



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL
POTENCIAL CICATRIZANTE DE
HERIDAS DE UN GEL DE FIBRINA
RICO EN PLAQUETAS Y CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES DE
CORDÓN UMBILICAL**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN INMUNOLOGÍA**

WILLY MANUEL CERÓN TELLO

LIMA – PERÚ

2018

ASESOR

Dr. José Luis Aguilar Olano

Jefe del Laboratorio de Inmunología. Departamento de Ciencias Moleculares y Celulares.

Dedicado a mi padre, mi esposa y mis hijos.

Agradecimientos:

Al Dr. José Luis Aguilar Olano, por su confianza y apoyo en mi desarrollo académico y profesional.

Al PhD. Iván Lozada Requena, por sus consejos y apoyo en la citometría de flujo.

A mis amigos y co-investigadores del Laboratorio de Inmunología LID 108, en especial a Marco Cabello, Milagros Pinto, Sandra Jara, Estefanie Cabrel, Alejandrina Regalado, Debra y Kiomi. A todos ellos por su ayuda y aportes en la presente investigación.

Financiamiento:

Proyecto financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), de acuerdo al contrato N° 149-PNICP-PIAP-2015.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pag.
I. INTRODUCCION.....	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION	3
2.1 Planteamiento del problema.....	3
2.2 Justificación del estudio	4
III. MARCO TEORICO.....	5
IV. OBJETIVOS.....	12
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos específicos	
V. METODOLOGIA.....	13
5.1 Diseño del estudio.....	13
5.2 Procedimientos y técnicas.....	14
A. Obtención y cultivo de las células madre mesenquimales de cordón umbilical.....	14
B. Caracterización de las células madre mesenquimales de cordón umbilical.....	17
C. Obtención y cultivo de fibroblastos dérmicos.....	.21
D. Obtención del concentrado plaquetario.....	21
E. Preparación del lisado plaquetario humano.	22
F. Preparación del gel de fibrina rico en plaquetas con y sin células madre mesenquimales.....	22

G. Determinación del efecto de la concentración de plaquetas en la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) en función al tiempo de incubación.....	26
H. Determinación de la concentración y cinética de liberación de factores de crecimiento y moléculas inmunomoduladoras.....	27
I. Efecto de cierre de herida en un modelo <i>in vitro</i> en cultivo de fibroblastos dérmicos.....	28
J. Efecto proliferativo del medio condicionado de los productos biológicos diseñados en el cultivo de fibroblastos dérmicos.....	30
5.3 Consideraciones éticas.....	32
5.4 Plan de análisis estadístico	32
VI. RESULTADOS	33
VII. DISCUSION.....	61
VIII. CONCLUSIONES.....	66
IX. RECOMENDACIONES.....	67
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	68
XI. ANEXOS.....	80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Muestra de cordón umbilical humano.

FIGURA 2. Esquema del ensayo de cierre de herida *in vitro*.

FIGURA 3. Células madre mesenquimales de cordón umbilical humano en cultivo.

FIGURA 4. MSC-CU en proceso de tripsinización.

FIGURA 5. Morfología de las MSC-CU a mayor aumento, en proceso de desprendimiento en el frasco de cultivo celular.

FIGURA 6. Análisis por citometría de flujo de MSC-CU cultivadas en función al tamaño y complejidad celular.

FIGURA 7. Análisis por citometría de flujo de los marcadores positivos y negativos de MSC-CU.

FIGURA 8. Vacuolas lipídicas intracelulares en MSC-CU diferenciadas en medio adipogénico.

FIGURA 9. Coloración con Oil Red del cultivo de diferenciación adipogénica de MSC-CU.

FIGURA 10. Depósitos de calcio en cultivo de diferenciación osteogénica de MSC-CU.

FIGURA 11. Coloración con Rojo de Alizarín del cultivo de diferenciación osteogénica de MSC-CU.

FIGURA 12. Corte histológico coloreado con Alcian Blue que muestra fibras de color celeste correspondiente a la matriz extracelular de condrocitos.

FIGURA 13. Cultivo de fibroblastos dérmicos en confluencia al 70%.

FIGURA 14. Gel de fibrina pobre en plaquetas observado bajo microscopia invertida.

FIGURA 15. Gel de fibrina rico en plaquetas observado bajo microscopia invertida.

FIGURA 16. Gel de fibrina rico en plaquetas con MSC-CU.

FIGURA 17. Gel de fibrina con plaquetas y MSC-CU en condiciones de cultivo celular.

FIGURA 18. Cinética de liberación del PDGF-BB a partir del gel en función de la concentración plaquetaria.

FIGURA 19. Comparación de la liberación de PDGF-BB a partir de los diferentes productos preparados hasta las 96 horas de incubación.

