29.84	87.66	31.82	87.47	23.09	90.06	24.13	83.39
#9	13.80	86.02	29.67	87.54	31.52	87.35	25.75	90.50	24.42	87.41
#10	16.32	85.42	30.13	80.52	30.04	87.66	27.12	90.06	21.36	81.91
#11	15.96	87.70	31.75	80.07	30.12	87.54	26.95	90.25	23.37	84.88
#12	15.62	87.25	30.04	79.92	34.95	87.67	26.52	90.13	23.12	83.82
#13	16.08	86.32	32.41	80.62	34.15	87.82	25.47	88.27	20.44	81.76
#14	14.53	86.48	32.84	79.54	31.07	87.37	23.16	89.35	22.45	82.46
#15	15.78	85.88	31.69	81.25	31.23	87.68	25.49	90.15	21.05	83.46
#16	15.35	86.33	30.31	87.32	33.24	86.45	23.27	90.09	20.49	86.75
#17	13.95	85.65	30.56	82.64	33.45	83.12	27.94	90.35	24.20	87.45
#18	17.62	87.20	30.87	84.53	33.03	84.27	24.51	87.65	23.77	87.95
#19	16.92	87.74	30.09	86.42	34.68	81.42	26.43	91.42	23.15	87.63
#20	14.28	85.13	32.07	86.79	34.61	83.48	23.19	90.12	21.06	84.60
#21	15.92	85.78	31.84	87.35	31.26	82.47	25.16	90.79	20.49	83.46
#22	15.43	85.65	30.86	87.25	32.48	84.27	26.98	90.00	24.10	83.48
#23	15.67	87.68	30.26	85.48	32.78	84.35	23.78	90.47	23.45	84.70
#24	13.45	87.34	28.45	86.23	32.15	86.23	23.47	91.05	21.19	87.64
#25	14.50	87.45	30.23	81.25	31.06	81.23	24.77	90.09	21.49	85.95
Media Aritmética	15.30	86.61	30.79	84.68	32.24	85.92	25.46	90.03	21.72	84.54
Desviación Estándar	1.08	0.80	1.02	3.13	1.76	2.09	1.54	0.76	1.69	2.15
Ct Mayor	17.62	87.74	32.84	87.69	34.95	87.82	27.94	91.42	24.42	87.95
Ct Menor	13.45	85.13	28.45	79.54	27.30	81.23	23.09	87.65	19.36	81.05

Cuadro A. 15. Valores promedio Ct y 2-ΔΔCt de genes Gapdh, Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog

	GAPDH	OCT4		SOX2		c-MYC		NANOG	
# Muestras	Ct	Ct	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Ct	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Ct	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Ct	$2^{-\Delta\Delta CT}$
#1	15.96	30.95	6.15	31.42	2.04	26.93	0.24	19.51	342.51
#2	13.96	30.25	2.50	34.23	0.07	25.92	0.12	19.53	84.45
#3	15.10	30.13	5.98	34.55	0.13	26.41	0.19	20.90	72.00
#4	14.26	31.94	0.95	31.91	0.45	23.40	0.84	19.38	115.28
#5	16.48	31.92	4.52	31.94	2.05	27.09	0.30	19.63	451.32
#6	14.20	29.61	4.59	27.30	10.48	27.44	0.05	21.04	35.02
#7	16.78	30.95	10.88	30.94	5.04	26.27	0.66	19.36	670.92
#8	14.60	29.84	5.17	31.82	0.60	23.09	1.32	24.13	5.43
#9	13.80	29.67	3.34	31.52	0.43	25.75	0.12	24.42	2.54
#10	16.32	30.13	13.93	30.04	6.82	27.12	0.27	21.36	121.94
#11	15.96	31.75	3.52	30.12	5.02	26.95	0.23	23.37	23.47
#12	15.62	30.04	9.09	34.95	0.14	26.52	0.25	23.12	22.07
#13	16.08	32.41	2.43	34.15	0.33	25.47	0.71	20.44	196.18
#14	14.53	32.84	0.62	31.07	0.97	23.16	1.20	22.45	16.52
#15	15.78	31.69	3.25	31.23	2.06	25.49	0.57	21.05	104.33
#16	15.35	30.31	6.29	33.24	0.38	23.27	1.96	20.49	114.33
#17	13.95	30.56	2.00	33.45	0.12	27.94	0.03	24.20	3.29
#18	17.62	30.87	20.53	33.03	2.12	24.51	4.00	23.77	56.69
#19	16.92	30.09	21.74	34.68	0.42	26.43	0.65	23.15	53.37
#20	14.28	32.07	0.88	34.61	0.07	23.19	0.99	21.06	36.61
#21	15.92	31.84	3.23	31.26	2.22	25.16	0.78	20.49	169.48
#22	15.43	30.86	4.54	32.48	0.68	26.98	0.16	24.10	9.82
#23	15.67	30.26	8.11	32.78	0.65	23.78	1.72	23.45	18.25
#24	13.45	28.45	6.11	32.15	0.22	23.47	0.46	21.19	18.71
#25	14.50	30.23	3.68	31.06	0.95	24.77	0.39	21.49	31.67

