

# MORFOFISIOLOGÍA DE CÉLULAS MADRE Y DIAGNÓSTICO SANGUÍNEO DEL CORDÓN UMBILICAL EN BOVINOS DURANTE LA GESTACIÓN. FLORENCIA-CAQUETÁ, COLOMBIA

*Stem Cell Morphophysiology and Umbilical Cord Blood Diagnosis in Bovines During Gestation. Florencia Caquetá, Colombia*

<sup>1-4</sup> Gustavo Adolfo Pimentel-Parra. <sup>2-4</sup> Betselene Murcia-Ordoñez y <sup>1-3-4</sup> Luis Carlos Chaves-Moreno.

*Estudiante de Biología <sup>2</sup> Bióloga MsC Biológicas, <sup>3</sup>Zootecnista MsC. Estudios Amazónicos. <sup>4</sup>Grupo de Investigación BYDA. Universidad de la Amazonia, Calle 17 Diagonal 17 con Carrera 3F. Barrio Porvenir Florencia Caquetá. l.chaves@udla.edu.co teléfono 3184019771. lucachamos@gmail.com*

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue realizar una caracterización morfofisiológica de las células presentes en el cordón umbilical (CU) y establecer los valores sanguíneos y diagnóstico de anemias presente en la sangre del cordón umbilical (SCU) en bovinos durante la preñez. Se recolectaron y analizaron un total de 32 muestras de tejido y sangre de bovinos sacrificados, la evaluación morfológica se realizó mediante tinción Wright y los valores sanguíneos se determinaron por medio de un contador automático de hematología BC-2800 Vet. Hematology en el laboratorio clínico veterinario de la Universidad de la Amazonia, Colombia. En todas las muestras se identificaron células madre Huvec y de la gelatina de Wharton sin importar el periodo de gestación así como la presencia de anemia macrocítica normocrómica (AMN), resultado de pérdidas hemáticas secundarias, con valores promedio de 66.9 (fL); para volumen corpuscular medio (VCM) y 33.2 en concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM); se puede concluir que los bovinos neonatales presentaban AMN de tipo no hematológico por causa de hemorragias feto-maternas (hipoxia), por lo que se recomienda realizar este tipo de estudios en partos normales con un seguimiento adecuado de los bovinos gestantes.

**Palabras clave:** Cordón umbilical; tinción Wright; células madre Huvec; células madre de la gelatina de Wharton; periodo de gestación; anemia macrocítica normocrómica; hipoxia.

## ABSTRACT

The objective of this research was to conduct a morpho physiological characterization of the cells presented in the umbilical cord (CU) and establish blood levels and the diagnosis of anemias presented in the umbilical cord blood (UCB) in cattle during pregnancy. 32 samples of tissue and blood of slaughtered cattle were collected and analyzed, morphological evaluation was performed by Wright staining and the blood values were determined by an automatic counter of hematology Vet BC-2800. In the veterinary clinical laboratory of Universidad de la Amazonia-Colombia. In all the samples stem cells Huvec and Wharton's jelly were identified regardless of the gestation period and the presence of macrocytic anemia normochromic (AMN), as a result of secondary blood loss, with an average of 66.9 (fL) for a mean corpuscular volume (MCV) and 33.2 in mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). It can be concluded that neonates cattle showed AMN of type non-hematologic because of fetal-maternal hemorrhage (hypoxia), therefore it is recommended to do these types of studies in normal births with appropriate monitoring of pregnant cattle.

**Key words:** Umbilical cord; Wright staining; Huvec stem cells; stem cells Wharton's jelly; gestation period; macrocytic normochromic anemia; hypoxia.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha surgido un nuevo campo relacionado con la biología, más aún con la medicina, llamado ingeniería tisular [7], que se define como la construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización médica para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos, a partir de una fuente adecuada de células funcionales y viables [1] así como de biomateriales y señales moleculares de distinta naturaleza.

Estas células funcionales y viables son las que normalmente se llaman células madre, que poseen capacidad clonogénica de autorenovación y de diferenciación en múltiples linajes celulares, permitiendo clasificarlas en células madre embrionarias (CME) y células madre adultas (CMA) [6].