FIGURA 20. Comparación en grupos de la liberación de EGF hasta las 96 horas de incubación.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

PRP	: Plasma rico en plaquetas
MSC	: Células madre mesenquimales
CU	: Cordón umbilical
HUVEC	: Células endoteliales de vena de cordón umbilical
PDGF-BB	: Factor de crecimiento derivado de plaquetas fracción BB.
EGF	: Factor de crecimiento epidérmico
VEGF	: Factor de crecimiento endotelial vascular
PG-E2	: Prostaglandina E2
TGF-β1	: Factor de crecimiento transformante beta 1
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro difeniltetrazolio
GFRP	: Gel de fibrina rico en plaquetas
GFPP	: Gel de fibrina pobre en plaquetas
DM2	: Diabetes mellitus tipo 2
IDO	: Indoleamine 2,3-Dioxygenase
CMN	: Células mononucleares
PBS	: Buffer fosfato salino
HPL	: Lisado plaquetario humano

P/S/A : Penicilina, estreptomicina y anfotericina B.

SBF : Suero bovino fetal **pg/mL**

: Picogramos por mililitro

ng/mL : Nanogramos por mililitro

pq/uL : Plaquetas por microlitro

RESUMEN

Las úlceras crónicas cutáneas representan un problema importante de salud pública debido a las consecuencias que genera en el paciente. El presente estudio está fundamentado en la necesidad de diseñar, preparar y evaluar en ensayos *in vitro* el potencial regenerativo de un producto biológico obtenido de la combinación de plaquetas y células madres mesenquimales de cordón umbilical (MSC-CU) sobre una base de gel de fibrina, con potencial aplicación en úlceras cutáneas de índole crónica. Para ello se protocolizó la obtención de MSC-CU, las cuales fueron cultivadas y caracterizadas por citometría de flujo y se demostró su capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico. También se obtuvo plaquetas por aféresis sanguínea, las cuales fueron requeridas para la formación del gel de fibrina rico en plaquetas (GFRP), el gel de fibrina pobre en plaquetas (GFPP), GFRP combinado con MSC-CU y GFPP combinado con MSC-CU. Los productos desarrollados fueron incubados hasta por 96 horas, liberando un líquido seroso, en el cual se midieron la concentración de los factores de crecimiento: PDGF-BB, EGF y VEGF. También se midieron los factores inmunomoduladores TGF- β 1 y prostaglandina E2. Adicionalmente el líquido seroso liberado (medio condicionado) fue estudiado como suplemento en los medios de cultivo para estimular la proliferación y migración celular de fibroblastos dérmicos. La cinética de liberación de las biomoléculas evidenció una liberación similar entre el GFRP y GFRP-MSC a

excepción de la PGE2 que tuvo una mayor concentración en este último producto. Los ensayos de migración y proliferación mostraron que el GFRP y el GFRP-MSK tienen un efecto similar significativo en comparación con el GFPP-MSK. En conclusión, el gel de fibrina con plaquetas y MSK-CU muestra un efecto regenerativo *in vitro* similar que el gel de fibrina solo con plaquetas.

PALABRAS CLAVE

Células madre mesenquimales, cordón umbilical, fibroblastos dérmicos, factores de crecimiento, gel de fibrina.

ABSTRACT

Chronic skin ulcers represent a major public health problem due to the consequences it generates in the patients. The present study is based on the need to design, prepare and evaluate through *in vitro* assays, the regenerative potential of a biological product obtained from the combination of platelets and umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSC) on a fibrin gel base, with potential application in chronic skin ulcers. I standardized the obtaining of UC-MSC which were cultured and characterized by flow cytometry; their differentiation capacity was demonstrated for the osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineage. Platelets obtained by blood apheresis were required for the formation of the platelet-rich fibrin gel (PRFG), the platelet-poor fibrin gel (PPFG), PRFG combined with UC-MSC and PPFG combined with UC-MSC. The developed products were incubated up to 96 hours, releasing a serous fluid, in which the growth factors PDGF-BB, EGF and VEGF were measured. Immunomodulatory factors TGF- β 1 and prostaglandin E2 (PG-E2) were also measured. In addition, the serous fluid released was studied as a supplement in the culture media for cell proliferation and migration of dermal fibroblasts. The release kinetics of the biomolecules showed a similar release between the PRFG and the PRFG-MSC, except for the PG-E2 that had a higher concentration in the latter product. The migration and proliferation assays demonstrated that PRFG and PRFG-MSC have a similar effect compared to the

PPFG-MSC. In conclusion, the fibrin gel designed from the platelet with UC-MSC show a similar regenerative effect *in vitro* compared to fibrin gel alone with platelets.

KEYWORDS:

Mesenchymal stem cell, umbilical cord, dermal fibroblasts, growth factors, fibrin gel.

