

Efecto del factor de crecimiento fibroblástico dos (FGF-2), en la reducción de la senescencia en células madre mesenquimales aisladas de gelatina de Wharton

Fibroblastic growth factor two (FGF-2), in reducing the senescent effect on mesenchymal stem cell isolated from Wharton's jelly

Andrea Catalina Rubio Vargas¹, Jessica Paola Alcázar², Laura Alejandra Lozano Trujillo³, Diana Katherine Garzón Perdomo⁴, Angélica Rocío Bonilla Porras⁵, Olivia Teresa González Gay⁶, Liliana Francis Turner⁷

Resumen

Introducción. Las células madre mesenquimales han generado interés en la ingeniería de tejidos, debido a sus propiedades proliferativas y capacidad de reparación de tejidos, sin embargo, para un trasplante exitoso, es necesario aumentar el número de células mediante un cultivo in-vitro. Durante este proceso la capacidad proliferativa disminuye, provocando cambios en la morfología y funcionalidad celular y afectando la viabilidad del cultivo, este estado se conoce como senescencia celular y como posibles causales, se ha considerado el estrés oxidativo y la falta de factores de crecimiento. **Objetivos:** Evaluar el efecto de FGF-2 sobre la senescencia de un cultivo de células madre mesenquimales aisladas de gelatina de Wharton y su papel en la regulación del estrés oxidativo. **Metodología.** Se añadieron dosis de 3,5 y 7,5 ng de FGF-2 al cultivo. Durante los pasajes 5 y 7, se estimó tanto

1. Bióloga, Programa de Biología. Grupo de Modelos Experimentales para las Ciencias Zoohumanas. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima, Ibagué- Tolima.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7544-7008>

2. Ms. Ciencias, profesora del programa de Biología. Grupo de Modelos Experimentales para las Ciencias Zoohumanas. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5598-4436>

3. Bióloga, Programa de Biología. Grupo de Modelos Experimentales para las Ciencias Zoohumanas. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima, Ibagué- Tolima.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9226-2926>

4. Bióloga, Programa de Biología. Grupo de Modelos Experimentales para las Ciencias Zoohumanas. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima, Ibagué- Tolima.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5101-3261>

5. Ph.D profesora, Institución: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9580-9915>

6. PhD. Investigadora del Centro de Neurociencias de Cuba.
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5026-1191>

7. Ph.D, profesor Asociado, Facultad de ciencias . Grupo de Modelos Experimentales para las Ciencias Zoohumanas. Facultad de Ciencias Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima

Correo electrónico de correspondencia: acrubiov@ut.edu.co

Recibido: 16/03/2022
Aceptado: 11/07/2022

la senescencia celular como la presencia de ROS (especies reactivas de oxígeno). **Resultados.** Se obtuvo en el pasaje 5, una diferencia significativa del 99,5% entre el control (+) con respecto a los tratamientos con FGF-2, sin embargo, en el pasaje 7 se observó un aumento en la producción de la enzima β -galactosidasa y cambios morfológicos, confirmando un estado senescente en el cultivo en todos los tratamientos evaluados. **Conclusión.** Las dosis utilizadas en este estudio contribuyeron positivamente a disminuir el proceso senescente en el cultivo celular, además se determinó, que el FGF-2 puede prolongar el tiempo de cultivo, retardando parcialmente la concentración de especies reactivas de oxígeno.

Palabras claves: células madre, estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno, factor de crecimiento fibroblástico 2, gelatina de Wharton, senescencia celular.

Abstract

Introduction. Mesenchymal stem cells have been generated interest in tissue engineering, due to their proliferative properties and tissue repair capacity, however, for a successful transplant process, it is necessary to increase the number of cells in a culture expansion process. During this process the proliferative capacity is limited, causing changes in cell morphology and functionality affecting the viability of the culture, this state is known as cell senescence. Oxidative stress and deregulation of growth factors are considered as reasons. **Aims.** To evaluate the effect of FGF-2 on the senescence of a mesenchymal stem cells culture isolated from Wharton's jelly and its role in the regulation of oxidative stress. **Methodology:** 3,5 and 7,5 ng doses of FGF-2 were added to the culture medium from passage 2, then the senescence of the culture was evaluated and the presence of reactive oxygen species was determined during passages 5 and 7. **Results.** We observed that in passage 5, there is a significant difference 99.5% between the control (+) concerning the FGF-2 treatments, however, in passage 7, an increase in the production of the enzyme β -galactosidase was observed and changes in morphology such as: increase in size and elongated shape of the cell, confirming a senescent state on the culture in all the treatments evaluated. **Conclusion.** The doses used in this study contributed positively to decrease this process in a cell culture, also, the FGF- 2 can prolong the cultivation time, partially decreasing the concentration of reactive oxygen species.

Keywords: cellular senescence, mesenchymal stem cells, oxidative stress, fibroblast growth factor 2, reactive oxygen species, Wharton jelly.

Introducción

Las Células Madre Mesenquimales (CMM) han sido utilizadas en diferentes tratamientos como terapias neurodegenerativas (1,2), reconstrucción de tejidos (3), enfermedades renales (4) y del sistema nervioso (5) entre otros (6,7,8). Como fuentes de aislamiento, se encuentran el cordón umbilical (CU), tejido adiposo (TA) y médula ósea (MO); entre estos, las células obtenidas del CU, especialmente de la gelatina de Wharton, representan una nueva alternativa para las terapias regenerativas, dado que su origen no compromete al paciente en el momento de la extracción con un procedimiento invasivo, como ocurre con las CMM adultas y tampoco genera problemáticas bioéticas (1). Dentro de las ventajas que tienen las CMM- de gelatina de Wharton, se encuentran su potencial proliferativo, clonogénico y una baja expresión de antígenos activadores de respuesta inmunitaria (9), adicionalmente la cantidad de CMM obtenidas es mayor, (aproximadamente 400 000 células) en comparación con otras fuentes como la MO (aproximadamente 10.000 células) y su cultivo *in-vitro* no requiere de altos costos. Además se está dando uso a un órgano que usualmente es tratado como desecho biológico (10–12).