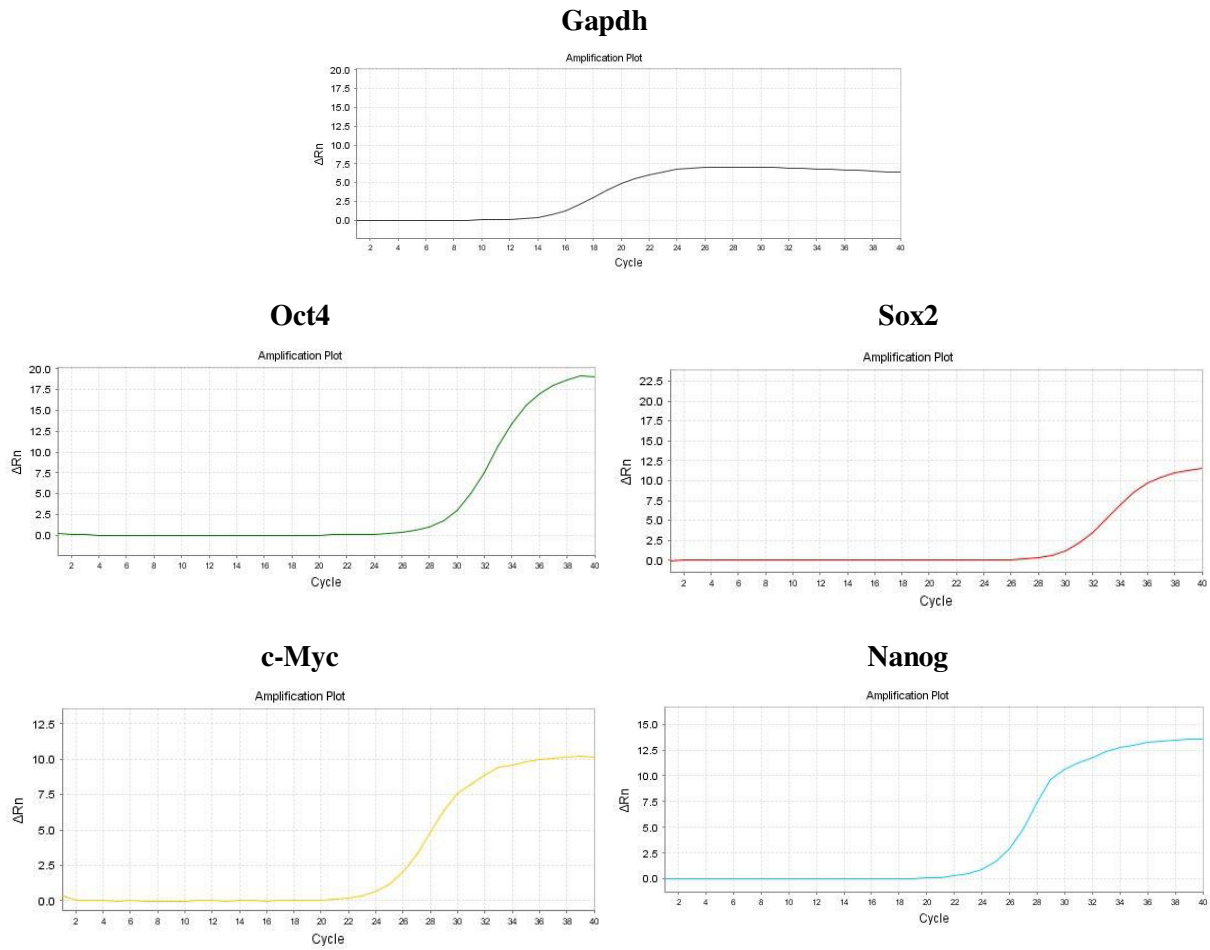


Figura A. 2. Curvas de amplificación de genes Gapdh, Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog.