I. INTRODUCCION

Las úlceras cutáneas crónicas afecta a millones de personas en el mundo, principalmente a pacientes con insuficiencia vascular periférica de miembros inferiores y con úlceras de pie diabético en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 ¹. En nuestro país la principal causa de amputación de miembros inferiores por motivos no traumáticos corresponde al pie diabético, de acuerdo al instituto nacional de rehabilitación de Perú ². Esto debido principalmente a la poca cultura de prevención y cuidados médicos que tiene la población afectada.

Las condiciones fisiopatológicas de este tipo de úlceras no permiten una adecuada regeneración en un tiempo adecuado, lo que conlleva una alta morbimortalidad debido a las amputaciones que sufren los pacientes, ya que no hay tratamientos efectivos, y conllevan con frecuencia al riesgo de amputación ³.

En los últimos años el uso de plaquetas en forma de plasma rico en plaquetas (PRP) obtenidas en diferentes formas, ha mostrado en múltiples estudios, resultados muy prometedores, evitando en muchos casos la amputación del miembro afectado ⁴.

Actualmente las células madre mesenquimales ó también denominadas células estromales mesenquimales multipotentes (MSC) se ha convertido en el principal tipo celular de aplicación en procesos regenerativos, destacando su uso en modelos de regeneración cutánea, debido no sólo a su potencial regenerativo, sino principalmente por su

función inmunomoduladora, ya que libera diversos factores solubles con potencial inmunoregulador ⁵.

El objetivo del presente estudio ha sido combinar ambos elementos biológicos (MSC y PRP) y evaluar *in vitro*, en condiciones de cultivo celular, la producción de diversas biomoléculas implicadas en la regeneración de la piel, así como su efecto sobre la proliferación y migración de fibroblastos dérmicos.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las úlceras crónicas pueden ser de diferente etiología, siendo el de origen diabético la de mayor complicación, debido a la condición de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) como enfermedad crónica en el paciente. La búsqueda de un tratamiento efectivo en esta patología, disminuiría considerablemente la morbimortalidad ocasionada por la DM2 en el mundo ^{3,6}. En la DM2 no bien controlada, hay una predisposición a que las úlceras se vuelvan crónicas debido a la existencia de compromiso de tipo circulatorio isquémico (vasculopatía crónica diabética de la microcirculación) y de un componente autonómico por el compromiso neuropático de la DM2 (neuropatía diabética), lo cual llevará a una condición frecuentemente conocida como pie diabético ⁶. Estas condiciones crónicas van a prolongar ó perpetuar el proceso inflamatorio y no llega a producirse la fase de producción de mecanismos inmunológicos regulatorios y por lo tanto se aumenta el grado de daño tisular en el tiempo ⁷. La solución definitiva en muchos casos para no comprometer la vida del paciente es la amputación del miembro afectado, lo que conlleva a otras consecuencias.

Según datos publicados por Tentolouris y col. ⁸, el 70% de casos de amputación de miembros inferiores se da en pacientes con DM2,

convirtiéndose el problema de úlceras diabéticas en una de las principales complicaciones de este tipo de pacientes en el mundo ^{8,9}. En el Perú, de acuerdo a publicaciones nacionales ¹⁰⁻¹², la tasa de amputación bordea el 50% en pacientes que se hospitalizan con un cuadro de pie diabético. En la actualidad no hay en nuestro medio ninguna terapia alternativa que conlleve a disminuir la tasa de amputación de miembros inferiores.

2.2 JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Las úlceras cutáneas principalmente de índole isquémica como el pie diabético, cursan con una fuerte disfunción del mecanismo inmunoregulatorio ocasionando un proceso inflamatorio crónico, infección bacteriana, poca vascularización, disfunción del sistema nervioso autónomo, entre otras características ². Existen estudios publicados que muestran que las MSC y el plasma rico en plaquetas (PRP) aplicadas en forma independiente, han permitido acelerar el proceso de cicatrización en úlceras de pie diabético, principalmente explicados por la liberación de factores de crecimiento y moléculas inmunomoduladoras ^{4,5}. No existen estudios que propongan la aplicación en forma combinada de la MSC de cordón umbilical con plaquetas en una base de gel de fibrina, por lo que es indispensable realizar primero los estudios *in vitro*, para determinar si el producto biológico propuesto tiene el potencial para acelerar la cicatrización por

medio de la liberación de factores de crecimiento y estímulo sobre fibroblastos dérmicos y células endoteliales, como elementos celulares implicados en regeneración cutánea.