A pesar de que las CMM- de gelatina de Wharton, podrían ser la mejor fuente, de uso clínico, para establecer un trasplante exitoso, es necesario aumentar el número de células mediante la expansión en cultivo *in vitro*

(13–15). Aunque el cultivo primario de estas células se mantiene en condiciones estables, simulando su nicho celular, el crecimiento de estas es limitado (16,17), durante este proceso, la tasa de replicación celular se reduce por daño en el ADN generado por estrés oxidativo y disminución en la producción de factores de crecimiento, que provocan un estado de fase G0/G1 (18,19). Consecuentemente, la morfología, el crecimiento y las capacidades funcionales se alteran, afectando la viabilidad del cultivo; este proceso se denomina senescencia celular (20,21), estado que inicia desde el primer pasaje y que se ve reflejado en un aumento de la enzima B-galactosidasa (20).

Para mitigar la senescencia celular y preservar el potencial de las CMM, se han propuesto diferentes estrategias, una de ellas es la adición de factores de crecimiento externos al medio de cultivo (22); El FGF-2 se considera un factor fundamental en la etapa del desarrollo embrionario por su capacidad proliferativa y de diferenciación (23,24), su aplicación exógena se ha descrito como un componente clave para la autorrenovación y la pluripotencialidad, regulando además la actividad de la telomerasa (23), este factor ha sido reportado, como promotor de la renovación celular y más recientemente ha sido descrito como supresor de la senescencia *in vitro* (25).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el posible efecto de FGF-2 sobre la senes-

cencia en cultivos de CMM y su papel en la regulación del estrés oxidativo. Se estimó la senescencia y el estrés oxidativo de las CMM tratadas con FGF-2 a dosis de 3, 5 y 7,5 ng durante los pases 5 y 7 mediante la detección de la actividad de la enzima β -galactosidasa y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Materiales y métodos

Materiales y reactivos

Medio Eagle modificado Dulbecco bajo en glucosa con rojo fenol (DMEM) (Sigma-Aldrich®) ref. d5523, factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2) (Peprotech®) ref.405-33, suero fetal bovino (SFB) (Gibco®) y 1% de penicilina-estreptomina (P/E) (Biowest). Kit de ensayo de detección de especies de oxígeno (fluorescencia naranja) (Abcam®) ref: ab186028.

Establecimiento del Cultivo

Las CMM fueron obtenidas a partir de gelatina de Wharton CMM-gW, de CU, donadas por la Universidad de Antioquia e identificadas como el vial #4 en pasaje #1. Fueron descongeladas el 09/10/2017 en el Laboratorio de cultivo celular, de la Universidad del Tolima, en condiciones de baño maría a una temperatura de 37°C durante 2 min; la solución celular se llevó a un tubo falcón de 15mL y se centrifugó a 1500 rpm

durante 3 min, luego, el sobrenadante fue removido y completado a un volumen de 1mL utilizando medio de cultivo, DMEM con rojo fenol, suplementado con 15% de SFB y 1% de P/E. El recuento de células se realizó mediante cámara de Neubauer y las células se sembraron en un Flask T75 (Flasks de 75 cm² - NEST®) a una densidad celular de 1 x 10⁶ y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. El primer cambio de medio, se realizó después de 4 días, cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 al 100%, se tripsinizaron con Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco®) y se cultivaron en flasks T23 (FlaskT25 cm² - TPP®) a una densidad de 2 x 10⁵ células en DMEM con 15% FBS y 1% de P/E. Pasadas 24 horas se realizó cambio de medio, el cual se realizó en cada pasaje hasta llegar al sexto pase. Para los ensayos experimentales, las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad celular de 1x10³, y se mantuvieron bajo las condiciones descritas anteriormente; para los tratamientos con FGF-2, este se añadió en el medio de cultivo en dos concentraciones diferentes: 3,5 y 7,5 ng, durante cada cambio de medio, es decir, cada 2 días, consecutivamente desde el establecimiento del cultivo.

Senescencia asociada a la actividad de la β -galactosidasa

Las CMM se cultivaron en placas de 96 pozos, luego se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 5 minutos, posteriormente se tiñeron durante 12h en solución X-Gal (1

mg/ml de 5-bromo-4-cloro3-indolil-D-galactopiranosido, 2 mM de MgCl₂, 5 mM de K₄F₆, 5 mM de K₃Fe₆, 150 mM de NaCl, disueltas en tampón de ácido cítrico/fosfato (concentraciones finales: ácido cítrico 20 mM, fosfato de sodio 40 mM, pH 5,5) .

Ensayo de estrés oxidativo

Se identificaron las ROS, durante los pasajes 5 y 7. Esta prueba se realizó en placas de 96 pozos, donde se cultivó una densidad de $2,5 \times 10^3$ células/cm², hasta obtener una confluencia entre 50-70%. Las células se tiñeron con el kit de ensayo de detección de ROS (Orange Fluorescence, Abcam) (ab18608) (abcam®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como control positivo, se utilizaron células tratadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0,2 mM en PBS (1x). Paralelamente, el grupo control fue tratado con la misma solución de PBS sin H₂O₂ durante 4 h. Finalmente las células se observaron por medio del Fluid™ Cell Imaging Station a intensidad de 570nm.

Viabilidad nuclear

La viabilidad celular, se determinó mediante cuantificación con tinción de azul de tripan, en una cámara Neubauer. La integridad nuclear se determinó con tinción de DAPI, identificando, los cambios morfológicos que presentan los núcleos y diferenciando aquellos que presentaban cromatina condensada y fragmentación, durante los pasajes 5 y 7.

Análisis estadístico

Se realizaron 5 pruebas en el cultivo de CMM-gW tratadas con las dos dosis de FGF-2 (3,5 ng y 7,5 ng) durante los pasajes 5 y 7; se llevaron a cabo 5 réplicas por experimento. Se utilizó el programa estadístico Infostat (versión 2014) donde la distribución de datos fue analizada con el test de Shapiro-Wilks, y el análisis de comparación entre grupos fue realizado con el test ANOVA con medidas repetidas para los datos paramétricos y el test de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. Las diferencias estadísticas fueron consideradas con un valor $p < 0,05$.