Gapdh (86.17°C)

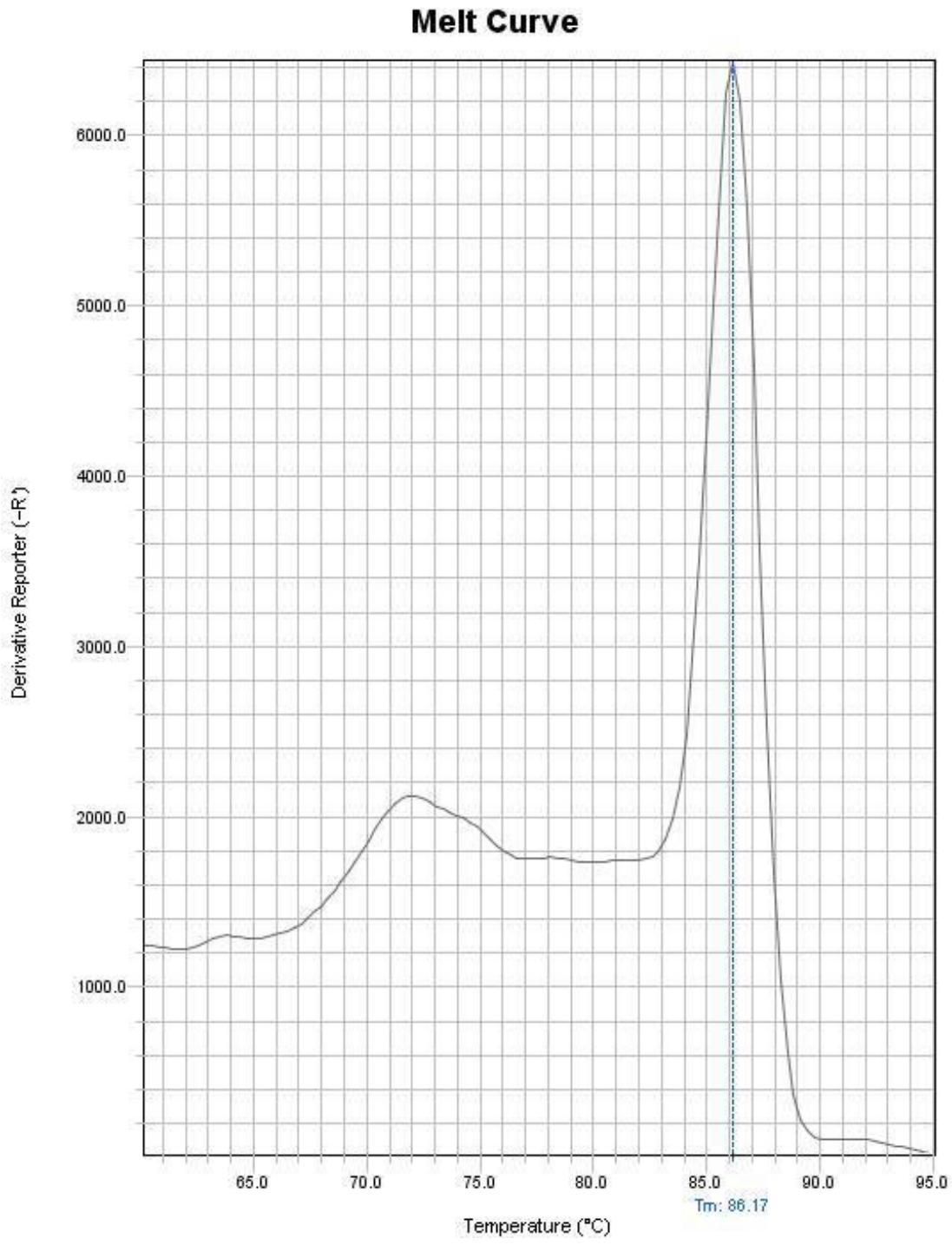


Figura A. 3. Curva de disociación del gen Gapdh