Las primeras son pluripotentes y se encuentran en las primeras fases del desarrollo embrionario derivándose del blastocisto de los embriones de mamíferos, mientras que las CMA son células pluripotenciales, multipotenciales o unipotenciales identificadas en casi todos los tejidos del organismo como células madres mesenquimales (CMM), progenitoras adultas multipotentes y hematopoyéticas [5, 10, 16] encontradas en el tejido conectivo de diversos órganos (cerebro, piel, músculo cardíaco y esquelético, retina, oído interno y el páncreas) [14, 26], la sangre periférica, la médula ósea, [39], el cordón umbilical (CU) [36], y en algunos tejidos del feto [17, 18].

Las CMA están comprometidas a diferenciarse en el propio linaje con el fin de mantener, generar y reemplazar las células diferenciadas de cada tejido, como consecuencia de la autorenovación tisular fisiológica o de la respuesta al daño tisular secundario [3,25]. Sin embargo, las CMM (CMA) son pluripotenciales al igual que las CME por lo que tienen la capacidad de generar cualquier célula diferenciada del cuerpo [3,29].

A pesar de que es una nueva línea de investigación a nivel mundial [7], en Colombia, los procedimientos relacionados con el estudio de la biología de células madre son incipientes, tanto que se requiere realizar investigaciones básicas en cuanto a morfología, contenido proteico y otros parámetros químicos [6]. Como causa de esto, una alternativa es el aislamiento de estas células en especies domésticas. Por esta razón el presente trabajo buscó realizar una determinación morfofisiológica de las células presentes en el CU, establecer valores sanguíneos y diagnóstico de anemias de la sangre del CU en bovinos (*Bos indicus*) durante los tres trimestres de la preñez teniendo en cuenta los diferentes factores que intervienen durante la misma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

Esta investigación se llevó a cabo en la ciudad de Florencia-Caquetá, Colombia, ubicada a 075° y 01° 4°N, Piedemonte

Amazónico, altitud de 242 msnm, temperatura promedio de 25°C y humedad relativa del 80% [19] (FIG 1). Las muestras fueron donadas por la Compañía de Fiestas y Mataderos del Caquetá S.A. "COFEMA" obtenidas bajo condiciones de esterilidad y procesadas en el laboratorio clínico Veterinario de la Universidad de la Amazonia, con apoyo económico de la Vicerrectoría de investigación.

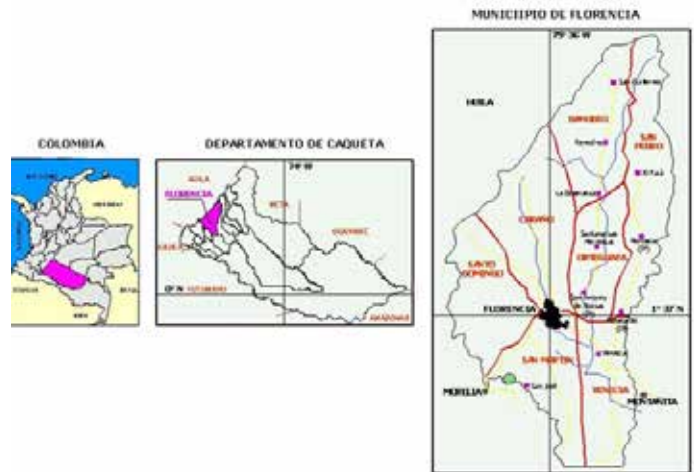


FIGURA 1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

### Métodos

#### Transporte y conservación de las muestras

Para el transporte y conservación de las muestras se implementaron los protocolos establecidos [12], donde se indica que el material biológico (CU) debe ser retirado con ayuda del equipo de disección, lavados exhaustivamente con suero fisiológico a presión con el fin de eliminar restos orgánicos que pueden generar contaminación, almacenados en bolsas herméticas y depositados en el contenedor de refrigeración Marca Challenger línea quantum modelo CR300 Fabricante Challenger S.A.S Colombia, a temperatura de 2 y 22°C durante máximo 12 horas. Las muestras de sangre (6 mL) fueron recolectadas en tubos con anticoagulante EDTA (Vacurette®, Greiner Bio one, EUA) obtenidas *in situ* a través de una incisión en cada uno de los CU y codificados para su respectivo estudio.