Resultados

Cultivo de CMM

Durante la aplicación de los tratamientos con FGF-2 no se observaron cambios en la morfología celular respecto al grupo control. Adicionalmente durante los pasajes 3, 4 y 5 no se detectaron cambios entre los tratamientos de FGF-2 y controles. Por otra parte, en el pasaje 4, se evidencia un incremento en la proliferación celular de 7% para el tratamiento 3,5 ng y de 18% en el tratamiento de 7,5ng, respecto al control.

La proliferación celular se fue reduciendo durante cada aumento de pasaje, este efecto se observó tanto en los controles como en

los tratamientos, que, aunque también presentaron una disminución de la viabilidad, el porcentaje de células en cultivo fue mayor en las células tratadas con FGF-2.

En el pasaje 5, el control presentó una confluencia (61%), el tratamiento de FGF-2_{3,5ng} (68%) mientras que el tratamiento de FGF-2_{7,5ng} permaneció estable (86%), para el pasaje 6 se presentó una tendencia al descenso de la proliferación, en el cultivo control

(39%), FGF-2_{3,5ng} (55%), FGF-2_{7,5ng} (79%); para el pasaje 7, la confluencia del cultivo control (34%), y los tratamientos FGF-2_{3,5ng} (53%), FGF-2_{7,5ng} (62%). Las dosis de FGF-2, muestran un mayor porcentaje de proliferación celular respecto al control y una disminución de la viabilidad del cultivo de manera acentuada demostrando que la aplicación de este factor, reduce el proceso de senescencia y muerte celular prolongando la vida útil del cultivo (figura 1).

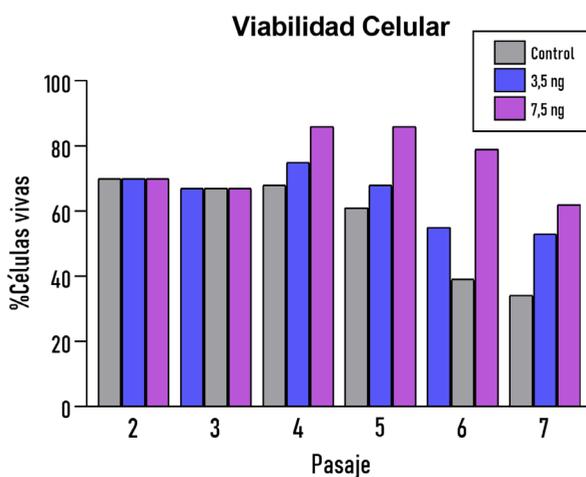


Figura 1. Viabilidad celular. Método Azul de tripán.

En el pasaje 5, la viabilidad celular, mostró, que los datos no tienen una distribución normal ($p < 0,0001$), por lo tanto se realizó la prueba de Kruskal Wallis, donde se evidenciaron núcleos sin daño en los grupos experimentales FGF-2_{3,5ng} y FGF-2_{7,5ng} con una significancia 99,5 ($p < 0,001$). Este resultado también se comprobó en el porcentaje de núcleos que presentan daño por fragmentación, donde las dos dosis de FGF-2,

presentan una diferencia significativa respecto al control positivo (en este caso se indujo a daño celular con H_2O_2) ($p < 0,01$). La viabilidad de núcleos en el pasaje 7, evidenció una diferencia significativa entre los tratamientos de FGF-2 y el control positivo, ($p < 0,001$). Estas diferencias no se presentan en el control negativo, que es el cultivo sin tratamientos de FGF-2 (figura 2 y 3).

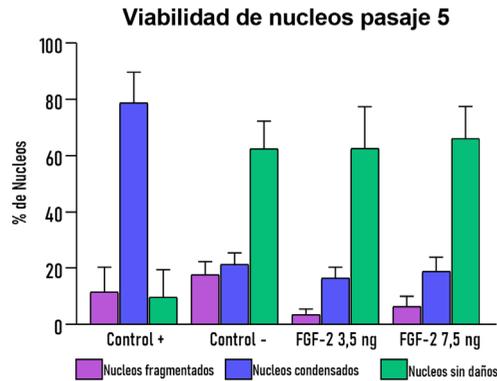


Figura 2. Viabilidad celular mediada por la fragmentación nuclear viabilidad de Núcleos, utilizando DAPI, en el pasaje 5.

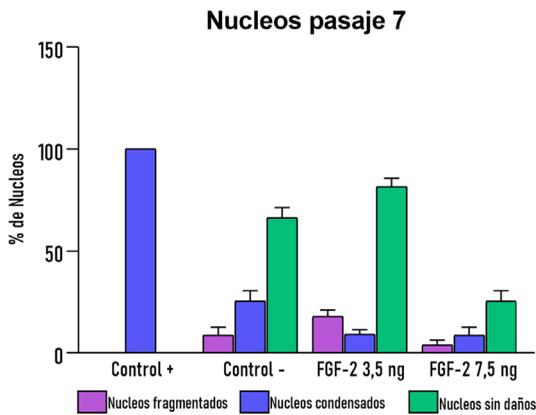


Figura 3. Viabilidad de Núcleos, utilizando DAPI, en el pasaje 7. Diferencias significativas (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

Senescencia asociada a la actividad de la β -galactosidasa

Para determinar la senescencia celular se analizó el porcentaje del área total de células senescentes en el pasaje 5 y pasaje 7; los resultados en el pasaje 5, muestran una diferencia significativa ($p < 0.0001$;) entre los tratamientos de FGF-2 con respecto al control positivo, cambios que se ven reflejados en la morfología, como aumento de

tamaño y forma alargada, que junto con la presencia del color azul generado por la producción lisosomal de la enzima β -galactosidasa, confirman el estado senescente del cultivo (Figuras 4 y 5). Esta diferencia significativa en el pasaje 7 fue ($p < 0,001$) entre FGF-2_{3,5 ng} con respecto a ambos controles (+) y (-), pero FGF-2_{7,5 ng}. El pasaje 7 no mostró una diferencia estadística, respecto al control negativo.