III. MARCO TEORICO

a. Situación de las úlceras de miembros inferiores en diabetes tipo 2

La DM2 es actualmente uno de los problemas de salud pública más importantes en el mundo, debido a la discapacidad y mortalidad prematura que provoca, y se ha estimado que alrededor de 171 millones de personas en el mundo viven con DM2 y que esta cifra ascenderá a 300 millones el 2030 ¹. La prevalencia de la DM2 en las Américas varía entre 10% a 15%, estimándose en el Perú en un 5.5% y para el 2011 se estimó que 942,200 peruanos padecían de la enfermedad y con proyección a aumentar debido a los factores condicionantes tales como la obesidad, el sedentarismo y los hábitos alimenticios inadecuados ¹³. El Ministerio de Salud del Perú ha establecido en los lineamientos de política del sector entre el 2007 y 2020, la vigilancia, prevención y control de las enfermedades crónico degenerativas, priorizando entre ellas la DM2. La mayor complicación crónica de la DM2 está representada por el pie diabético y de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el pie del paciente diabético tiene el riesgo de consecuencias patológicas incluido la infección, ulceración y/o destrucción de tejidos profundos asociados a anomalías

neurológicas, diversos grados de enfermedad vascular periférica y/o complicaciones metabólicas de la diabetes en el miembro inferior⁶. La Federación Internacional de Diabetes estimó en el 2005 que cada 30 segundos una extremidad inferior era amputada como consecuencia de la DM2³, ocasionando en el paciente discapacidad parcial o definitiva. El 85% a 90% de los casos de úlceras de pie diabético tiene como causa la neuropatía diabética con o sin vasculopatía diabética. Entre un 15% a 25% de los pacientes con DM2 desarrollará en algún momento de su vida pie diabético y se ha estimado que el 85% de las amputaciones de miembros inferiores van precedidos por ulceraciones en el pie y que además la mortalidad de los pacientes amputados a los 5 años es del 44.3%^{6,10}. El tratamiento efectivo de las úlceras de pie diabético puede reducir considerablemente la posibilidad de amputación y con ello reducir los costos de atención en salud y fundamentalmente mejorar la calidad de vida de un paciente con DM2. El riesgo de pie diabético en el Perú fue evaluado en un estudio en pacientes con DM2 atendidos en un hospital público, encontrándose que el 56.6% de estos presentaba neuropatía diabética periférica y consecuentemente un alto riesgo a desarrollar pie diabético⁹. En otro estudio en un hospital público peruano, se reportó que de un total de 206 pacientes con pie diabético se amputó al 61.2%¹⁰. De la misma forma un estudio realizado entre los años 2006 y 2008 en otro hospital público, reportó que de 179 pacientes que se internaron con diagnóstico de pie diabético, el 98.2% correspondía a DM2 y de todos

ellos el 64% sufrieron al final algún tipo de amputación, siendo un factor que condiciona la amputación la insuficiencia vascular periférica, que estaba presente en un 48.8% de los pacientes con pie diabético ¹¹. El tratamiento convencional de las úlceras de pie diabético está basado en la antibioticoterapia y el desbridamiento, así como también del uso de fármacos que mejoren la circulación sanguínea. Pero cuando ya no se puede revascularizar ó es afectado por osteomielitis que no responde al tratamiento y amenaza la vida del paciente, la única solución es la amputación del miembro afectado ¹⁰.

b. Pie diabético y medicina regenerativa

Ante la incompleta eficacia de los tratamientos convencionales surgió la posibilidad de tratar este tipo de patologías por medio de la medicina regenerativa, las cuales incluyen el uso de células progenitoras adultas y el PRP como fuente rica en factores de crecimiento, con la finalidad de acelerar la cicatrización de las úlceras de pie diabético. Tratar la isquemia de miembros inferiores ha sido la clave para poder recuperar los miembros afectados tanto en pacientes con pie diabético u otras patologías. En ese sentido, los primeros estudios clínicos se basaron en la aplicación de células mononucleares de médula ósea (CMN-MO), reportándose una angiogénesis efectiva en los miembros isquémicos tratados ^{14,15}. Las aplicaciones repetidas en intervalos de un mes en algunos casos ha sido más efectivo ¹⁶. También se ha comparado el uso de CMN-MO y CMN de sangre periférica previa estimulación con

factor de crecimiento de colonias de granulocitos, obteniendo resultados favorables ¹⁷. En un meta-análisis realizada con 12 ensayos clínicos controlados, con un total de 512 pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores, se concluyó que la aplicación de CMN-MO es un tratamiento potencialmente prometedor, pero que requieren mayor número de pacientes y seguimiento a largo tiempo ¹⁸.