#### Morfo- fisiología (composición y cuantificación celular)

Para establecer la composición celular de la SCU se utilizó las recomendaciones de Lewis-Mitchell y col. [23] y Pérez-Écija y col. [28], que consiste en realizar extendidos de sangre en placas portaobjetos de 75 x 25 mm, una vez secos los frotis sanguíneos, se llevan al soporte de coloraciones donde se aplica tinciones de tipo Romanowsky (colorante Wright y el buffer Giordano) durante 4 minutos cada uno, terminadas las coloraciones se lavan las placas con chorro de agua continuo, se limpian y se dejan secar

en posición vertical para su observación en el microscopio óptico binocular profesional Marca Scientific Ref XSZ-N107 México, con objetivo de inmersión. El hemograma se realizó mediante un contador automático de hematología BC-2800 Vet. Hematology.

Para determinar la composición celular de los CU se utilizó la metodología propuesta por Ávalos [7] que consiste en diseccionar longitudinalmente, con ayuda de pinzas y tijeras esterilizadas, los CU a través de la vena umbilical, donde se efectúa un raspado del tejido interno y se realiza un extendido del mismo en placas portaobjetos, posteriormente se aplica la tinción de tipo Romanowsky previamente descrita y se observan al microscopio óptico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Morfología de las células madre mesenquimales a partir de cordón umbilical

Se trabajó un total de treinta y dos muestras de CU (entre el primero y noveno mes de gestación) donde se identificó células diferenciadas, similar a las células de la gelatina de Wharton con una morfología fusiforme (FIG. 2) y células Huvec con morfología ovalada o redondeada (FIG. 3), que según Ávalos [6], son las características principales para reconocer estos tipos de CMA que se encuentran específicamente en la matriz de los vasos del CU y que se caracterizan como CMM pluripotentes [3] con capacidad de proliferación y potencial de diferenciación [8, 36]

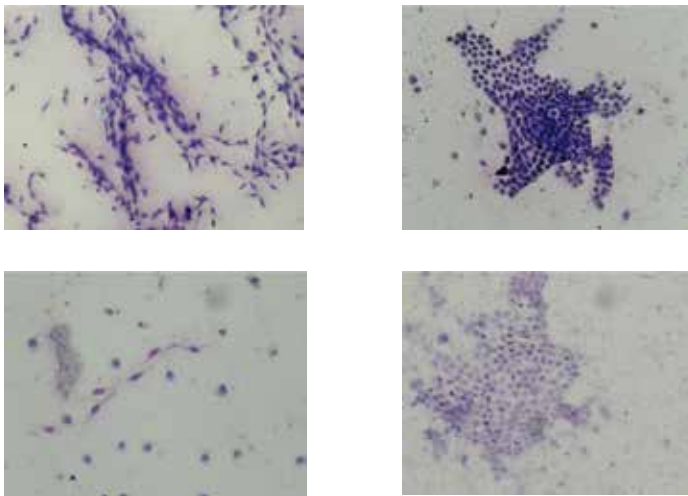


FIGURA 2. CÉLULAS WHARTON

### Análisis sanguíneo de la Sangre de Cordón Umbilical (SCU) en los 9 meses de gestación

Respecto al conteo diferencial (TABLA I), se observaron todos los tipos celulares de la sangre independientemente del periodo de gestación [22,33], en el cual los resultados obtenidos para el recuento eritrocitario presentan una distribución entre