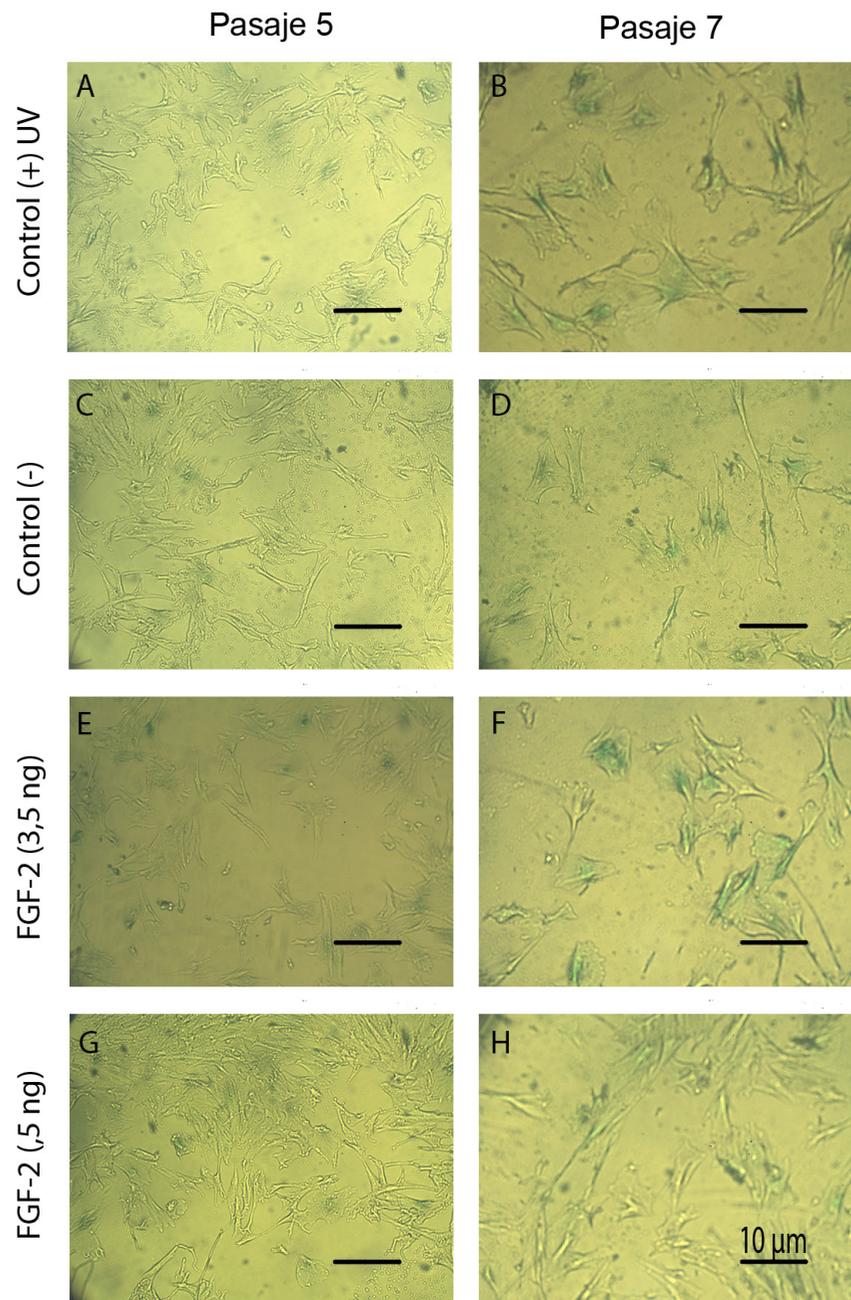


Figura 4. Ensayo de β -galactosidasa asociada a la senescencia.

A) Control positivo mediante UV, en el paso 5. B). Control positivo mediante UV, en el paso 7. C). Control negativo, en el pasaje 5. D) Control negativo en el pasaje 7. E) FGF-2 3,5 ng en el pasaje 5, F) FGF-2

3,5 ng en el pasaje 7. G) FGF-2 7,5 ng en el pasaje 5 H) FGF-2 7,5 ng en el pasaje 7. Micrografías tomadas en microscopio invertido a (20X), barra de escala = 10 μ m

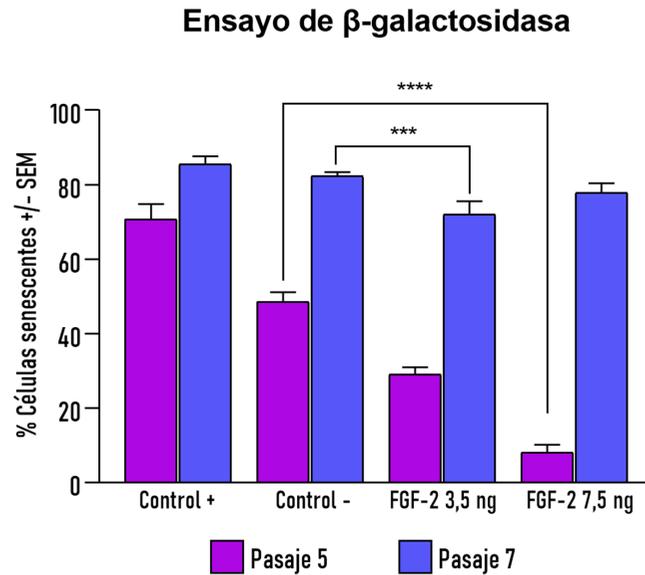


Figura 5. Ensayo de β -galactosidasa asociada a la senescencia. Diferencias significativas frente al control * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. Los datos se representan como media \pm SEM.

Ensayo de estrés oxidativo

El estado senescente ha sido asociado con la producción de radicales libres, por tal motivo se evaluó la producción de estos, tanto en el pasaje 5 como en el pasaje 7 donde se determinó a partir de la intensidad de la fluorescencia presentada por la actividad de ROS en las CMM. Se determinó que la producción de ROS se presen-

tó tanto en los controles positivos, como en los negativos (figura 6). En el pasaje 5, solo el tratamiento con FGF-2 7,5 ng mostró una disminución en la detección de ROS con respecto al control negativo ($p < 0,0001$). Lo mismo ocurrió en el pasaje 7, las CMM tratadas con FGF-2 7,5 ng demostraron una disminución significativa ($p < 0,0001$;) entre el control negativo y el positivo (Figuras 6, 7 y 8).