c. Células madre mesenquimales en regeneración de úlcera cutánea crónica

Un tipo celular que actualmente es de amplia investigación y aplicación en ensayos clínicos son las denominadas células madre mesenquimales o células estromales mesenquimales, que fueron descritas por primera vez por Friedenstein *et al.* en 1974 ^{19,20}, las cuales poseen propiedades regenerativas e inmunomoduladoras, con capacidad de diferenciarse *in vitro* a adipocitos, osteoblastos, condrocitos y otros tipos celulares y cuya caracterización ha sido definida por la Sociedad Internacional de Terapia Celular ²¹. A diferencia de las células progenitoras hematopoyéticas, la MSC se ha aislado de diferentes fuentes siendo las más utilizadas, las obtenidas de médula ósea y tejido adiposo, mostrando este último grandes ventajas en función a la accesibilidad y cantidad celular, convirtiéndose en la actualidad en la principal fuente para las terapias celulares con MSC ²²⁻
²⁵. Las posibilidades terapéuticas usando las MSC para el tratamiento de úlceras de diferente etiología han sido aplicadas en diversos

estudios clínicos, mostrando grandes beneficios en la angiogénesis, disminución del proceso inflamatorio y resolución de la úlcera ²⁶⁻²⁹, siendo los mecanismos propuestos los siguientes:

1. Promoción de angiogénesis
2. Inducción de la migración y proliferación celular.
3. Disminución del proceso inflamatorio a través de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias y disminución de las pro-inflamatorias.
4. Actividad antimicrobiana vía secreción de factores como el LL-37.
5. Secreción de mitógenos que estimulan la proliferación de queratinocitos, fibroblastos dérmicos y células endoteliales.

Además, se ha descrito la producción de moléculas con efectos inmunomoduladores como la PG-E2,IDO, TGF- β 1 entre las más implicadas en disminuir el proceso inflamatorio ^{29,30}.

La mayor parte de estudios clínicos desarrollados han utilizado MSC de carácter autólogo, pero la MSC por su carácter inmunoprevilegiado ³¹, al no expresar moléculas MHC-II y escasas MHC-I hacen posible la aplicación alogénica en diferentes patologías incluyendo las úlceras por pie diabético, tal como se ha reportado en los primeros ensayos clínicos usando MSC derivadas de médula ósea y de sangre de cordón umbilical, evidenciándose la factibilidad y seguridad en el tratamiento aplicado ³²⁻³⁴.

d. Plasma rico en plaquetas y regeneración de úlceras cutáneas

Las plaquetas en sus gránulos α contienen factores de crecimiento que tienen efectos en diferentes células del organismo ³⁵. Las plaquetas se obtienen en forma de PRP, luego de la extracción y procesamiento de sangre total anticoagulada previamente obtenida de un donante o paciente, y se ha reportado diferentes métodos de obtención ³⁶. Se han medido la cantidad de factores de crecimiento producidas luego de la activación de plaquetas y se ha demostrado su efecto en el crecimiento celular en cultivo de células HUVEC y fibroblastos dérmicos ³⁷. El uso del PRP está fundamentado en que las plaquetas liberan múltiples factores de crecimiento que están vinculados estrechamente con la regeneración tisular destacando el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento endotelial (EGF), factor transformante del crecimiento tipo beta 1 (TGF- β 1), entre los más importantes ³⁸. Múltiples estudios clínicos han confirmado sus beneficios en el tratamiento de las úlceras tanto de pie diabético ó de diferente causa, reportando como resultados una disminución en el tiempo de cicatrización y con ello una menor tasa de amputación de miembros inferiores, siendo la aplicación más usada en forma de gel y en varias sesiones ³⁸⁻⁴². Sociedades científicas en el mundo han desarrollado guías de recomendación para la aplicación de los productos plaquetarios en situaciones no transfusionales ⁴³.

Un método de obtención directa y con alta concentración de plaquetas se da por aféresis sanguínea, producto en el cual se han medido luego de su activación los factores bioactivos contenidos en los gránulos α ⁴⁴. La concentración de plaquetas en relación a sus efectos en la proliferación de fibroblastos y queratinocitos ha sido evaluada por medio de la producción de los factores y citoquinas liberadas en preparaciones de diferentes concentraciones, reportándose que hay variación en algunos elementos ⁴⁵. La cinética de liberación de los factores de crecimiento en preparados plaquetarios ha mostrado diferentes curvas en el tiempo en función de la temperatura, forma de activación y lisis de las plaquetas, evidenciando diferencias en las mediciones realizadas. Es necesaria una estandarización en la preparación y activación de los productos plaquetarios ⁴⁶. Para prolongar el tiempo la liberación de los factores de crecimiento, se ha utilizado vehículos biodegradables como geles de gelatina, con la finalidad de mejorar la eficacia del tratamiento ⁴⁷.

e. Efecto sinérgico de MSC y PRP

Las posibilidades de tener un efecto sinérgico utilizando la MSC de médula ósea y tejido adiposo junto con PRP, ha sido evaluado en modelos experimentales en animales con inducción de DM tipo 1, con resultados moderados ^{48,49}. Recientes estudios han mostrado un mejor efecto sinérgico de la combinación del PRP y las MSC de cordón umbilical en la regeneración ósea en modelos animales, en los cuales

se evidenció una mayor densidad ósea a las 8 semanas en comparación con la aplicación sola de MSC ⁵⁰.