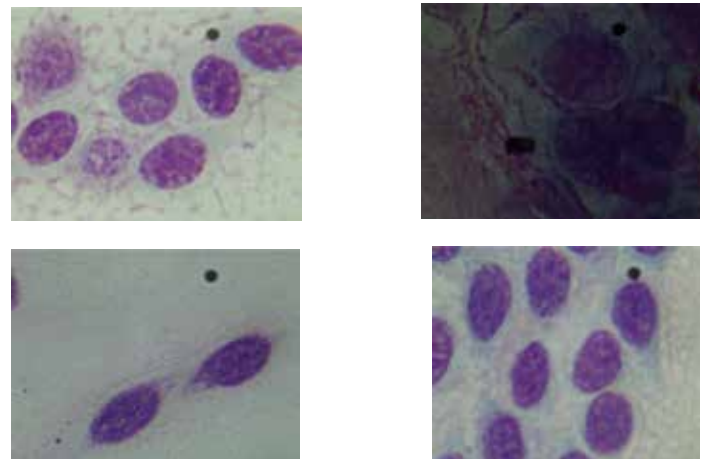


FIGURA 3. CÉLULAS HUVEC

1,9 y 6,9 mill/ $\mu$ L para los nueve meses de gestación, donde las muestras del primer y segundo mes se encuentran por debajo del rango según lo reportado en la literatura [2, 12, 21, 30] que establece un valor entre 5,0 -10mill/ $\mu$ L, y hasta mitad del segundo mes empiezan a alcanzar la normalidad (4,7 mill/ $\mu$ L), lo cual es ocasionado por la producción inadecuada de eritrocitos [34] debido a que el embrión hasta la mitad del segundo o tercer mes de gestación empieza la producción de eritrocitos en el hígado que es el órgano responsable de la formación de los mismos en el feto durante los primeros meses de gestación [11, 20, 24]. Entre los cinco meses y medio e inicios del sexto mes se puede observar nuevamente una disminución de la masa eritrocitaria, posiblemente a que el hígado y el bazo ya solo conservan vestigios de su actividad hematopoyética, es decir su producción de eritrocitos es mínima ya que se presenta una hematopoyesis visceral generada por el timo, los ganglios linfáticos y los riñones [20].

En relación a las células rojas, el hematocrito (HCT) y la hemoglobina (HGB) presenta una secuencia que inicia con disminución en el primer mes de gestación (rango entre 12,3 y 13% HCT y 4,1 a 4,3 g/dl HGB), normalidad en los siete meses siguientes (entre 22 y 27% HCT y 7,3 y 14,3 HGB) [13, 21] y finalmente un aumento en el noveno mes; este patrón se debe a que en el primer mes la producción de hemoglobina por el embrión es muy baja y en el noveno mes la hipoxia tisular generada en las madres y fetos sacrificados en este estudio, producen un estímulo hematopoyético, dando como resultado un incremento de la eritropoyesis en el hígado y el bazo además de la hematopoyesis visceral [20].

Se evidenció la presencia de anemia macrocítica normocromica (AMN) con base en la concentración de Hb (VCM y CHCM) de SCU de bovinos en los periodos de la preñez (TABLA II), que según Páez y col. [27], Rutter [31] y Villasmil-Morales [38], los niveles de la misma durante el periodo de gestación suele variar debido a los cambios fisiológicos que sufre la madre, la placenta y el feto, así como los grandes requerimientos que necesita para su desarrollo, como es el hierro y la vitamina B12 o folatos los cuales son esenciales para la síntesis de los ácidos nucleicos, causa principal para este tipo de anemia [9,15, 32].

**TABLA I**  
**RECuento DIFERENCIAL DE GLÓBULOS BLANCOS EN SCU DE BOVINOS**

N° de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Referente**
Mes de gestación		1			2		2 1/2		3		3 1/2		4		5		
Neutrófilos %	21,3	20,8	21,7	19,5	15,1	20,9	21,5	18,6	20,1	21,6	25,4	27	19,5	23,2	40	42	15-45
Linfocitos %	70,4	71,7	69,2	71,1	77,1	69,3	65,8	75,3	72,3	69,4	63	62,4	73,1	68,1	50,6	50,1	25-75
Eosinófilos %	0	2	1,2	0,8	0	1,4	0	0	0,1	0,2	3,3	1,4	0	0,6	0,4	0,7	0-20
Monocitos %	8,3	5,5	7,9	8,4	7,8	7,4	12,7	6,1	7,5	8,8	8,3	9,2	7,2	7,8	9	7,1	0-8
Basófilos %	0	0	0	0,2	0	1	0	0	0	0	0	0	0,2	0,3	0	0,1	0-2
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

N° de muestra	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	Referente**
Mes de gestación	5	5 1/2		6			7			8		8 1/2			9		
Neutrófilos %	42,3	36	23	25,7	24,4	17,2	18,4	18,9	20,3	20,8	20,5	31	22	23	23,8	21	15-45
Linfocitos %	49,8	58	70	71,2	70,6	74	73,5	72,8	70,3	70,3	69,8	64	73	73	70,1	74,9	25-75
Eosinófilos %	0,9	2	4	2,1	3	1	0,7	0,8	1	1	2	1	3	2	2	1,3	0-20
Monocitos %	6,8	3	2	1	1,2	7,8	7,2	7,5	8,4	7,9	7,7	3	1	2	3,1	2	0-8
Basófilos %	0,2	1	1	0	0,8	0	0,2	0	0	0	0	1	1	0	1	0,8	0-2
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

\*valores por encima del rango. \*\* [2, 13, 20, 30].