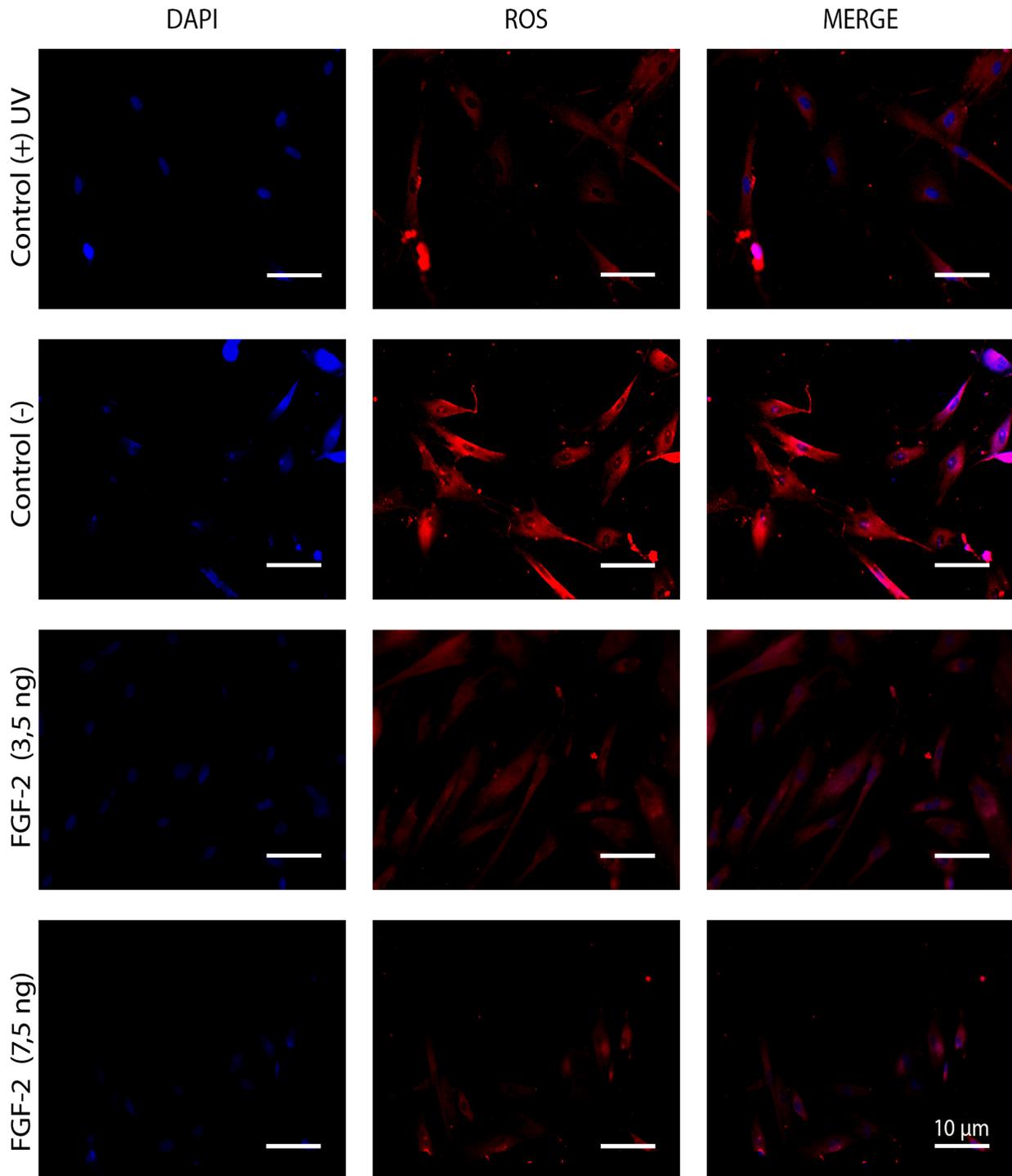


Figura 6. Estrés oxidativo de MSC en el Paso 5. Microfotografías (20X), barra de escala = 10 µm.