El uso de las MSC obtenidas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical (MSC-CU) está fundamentado en sus propiedades inmunomoduladoras y regenerativas, su aislamiento y expansión han sido detallados en diversos estudios ^{22,51-53}. Se ha investigado la aplicación de MSC en gel de fibrina con medio condicionado en un modelo de úlcera inducida en rata, sin resultados significativos en función al menor tiempo de cicatrización ⁵⁴. Se ha evaluado la cinética de liberación de factores de crecimiento plaquetarios en base de fibrina hasta por 28 días y además se demostró el estímulo sobre la migración de MSC y HUVEC en cultivo ⁵⁵. El rol inmunomodulador de las MSC ha sido ampliamente investigado, resaltando dentro de los mecanismos propuestos la inducción al fenotipo T regulador a través de la producción de PG-E2 y TGF- β 1 ⁵⁶.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* el efecto de los factores liberados por el gel de fibrina rico en plaquetas y células madre mesenquimales sobre la proliferación y migración de fibroblastos dérmicos.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a. Determinar la concentración de los factores de crecimiento (PDGF-BB, VEGF, EGF) liberados a partir de los productos elaborados.

- b. Determinar la concentración de las moléculas inmunomoduladoras (PG-E2, TGF- β 1) liberados a partir de los productos elaborados.

- c. Determinar el efecto proliferativo de los productos elaborados sobre el cultivo de fibroblastos dérmicos.

- d. Determinar el efecto de cierre de herida *in vitro* de los productos elaborados sobre el cultivo de fibroblastos dérmicos.

V. METODOLOGÍA

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio es de tipo analítico experimental con variables cuantitativas y cualitativas.

5.2 PROCEDIMIENTOS Y TECNICAS

El presente estudio forma parte del proyecto “**Desarrollo y evaluación del potencial regenerativo de un gel rico en factores de crecimiento plaquetarios y células madre mesenquimales para la cicatrización de úlceras cutáneas**”, del cual se obtuvieron las muestras biológicas que se utilizaron en el presente estudio, las cuales fueron muestra de cordón umbilical humano, plaquetas de donante voluntario por aféresis y biopsia de piel, todas ellas contaron con su respectivo consentimiento informado y fue aprobado por el comité de ética de la UPCH.

A. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE CORDÓN UMBILICAL.

1) Obtención del cordón umbilical humano:

Las muestras de cordón umbilical fueron obtenidas de dos mujeres luego de un procedimiento de parto programado por cesárea en el servicio de Gineco-obstetricia del Hospital Nacional Cayetano Heredia, las cuales tenían 18 y 36 años de edad y se encontraban en condiciones normales de salud física y mental, previamente firmaron el respectivo consentimiento informado (anexo 1). Se tomó las siguientes medidas de esterilidad: el cordón umbilical que estuvo unido a la placenta fue colocado en un campo estéril y se secciono un fragmento de aproximadamente 10 cm de longitud de la parte media (Fig.1), depositándose en un frasco estéril con 30 mL de buffer fosfato salino (PBS) pH 7.2 con antibióticos al 1% (P/S/A: penicilina, estreptomycin y anfotericina B – Gibco, US). El resto de tejido

placentario y cordón umbilical fue desechado de acuerdo a los protocolos de la institución. Al ser un producto biológico fuera del donante, la obtención de una muestra del cordón umbilical no implicó ningún riesgo para la salud de la paciente ni del recién nacido. Los cordones umbilicales fueron trasladados en cadena de frío (2-8°C) al laboratorio para su procesamiento dentro de las siguientes dos horas.