**TABLA II**  
**COMPONENTES DE LA SCU DE BOVINOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS**

N° de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Referente **
Mes gestación		1			2		2,5		3		3,5		4		5		
Hematocrito %	13,0	12,3	12,9	27,0	27,0	27,0	31,0	40	39	39,5	34,5	33,9	38,0	36,0	41,0	42,1	24-46
Hemoglobina (g/dl)	4,3	4,1	4,3	9,0	9,0	9,0	10,3	13,3	13,0	13,2	11,5	11,3	12,6	12,0	13,6	14,0	8-15
Eritrocitos (x106/μL)	2,0	1,9	2,0	4,5	4,1	4,3	4,7	5,3	5,9	5,6	6,4	5,5	5,7	5,6	6,1	6,1	5-10
Leucocitos (x 103/μL)	18,9	18,3	18,8	12,2	15,7	14,0	7,5	17,0	14,0	13,2	14,2	4,2	14,0	7,0	11,7	12,0	4 - 12
VCM (fL)	65,6	64,7	64,5	60,0	66,6	62,7	66,2	75,6	66,6	70,5	53,7	62,2	67,0	64,3	68,9	69,0	40 -60
HCM (pg)	21,7	21,5	21,5	20,0	22,2	20,9	22,0	25,1	22,2	23,6	17,9	20,7	22,2	21,4	22,2	22,9	11-17
CHCM (g/L)	33,0	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,2	33,2	33,3	33,4	33,3	33,3	33,1	33,3	33,1	33,2	30-36

N° de muestra	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	Referentes**
Mes de gestación	5	5,5	6			7			8			8,5		9			
Hematocrito %	41,5	22,0	26,0	32,0	31,9	31,1	29,0	32,2	39,8	40,8	42,0	43,0	40,0	47,0	48,0	47,5	24-46
Hemoglobina (g/dL)	13,8	7,3	8,7	11,0	11,0	10,3	9,6	10,7	13,2	13,6	14,0	14,3	13,3	15,6	16,0	15,8	8-15
Eritrocitos (x 106/ μL)	6,2	4,0	4,6	5,1	5,2	4,9	5,1	5,2	6,9	6,6	6,8	5,6	5,8	6,3	4,5	5,4	5-10
Leucocitos (x 103/ μL)	11,8	15,0	6,7	6,9	6,7	11,0	12,0	11,5	7,9	18,8	9,4	8,1	6,7	8,5	7,5	8,0	4 - 12
VCM (fL)	66,9	55,7	56,5	62,7	61,3	63,2	60,4	61,9	57,5	61,6	61,7	77,3	69,3	74,5	106	87,9	40 -60
HCM (pg)	22,2	18,6	18,8	20,9	20,0	21,0	20,0	20,5	19,1	20,5	20,5	25,8	23,1	24,7	35,3	29,2	11-17
CHCM ((g/dL)	33,2	33,3	33,3	33,3	33,3	33,1	33,1	33,2	33,1	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	33,1	33,3	30-36

\*valores por debajo del rango. \*valores por encima del rango. \*\* [2, 13, 20, 30].

En los valores de referencia para SCU de bovinos [4] se precisa que las causas de anemias secundarias a pérdidas hemáticas que se originaron pre parto (hemorragia feto-materna), y posparto (hemorragias interna y/o exceso de extracciones sanguíneas), generados por el trato que recibieron las madres y los fetos, en y después del sacrificio, originando así, alteraciones homeostáticas (se producen grandes hemorragias) que influyen en la producción de hemoglobina de los fetos (hipoxia) [9, 15, 32, 35, 37], y que según Rutter [31], en un parto normal no ocurre debido a que las contracciones uterinas disminuyen el flujo sanguíneo generando un periodo de hipoxia corto, que incide en la acidosis, glucolisis anaeróbica y una producción de lactatos donde el feto disminuye la frecuencia cardíaca y es capaz de redistribuir el flujo sanguíneo para mantener una provisión suficiente de oxígeno.