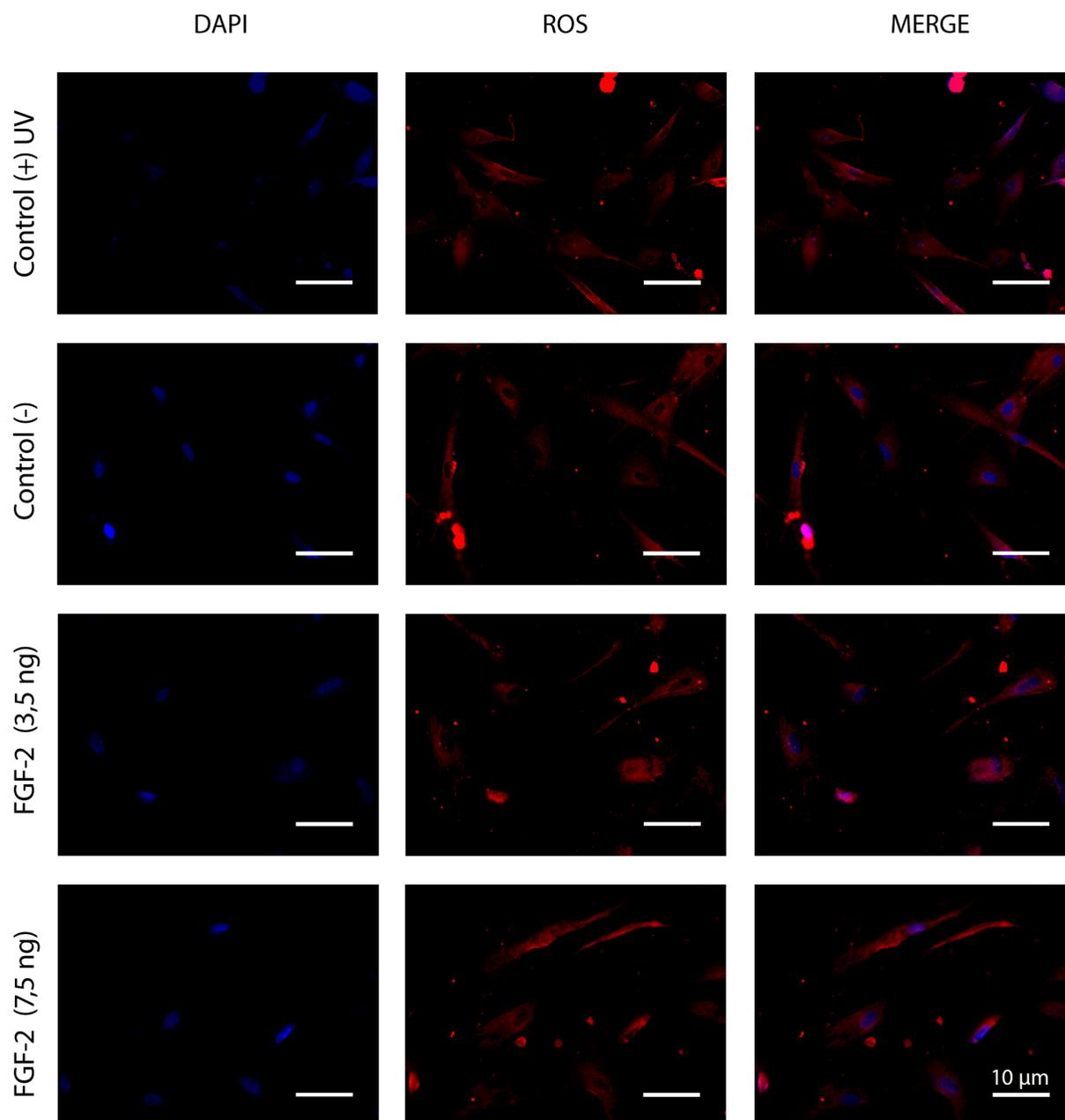


Figura 7. Estrés oxidativo de MSC en el Paso 7. Microfotografías, tomadas de Flouid™ (20X), barra de escala = 10 μ m

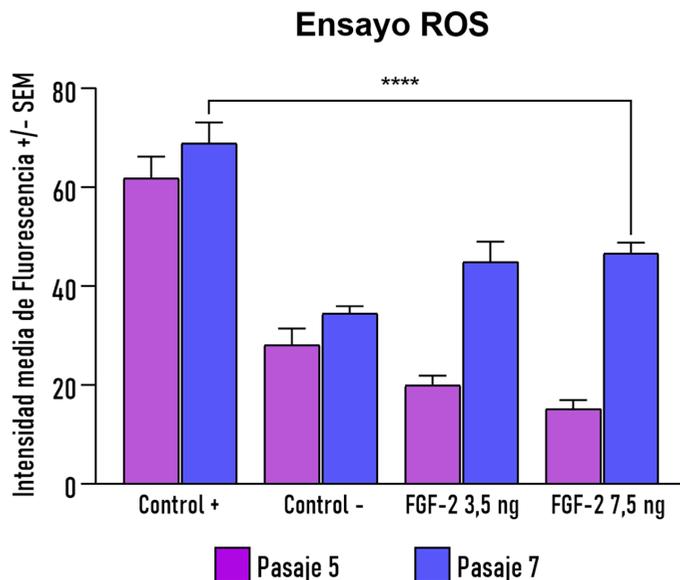


Figura 8. Estrés oxidativo de MSC en los pasajes 5 y 7. Diferencias significativas frente al control * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. Los datos se representan como media \pm SEM.

Discusión

El proceso de senescencia celular fue descrito por Hayflick en 1961, donde la capacidad proliferativa del cultivo disminuye progresivamente (26), presentando cambios en la morfología y funcionalidad de las células, el cual se asocia con una disminución de la enzima telomerasa y la producción de radicales libres (27–29). En las células senescentes aumenta el tamaño y se activa la actividad de la enzima β -galactosidasa (10,19,30), estas células, además, secretan factores como citoquinas, que afectan el crecimiento y la migración celular, experimentando una detención irreversible del crecimiento, pero siendo metabólicamente activas (19).

En las CMM cultivadas in-vitro, la activación de la senescencia se da de manera

prematura y se denomina senescencia replicativa, la cual se ve inducida por el estrés oxidativo, afectando no solo la proliferación celular, sino también la capacidad de las células de diferenciarse hacia linaje: osteogénico y adipogénico (19). En este estudio se encontró que la aplicación exógena FGF-2 en diferentes dosis, puede reducir este efecto. Sin embargo, en el cultivo a largo plazo se observó un aumento de células senescentes, tanto en los tratamientos con FGF-2 como en el control, este cambio se generó de manera consecuente con el aumento del pasaje celular (Figura 4).

La enzima β -galactosidasa utilizada como marcador de senescencia en este estudio, es una hidrolasa localizada en el lisosoma que cataliza la hidrólisis de terminal residuos de galactosa ligados a β en glicoproteínas

y glicolípidos (27). La actividad de la enzima β -galactosidasa, disminuye durante la proliferación y solo se detecta cuando hay inducción de senescencia, al haber un aumento lisosomal (28), por lo que se sugiere, que el aumento de vesículas lisosomales, productoras de esta enzima, son causados por una acumulación de proteínas, lípidos, ARN y ADN, que afectan las condiciones celulares.

Otros autores refieren que los cambios morfológicos asociados a la senescencia también pueden estar relacionados con un posible bloqueo en la división celular, dado por el acortamiento de los telómeros, y la activación de genes como el P53 (32–34).

Al realizar el ensayo de la producción de la enzima β -galactosidasa en el pasaje 5, se evidencia una diferencia significativa entre el control y tratamientos con FGF-2 y a pesar del aumento de células senescentes en todos los tratamientos, esta diferencia también se presenta en el pasaje 7 (Figuras 4 y 5). Este resultado concuerda con los generados en el estudio de Ito y colaboradores (25), donde se observó que el cultivo de CMM – obtenidas de medula ósea-, a largo plazo, detuvo su crecimiento celular en fase G1, y que la aplicación de FGF-2 suprimió durante los primeros 10 días de cultivo este efecto senescente; sin embargo, al día 50 el cultivo presentó 40% de senescencia, no obstante, en los tratamientos control (en ausencia de FGF-2) el porcentaje de células

senescentes a los 10 días fue del 20,5% y a los 50 días este porcentaje había aumentado al 57,6%; finalmente después de 150 días de cultivo, todas las células incluyendo las del tratamiento con FGF-2 mostraron una disminución en su capacidad proliferativa (25).