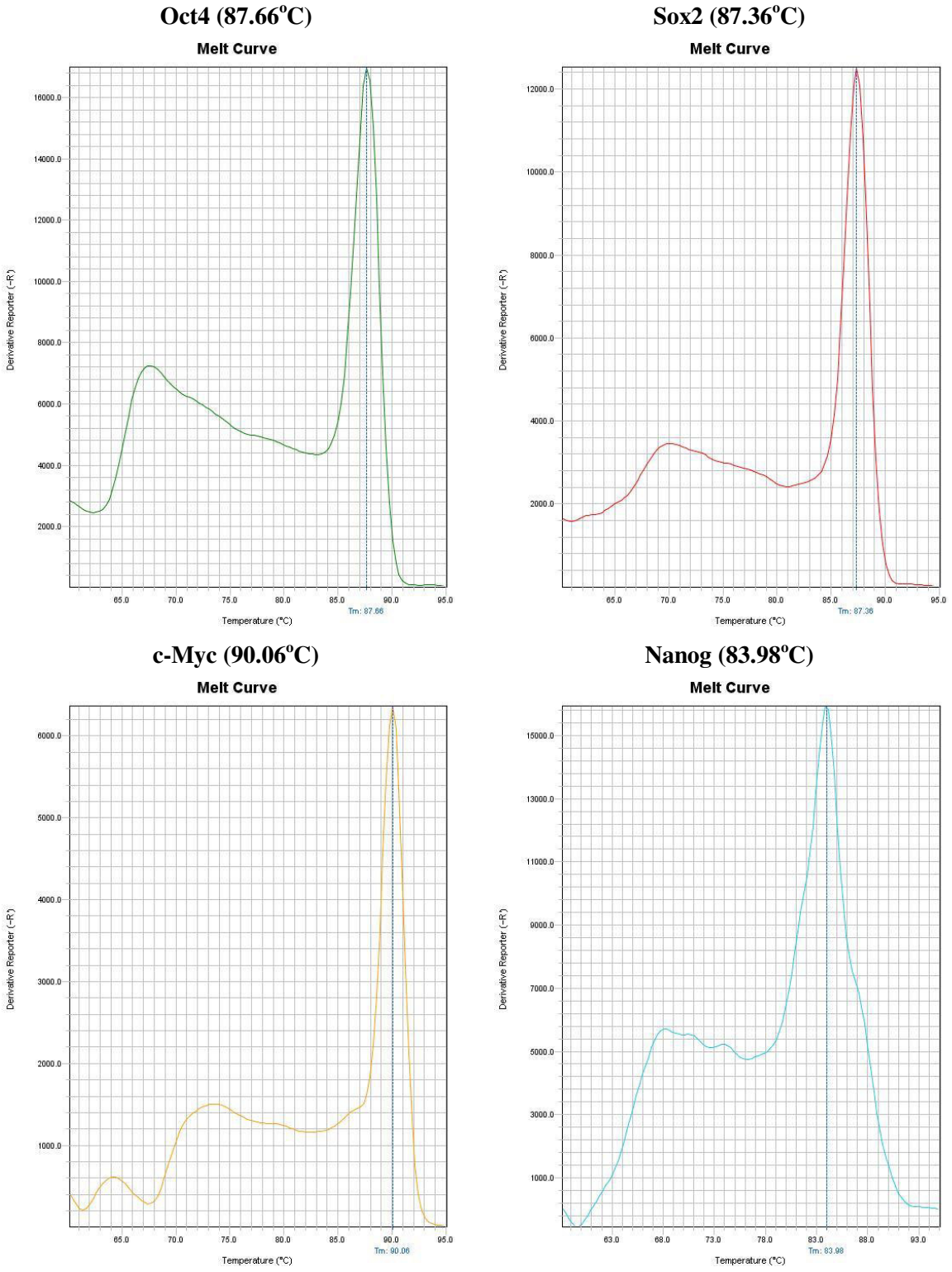


Figura A. 4. Curvas de disociación de los genes Oct4, Sox2, c-Myc y Nanog.