Dentro de la serie blanca, los resultados obtenidos para leucocitos fueron superiores hasta los 3 meses y medio de gestación con valores entre 12,2 y 18,9  $\times 10^3/\mu\text{L}$  siendo mayor el incremento en el mes uno. Estos resultados se encuentran por encima del promedio (leucocitosis) según lo reportado por Reyes [30], Aramendía y col. [2], Gasque [13], Latimer y col. [21], quienes estipulan un rango de normalidad entre 4-12 $\times 10^3/\mu\text{L}$ . En los meses restantes a la gestación presentan una normalidad entre 4,2-12 $\times 10^3/\mu\text{L}$ , con variaciones en el cuarto mes donde empieza la producción hematopoyética por parte de la médula ósea y en el octavo donde está ya es el órgano principal de la producción de células sanguíneas [20]

El recuento de linfocitos presentó una distribución normal dentro del rango establecido según la literatura [2, 13, 30] que estima un valor entre 45-75 %, con excepción de dos muestras entre 2 meses y medio (77,1%) y 3 meses (75,3%) de gestación, datos que no se encuentran muy alejados del rango normal y que podrían ser ocasionados debido a que los linfocitos de la sangre periférica se identifican en los fetos bovinos al segundo mes de gestación y las células B InM+ a finales del segundo y comienzo del tercer mes.

El recuento de monocitos presentó normalidad para todos los meses de gestación según lo reportado por Latimer y col. [21] que estima un valor entre 0-8 %, con un promedio de 6,3 %, con algunos datos atípicos en los primeros 5 meses de gestación, pero no muy lejanos al rango normal (8,3-8,4%). Sin embargo se encontraron cuatro valores de 12,7% (2 meses y medio), 8,8% (3 mes) 9,2% (4 mes), y 9 % (5 mes), que podrían ser ocasionados por la formación de células sanguíneas por el hígado, el timo y los ganglios linfáticos en este intervalo de tiempo [11, 20, 24].

Las demás variables de la serie blanca contempladas en este estudio presentaron valores con tendencia a la normalidad en los nueve meses de gestación. Estas variables fueron neutrófilos con un promedio de 24,0 %, distribución entre 15,0 y 42,3 %. Basófilos con un promedio de 0,3%, distribución entre 0 y 1%. Y eosinófilos con un promedio de 1,2 %, distribución entre 0-4 % [21].

## CONCLUSIONES

Según los resultados detectados se obtuvo valores de bovinos neonatales con presencia de anemia macrocítica normocrómica de tipo no hematológico para todas las muestras analizadas, observándose una significativa relación entre el momento del sacrificio de las madres y la distribución del flujo sanguíneo en los fetos, así como en la morfología celular que son similares en todos los periodos de gestación, a diferencia del periodo gestacional y la cantidad de hemoglobina, que no presentan una relación notable (como se esperaba), ya que los niveles de VCM Y CHCM no presentaron mayor variación sin importar el mes de gestación (TABLA II), por lo que se recomienda que estudios de este tipo se lleven a cabo en partos normales durante un periodo adecuado y con control y seguimiento de las madres gestantes para evaluar su estado nutricional, alteraciones por estrés, alteraciones fisiopatológicas, y edad gestacional.

## AGRADECIMIENTO

Los autores de esta investigación agradecen su colaboración para la finalización del mismo a Vicerrectoría de Investigaciones, al personal del laboratorio clínico Veterinario Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de la Amazonia, a la Compañía de Ferias y Mataderos del Caquetá S.A. "COFEMA" por la donación de los fetos

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALAMINOS, M; SANCHEZ-QUEVEDO, MC; MUÑOZ-AVILA, JI; GARCIA, JM; CRESPO, PV; GONZÁLEZ-ANDRADE, M; CAMPOS, A. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J. Cell. Physiol.* 211 (3): 692-698. 2007.
- [2] ARAMENDÍA, ME; HAREAU, M; KONRATH, T. Recordatorio Histológico. Interpretación De Un Hemograma Completo Y Su Aplicación Práctica. Informe. Laboratorio clínico del programa de Medicina Veterinaria Zootecnista. Áreas Ciencias Biológicas Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 76 pp. 2009.
- [3] ARBÓS, A; NICOLAU, F; QUETGLAS, M; RAMIS, JM; MONJO, M; MUNCUNILL, J; CALVO, J; GAYÀ, A. Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunol.* 32 (1): 3-11. 2013.
- [4] ARCA, G; CARBONELL-ESTRANY, X. Anemia neonatal. Protocolos de la AEP. Servicio de Neonatología. Agrupación Sanitaria. Hospital Clínic-Hospital Sant Joan de Déu-Barcelona. Asociación Española de Pediatría, Pp 362-371. 2008.