De esta manera se concluye con los resultados obtenidos, que el FGF-2 podría actuar como un atenuante del efecto senescente más no como un supresor de la senescencia en cultivo, dado a que actúa retrasando su efecto en el cultivo. A esto cabe resaltar la importancia que tiene la fuente de obtención de las CMM y una adecuada suplementación con factores de crecimiento para ampliar la vida útil del cultivo (31). Adicionalmente la suplementación de FGF-2 en el medio de cultivo no solo podría posponer la aparición de la senescencia, sino que también ayudaría a mantener la capacidad dediferenciación de las células.

Otros autores han reportado que la deficiencia de FGF2 acelera el proceso de senescencia, dado a que el FGF-2 contribuye a mantener activa la división celular, evitando que las células entren en fase G1, (35,36).

La senescencia celular puede ser inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son moléculas inestables y su acumulación conduce al estrés oxidativo, daño al ADN y daño a las proteínas, en un ambiente in-vivo, este proceso se ve mediado por con antioxidantes (27). El estrés oxidativo

resultante del aumento de la producción de ROS, puede causar daños severos a las macromoléculas biológicas, afectando la proliferación celular y provocando la senescencia celular (37,38). En este estudio se demostró que el FGF-2 en las CMM no solo contribuye al mantenimiento del cultivo, también promueve la regulación de las ROS intracelulares, dado que los resultados indican que en el pasaje 5 y 7, la diferencia entre los tratamientos con FGF-2 y controles, presentan diferencia significativa con respecto al control (-).

Sin embargo, las ROS se han implicado progresivamente en la regulación fisiológica y la coordinación de diferentes procesos celulares, su influencia en el destino de las células madre podría revelar cómo el envejecimiento de las células madre está relacionado con la enfermedad asociada con la edad (39), pero los niveles altos de ROS causan la senescencia de las células madre y muerte (40), por lo que se requieren estudios sobre las proteínas responsables de la senescencia y muerte celular en condiciones altas de ROS en células madre (41).

Conclusión

En este estudio, se encontró que el FGF-2 redujo el efecto del estrés oxidativo sobre el cultivo de las CMM a pesar que el efecto senescente y la producción de ROS es un estado irreversible del cultivo celular. Las dosis evaluadas contribuyeron a atenuar este proceso, prolongando la vida útil del cultivo y de esta manera promover a las CMM de gelatina de wharton por sus capacidades proliferativas, como un potencial terapéutico que junto con la exposición de factores de crecimiento, como el FGF-2, podrían mejorar su utilidad, en cultivo *invitro*, generando la cantidad necesaria para un trasplante exitoso. Adicionalmente la suplementación de FGF-2 en el medio de cultivo no solo podría retrasar la aparición de la senescencia, sino que también ayudaría a mantener la regulación de ROS en el cultivo, de esta manera se propone, ampliar los estudios en este campo de investigación.

Disponibilidad de datos

Los datos utilizados para respaldar los hallazgos de este estudio están disponibles del autor correspondiente a pedido razonable.

Declaración de financiación

Este trabajo fue financiado por EOCYT y la oficina de Investigación y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima, Proyecto Código 220220516

Conflicto de interés

Los autores señalan que no tienen ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

A la Universidad del Tolima ya su Dirección de Investigación y Desarrollo Científico y al Grupo de Modelos Experimentales

para las Ciencias Zoológicas por permitir el desarrollo de este proyecto de investigación; al grupo de Neurociencias de la Universidad de Antioquia por la donación de Células Madre Mesenquimales.

Referencias

1. Y. B. Cui et al., "Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis," *Behav. Brain Res.*, vol. 320, 2017, doi: 10.1016/j.bbr.2016.12.021.
2. J. Vasanthan et al., "Role of Human Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Therapy," *Cells*, vol. 10, no. 1, 2020, doi: 10.3390/cells10010054.
3. R. Yonemitsu et al., "Fibroblast Growth Factor 2 Enhances Tendon-to-Bone Healing in a Rat Rotator Cuff Repair of Chronic Tears," *Am. J. Sports Med.*, vol. 47, no. 7, 2019, doi: 10.1177/0363546519836959.
4. A. Aghajani Nargesi, L. O Lerman, and A. Eirin, "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for renal repair," *Curr. Gene Ther.*, vol. 17, no. 1, pp. 29–42, 2017.
5. B. Badyra, M. Sułkowski, O. Milczarek, and M. Majka, "Mesenchymal stem cells as a multimodal treatment for nervous system diseases," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 9, no. 10, 2020, doi: 10.1002/sctm.19-0430.
6. G. Z. Salazar Vargas, V. M. Neyra Chagua, C. R. Pitot Álvarez, A. M. Muñoz Jáuregui, and L. Á. Aguilar Mendoza, "Estudios en neurociencias: aportes para la investigación en cultivo de células madre mesenquimales," *Persona*, no. 21, 2018.
7. J. A. Guadix, J. L. Zugaza, and P. Gálvez-Martín, "Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular," *Medicina Clínica*, vol. 148, no. 9, 2017, doi: 10.1016/j.medcli.2016.11.033.
8. Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasher A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*. 2016 Apr 15;99:62-8. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.09.016. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26384580.
9. M. Kosinski et al., "Bone Defect Repair Using a Bone Substitute Supported by Mesenchymal Stem Cells Derived from the Umbilical Cord," *Stem Cells Int.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/1321283.
10. A. Can, F. T. Celikkan, and O. Cinar, "Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: a systemic analysis of clinical trials," *Cytotherapy*, vol. 19, no. 12, pp. 1351–1382, 2017.
11. M. Ziaei, J. Zhang, D. V Patel, and C. N. J. McGhee, "Umbilical cord stem cells in the treatment of corneal disease," *Surv. Ophthalmol.*, vol. 62, no. 6, pp. 803–815, 2017.
12. S. Roy, S. Arora, P. Kumari, and M. Ta, "A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells," *Cryobiology*, vol. 68, no. 3, 2014, doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.03.010.
13. A. C. Schnitzler et al., "Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: current technologies and challenges," *Biochem. Eng. J.*, vol. 108, pp. 3–13, 2016.
14. S. Ramos García, "Células madre: potencial asombroso, desafiante demanda," 2014.
15. Y. W. Eom et al., "The role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 445, no. 1, pp. 16–22, 2014.
16. S. H. Hong et al., "Stem cell passage affects directional migration of stem cells in electrotaxis," *Stem Cell Res.*, vol. 38, p. 101475, 2019.
17. C. Rubio-Vargas, J. Alcázar, and L. Francis-Turner, "Influencia del factor de crecimiento fibroblástico 2 en células madre in vitro Estudio de revisión.," *Actual. Biológicas*, vol. 41, no. 110, 2019.