- [5] ARÉVALO, JA; PÁEZ, DM; RODRÍGUEZ, VM. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. **NOVA – Publ. Científ. Cien. Bioméd.** 5 (8): 177-84. 2007.
- [6] ARIAS, ME; FELMER, R. Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: Potenciales aplicaciones en biomedicina. **Arch. Med. Vet.** Valdivia. 41 (3): 185 195. 2009.
- [7] ÁVALOS, MV. Evaluación de la viabilidad y caracterización genética de células endoteliales transdiferenciadas a partir de células madre de la gelatina de Wharton. Facultad de Medicina. Departamento de Histología. Universidad de Granada. Editorial de la Universidad de Granada. Tesis de Grado. 279 pp. 2009.
- [8] CAN, A; KARAHUSEYINOGLU, S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. **Stem Cells.** 25 (11): 2886-2895.2007.
- [9] CHUAQUI, B; DUARTE, I; GONZÁLEZ, S; HELMAR, R. Trastornos Circulatorios: Hipoxia General y Anemia Local. **Manual De Patología General**, 2ª Ed. Chile, Santiago. Editorial de la Universidad Católica De Chile. 191 pp. 1999.
- [10] FLORES-FIGUEROA, E; MONTESINOS, JJ; MAYANI, H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. **Rev. Invest. Clín.** 58 (5): 498-511. 2006.
- [11] FUENTES-ARDERIU, X; CASTIÑEIRAS-LACAMBRA, MJ; QUERALTÓ-COMPAÑÓ, JM. Alteraciones de la eritropoyesis y del eritrocito, M.J. Merino plaza. **Bioquímica clínica y patología molecular II** 2ª Ed. España, Barcelona. Editorial Reverté. 540 pp. 1998
- [12] GARRIDO, G; MATESANZ, R. Plan Nacional de Sangre de Cordón Umbilical (PNSCU). Organización Nacional de Trasplantes (ONT). 87 pp. 2008.
- [13] GASQUE, GR. Características generales del ganado bovino. **Enciclopedia Bovina.** Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 234 pp. 2008.
- [14] GIL-LOYZAGA P.E., Células madre y su cultivo. Aplicaciones en medicina regenerativa. En: **Cultivo de Células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa**, Editorial Visión Libros. Madrid. 396 pp. 2011.
- [15] HERNÁNDEZ, MA. Anemias en la infancia y adolescencia. Clasificación y diagnóstico. **Pediatría integral.** 16 (5): 357-365. 2012.
- [16] HERNÁNDEZ-RAMIRÉZ, P; DORTICOS, E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. Artículo de revisión. **Rev. Hematol. Inmunol. Hemote.** 20 (3).2004. En Línea: [http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol20\\_3\\_04/hih01304.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol20_3_04/hih01304.htm). 25/08/2015.
- [17] HU, Y; LIAO, L; WANG, Q; MA, L; MA, G; JIANG, X; ZHAO, RCH. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. **J. Lab. Clin. Med.** 141 (5): 342-349. 2003.
- [18] IN'T ANKER, PS; SCHERJON, SA; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C; NOORT WA; CLAAS, FH; WILLEMZE, R; FIBBE, WE; KANHAI HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, 102 (4): 1548–1549. 2003.
- [19] INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI (IGAC). Informe de gestión. Imprenta Nacional de Colombia. 120 pp. 2007.
- [20] JAIME-PÉREZ, JC; ALMAGUER, DG. Célula madre hematopoyética y hematopoyesis. **Hematología la sangre y sus enfermedades** 2ª Ed. México. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. 330 pp. 2009.
- [21] LATIMER, K.S., MAHAFFEY, E.A., PRASSE, K.W. Leukocytes. **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology.** 4th. Ed. Blackwell Publishing, USA. 473 pp. 2003.
- [22] LE VAY, D. Reproducción y Desarrollo: Desarrollo del Embrión. **Anatomía y Fisiología Humana.** 2ª Ed. España, Barcelona. Editorial Paidotribo. 344 pp. 2008.
- [23] LEWIS-MITCHELL, SH; BAIN, BJ; BATES, I. Métodos de Preparación y Tinción de las Extensiones Sanguíneas y de la Médula Ósea. **Dacie y Lewis Hematología Práctica** 10ª Ed. Madrid España. Editorial Elseiver. 632 pp. 2008.
- [24] LÓPEZ-SÁNCHEZ, M. Caracterización de las unidades de sangre de cordón procedentes de donantes con patología obstétrica. Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia. España. Tesis Doctoral. 202 pp. 2007.
- [25] MATESANZ, R; LAZO- ZBIKOWSKI, PA; SÁNCHEZ-GARCÍA, IJ. Perspectiva Histórica y Trasplante en el Siglo XXI. **Medicina regenerativa y células madre.** Madrid, España. Editorial CSIC. 240 pp. 2010.
- [26] NOMBELA, C. Multipotencialidad de las células madres adultas. Células madre. Encrucijadas biológicas para la Medicina: del tronco embrionario a la regeneración adulta. Madrid: Editorial EDAF, S.L. 229 pp. 2007.
- [27] PÁEZ, PA; CAMPOS, G, R; GIRALDO-PATI, L. Suplementación y metabolismo de hierro en neonatos bovinos en condiciones de trópico. **Acta Agron.** 62 (1): 59-65. 2013.
- [28] PÉREZ-ÉCIJA, R A; ESTEPA-NIETO, J C; MENDOZA, F. J. Citología sanguínea en pequeños animales. Hallazgos más comunes y su interpretación I. Análisis y estudio del frotis sanguíneo. Argos: **Inf. Vet.** 115 (1-2): 60-63. 2010.