18. W. Wei and S. Ji, "Cellular senescence: molecular mechanisms and pathogenicity," *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 12, pp. 9121–9135, 2018.
19. V. Turinetto, E. Vitale, and C. Giachino, "Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 7, p. 1164, 2016.
20. L. Chuaire-Noack, C. García-Morcote, and S. R. Ramírez-Clavijo, "Actividad β -galactosidasa asociada con la senescencia Chuaire-Noack, L., García-Morcote, C., & Ramírez-Clavijo, S. R. (2011). Actividad β -galactosidasa asociada con la senescencia en fibroblastos del estroma ovárico in vitro. *Revista Ciencias de La Salud*, 9," *Rev. Ciencias la Salud*, vol. 9, no. 1, pp. 17–31, 2011.
21. S. Saez-Atienzar and E. Masliah, "Cellular senescence and Alzheimer disease: the egg and the chicken scenario," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 21, no. 8. 2020, doi: 10.1038/s41583-020-0325-z.
22. K. Endo, N. Fujita, T. Nakagawa, and R. Nishimura, "Effect of fibroblast growth factor-2 and serum on canine mesenchymal stem cell chondrogenesis," *Tissue Eng. Part A*, vol. 25, no. 11–12, pp. 901–910, 2019.
23. Y. Zou, H. J. Tong, M. Li, K. S. Tan, and T. Cao, "Telomere length is regulated by FGF-2 in human embryonic stem cells and affects the life span of its differentiated progenies," *Biogerontology*, vol. 18, no. 1, pp. 69–84, 2017.
24. F. Kottakis, C. Polytarchou, P. Foltopoulou, I. Sanidas, S. C. Kampranis, and P. N. Tsiachlis, "FGF-2 Regulates Cell Proliferation, Migration, and Angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 Pathway," *Mol. Cell*, vol. 43, no. 2, 2011, doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.020.
25. T. Ito, R. Sawada, Y. Fujiwara, Y. Seyama, and T. Tsuchiya, "FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- β 2," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 359, no. 1, pp. 108–114, 2007.
26. L. M. de Souza, "Avaliação da indução de senescência e apoptose pelo tratamento com antraciclina em fibroblastos humanos deficientes no reparo por excisão de nucleotídeos," 2011.
27. M. Liu et al., "Adipose-derived mesenchymal stem cells from the elderly exhibit decreased migration and differentiation abilities with senescent properties," *Cell Transplant.*, vol. 26, no. 9, pp. 1505–1519, 2017.
28. W. Zhai et al., "Identification of senescent cells in multipotent mesenchymal stromal cell cultures: Current methods and future directions," *Cytotherapy*, vol. 21, no. 8. 2019, doi: 10.1016/j.jcyt.2019.05.001.
29. X. Meng, M. Xue, P. Xu, F. Hu, B. Sun, and Z. Xiao, "MicroRNA profiling analysis revealed different cellular senescence mechanisms in human mesenchymal stem cells derived from different origin," *Genomics*, vol. 109, no. 3–4, 2017, doi: 10.1016/j.ygeno.2017.02.003.
30. J. Franzen et al., "Senescence-associated DNA methylation is stochastically acquired in subpopulations of mesenchymal stem cells," *Aging Cell*, vol. 16, no. 1, 2017, doi: 10.1111/accel.12544.
31. J. A. Arévalo Romero, D. Páez Guerrero, and V. M. Rodríguez Pardo, "Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea.," *Nova*, vol. 5, no. 8, 2007, doi: 10.22490/24629448.380.
32. I. Fridlyanskaya, L. Alekseenko, and N. Nikolsky, "Senescence as a general cellular response to stress: a mini-review," *Exp. Gerontol.*, vol. 72, pp. 124–128, 2015.
33. R. A. Avelar et al., "A multidimensional systems biology analysis of cellular senescence in aging and disease," *Genome Biol.*, vol. 21, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s13059-020-01990-9.
34. D. N. Gala and Z. Fabian, "To Breathe or Not to Breathe: The Role of Oxygen in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Senescence," *Stem Cells Int.*, vol. 2021, p. 8899756, 2021, doi: 10.1155/2021/8899756.

35. J. Li et al., “Down-regulation of fibroblast growth factor 2 (FGF2) contributes to the premature senescence of mouse embryonic fibroblast,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 26, 2020, doi: 10.12659/MSM.920520.
36. U. Galderisi et al., “Efficient cultivation of neural stem cells with controlled delivery of FGF-2,” *Stem Cell Res.*, vol. 10, no. 1, 2013, doi: 10.1016/j.scr.2012.09.001.
37. A. Cieślak-Pobuda, J. Yue, H.-C. Lee, M. Skonieczna, and Y.-H. Wei, “ROS and oxidative stress in stem cells.” *Hindawi*, 2017.
38. R. A. Denu and P. Hematti, “Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016.
39. C. L. Bigarella, R. Liang, and S. Ghaffari, “Stem cells and the impact of ROS signaling,” *Development*, vol. 141, no. 22, pp. 4206–4218, 2014.
40. Y. Liu and Q. Chen, “Senescent Mesenchymal Stem Cells: Disease Mechanism and Treatment Strategy,” *Curr. Mol. Biol. Reports*, vol. 6, no. 4, 2020, doi: 10.1007/s40610-020-00141-0.
41. T. Kamiya, M. Courtney, and M. O. Laukkanen, “Redox-activated signal transduction pathways mediating cellular functions in inflammation, differentiation, degeneration, transformation, and death.” *Hindawi*, 2016.