- [29] RAFF, M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact?. **Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.**, 19 (6): 1-22. 2003.
- [30] REYES-PINOS, ME. Análisis de parámetros sanguíneos y factores maternos que influyen sobre la calidad del calostro bovino. Universidad de las Américas, Facultad de Ciencias de la Salud. Trabajo Especial de Grado. 155 pp. 2015.
- [31] RUTTER, B. Neonatología Bovina. 25- Parto. Monografía. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Sitio Argentino de Producción Animal. 13 pp. 2010. En Línea: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/cria\\_parto/06-Neonatologia.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_parto/06-Neonatologia.pdf). 25/08/2015.
- [32] SANDOVAL, E; BARRIOS, M; MORALES, G; CAMACARO, O; DOMÍNGUEZ, L; MÁRQUEZ, O. Clasificación morfológica de la anemia en vacunos mestizos de doble propósito criados en una zona de bosque seco tropical. **Zoot. Trop.** 28 (4): 535-544. 2010.
- [33] SEDA, J; MOSCOSO, J; RAMOS, F; LÓPEZ, P; ANIA, J; DELGADO, M; JUNQUERA, C; PONT, C; SILVA, L; MATOS, M; CARDEÑOSA, M; DEL CASTILLO, L; GÓMEZ, D; BRAJOS, M; GONZÁLEZ, J; CASTILLA, M DEL C; SOBRÁ, S; EXTREMERA, C; BERNET, J; GÓMEZ, S; GONZÁLEZ, J; LÓPEZ, F; RODRÍGUEZ, ML; DEL RÍO, F; ALÉS, M; SILVIA, M DEL C. Esterilidad/Infertilidad. **Matronas Del Servicio Vasco de Salud-osakidetza**. España, Sevilla. Editorial Mad, S.L. 551 pp. 2006.
- [34] SMITH, BP. Toma de muestras e interpretación de pruebas de laboratorio. **Medicina Interna de grandes animales** 4ª Ed. España, Barcelona. Editorial Elsevier. 1869 pp. 2010.
- [35] SOLÍS-JIMÉNEZ, J; MONTES-LLUCH, M. Anemias. **Tratado De Geriatria Para Residentes**. Sociedad Española de Geriatria y Gerontología. Pp 655-665. 2006.
- [36] TROYER, DL; WEISS, ML. Wharton´s jelly -derived cells are a primitive stromal cell population. **Stem Cells**. 26 (3): 591-599. 2008.
- [37] VILLANUEVA, VJ. Diagnóstico De Las Anemias. **Rev. de Posgrado Cát. V la Medicina**. Argentina. 107 (8): 1-10. 2001.
- [38] VILLASMIL-MORALES, AJ. Estado hematológico y parámetros del Hierro en neonatos prematuros producto de madres anémicas. Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, División de Estudios para Graduados. Post Grado de Hematología. República Bolivariana de Venezuela. Trabajo Especial de Grado. 75 pp. 2012.
- [39] ZVAIFLER-NATHAN, J; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L; ADAMS, G; EDWARDS-CHRISTOPHER, J; MOSS, J; BURGER, JA; MAINI-RAVINDER, N. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthrit Res.** 2 (6): 477-488. 2000.