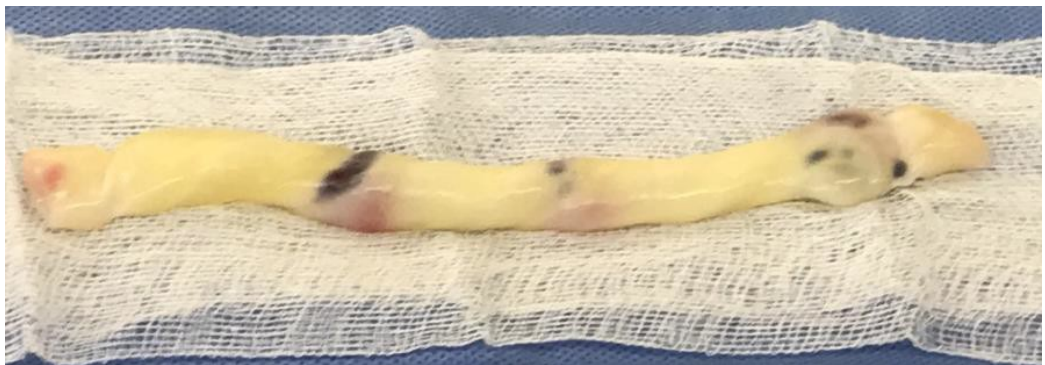


Fig.1: Muestra de cordón umbilical humano

2) Cultivo de las células madre mesenquimales

El cordón umbilical fue retirado del frasco con el medio de transporte en una cabina de bioseguridad y se procedió a su procesamiento para la obtención de las MSC de acuerdo a un protocolo previamente estandarizado en el laboratorio de inmunología LID 108 de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, y que fue publicado previamente ⁶⁸. El procedimiento en resumen consistió en realizar sucesivos lavados con PBS estéril pH 7.2, procediéndose luego a retirar las venas y arterias, exponiendo la gelatina de Wharton. Luego se procedió a cortar en pequeños fragmentos de 1mm y se preparó una solución de 10 mL de

colagenasa tipo 2 al 0.5% (Gibco, US) en PBS pH 7.2. Se procedió a incubar el tejido previamente fragmentado de cordón umbilical con la solución de colagenasa tipo 2 a 37°C por una hora. Finalizada la incubación se detuvo la acción enzimática por adición de 30 mL de medio de cultivo α -MEM (Gibco, US) suplementado con lisado plaquetario humano (HPL) al 10% y antibióticos al 1% (P/S/A), al que se denominó medio completo. Seguidamente se filtró usando un filtro tipo canastilla de 100 μ m (cell strainer SPL, Korea) depositado sobre un tubo cónico de 50 mL. Se centrifugó el filtrado a 1500 rpm por 10 minutos, retirando luego el sobrenadante y resuspendiendo el concentrado celular obtenido en 1 mL de medio completo y cultivado en 2 frascos de cultivo de 25 cm² (CytoOne, Korea) con 5 mL de medio completo cada uno, bajo condiciones de incubación de 37°C, 5% de CO² y 90% de humedad.

3) Expansión del cultivo de células madre mesenquimales

Luego de 48 horas de cultivo se realizó el recambio del medio de cultivo y así en forma sucesiva hasta alcanzar la confluencia de 70% - 80% (7-10 días). Luego de alcanzar la confluencia se procedió a realizar los sub-cultivos, para ello se realizó la tripsinización de las células adheridas mediante la incubación con tripsina EDTA 0.25 (Sigma, US) por 5 minutos a 37°C. Luego de ello se realizó un lavado con medio completo α -MEM (1500 rpm x 10 minutos) realizándose luego el recuento y viabilidad celular con el colorante Trypan Blue en cámara de Neubauer. Se realizaron los sub-cultivos a razón de 5000 células viables por cm² de frasco de cultivo (frasco de 75 cm²). Se realizaron en total 3 pasajes para luego

proceder a realizar los experimentos, evaluaciones y criopreservación de las células en nitrógeno líquido a -170°C.

B) CARACTERIZACION DE LAS CELULAS MADRE MESENQUIMALES.

La caracterización de las MSC se realizó de acuerdo al consenso de la ISCT – 2006 que define las características de las MSC de origen humano en tres aspectos:

1. Adherencia al plástico en cultivo

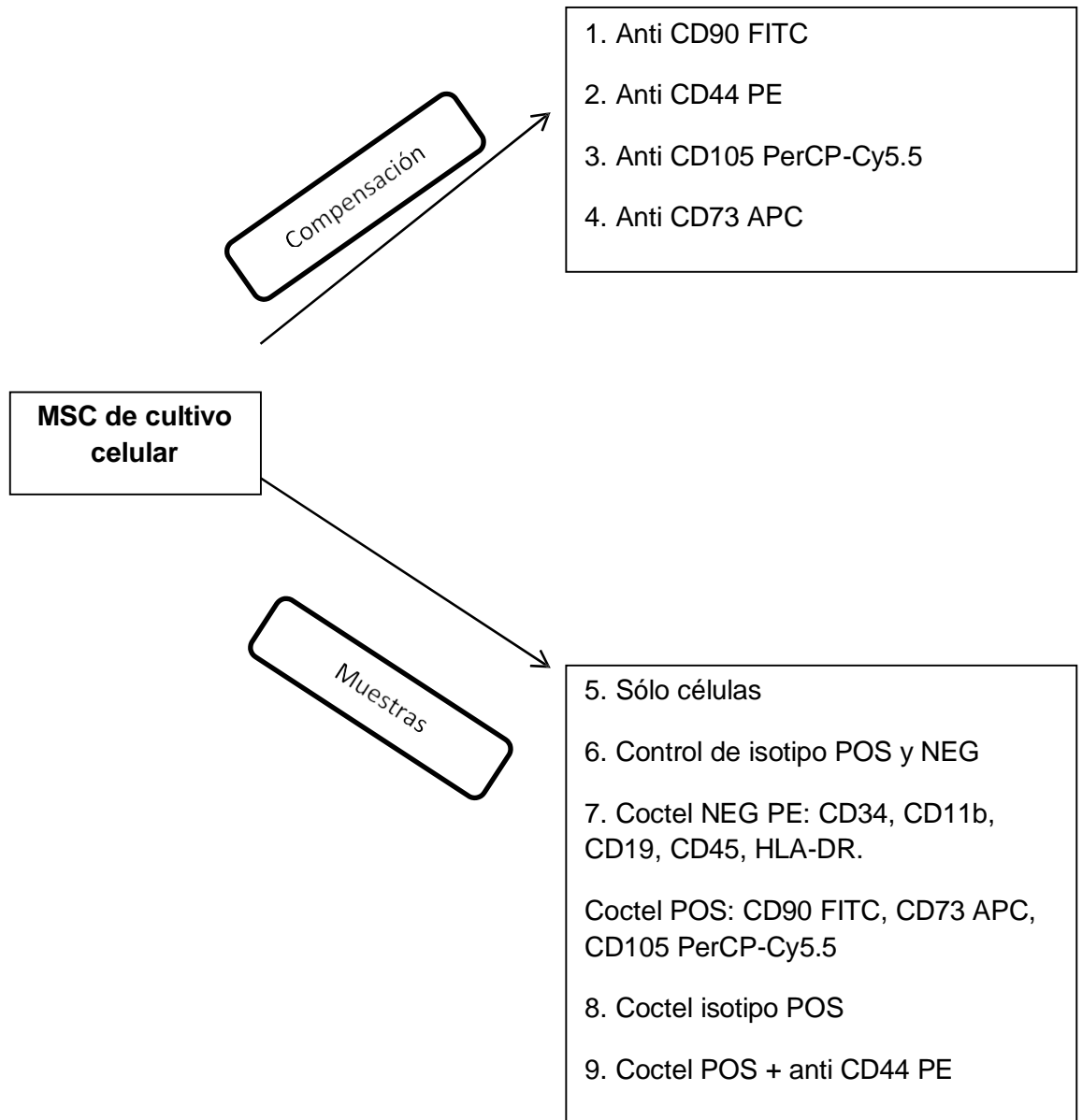
En los frascos de cultivo presentan aspecto fibroblástico y se encuentran adheridas, siendo difícil su desprendimiento por enjuagues sucesivos.

2. Fenotipo por citometría de flujo

La inmunofenotipificación se realizó de acuerdo al protocolo Human MSC Analysis Kit (BD Stemflow, US). Las células fueron obtenidas del 3er pasaje de cultivo y concentradas en razón de 5×10^6 /mL en una solución buffer (BD Pharmingen™ Stain Buffer- FBS). Se realizó la marcación con los siguientes anticuerpos:

Marcadores positivos	Marcadores negativos
<input type="checkbox"/> CD 73	<input type="checkbox"/> CD 45
<input type="checkbox"/> CD 105	<input type="checkbox"/> CD 34
<input type="checkbox"/> CD 90	<input type="checkbox"/> HLA-DR
	<input type="checkbox"/> CD 19
	<input type="checkbox"/> CD 11b

El marcaje y análisis citométrico se realizó de acuerdo al siguiente esquema de trabajo:



Luego de adicionar los anticuerpos monoclonales respectivos por tubo, se adicionó 100 uL de la suspensión celular a cada tubo y se incubó por 30 minutos en oscuridad. Seguidamente se realizó lavado con la solución FBS, resuspendiéndose en 500 uL de FBS, para el análisis en el citómetro de flujo (FACScalibur BD, US). Se realizaron las compensaciones respectivas con los tubos 1-4, para luego determinar la positividad y porcentaje de pureza de cada marcador expresado por MSC-CU.

3. Diferenciación celular en cultivo

A partir del 3er pasaje del cultivo se realizaron ensayos de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico de acuerdo a los siguientes protocolos:

3.1 Diferenciación condrogénica

Se utilizó el kit de diferenciación STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, US). A partir del cultivo celular de MSC se obtuvo una suspensión de 1.6×10^7 células viables /mL. En placas de cultivo de 6 pozos (CytoOne, Korea) se colocó en forma de gota un volumen de 5 uL de la suspensión celular en dos pozos para diferenciación condrogénica y un pozo como control y se dejó incubar por 2 horas en condiciones de humedad alta con la finalidad de formar la micromasa (esferoide). Luego se añadió el medio de condrogénesis a los pozos de diferenciación y medio α -MEM completo al pozo control y se incubó a 37°C y 5% de CO², cambiando de medio cada 2 a 3 días hasta por 14 días. Luego se colocó las esferas obtenidas en tubos con el fijador formol neutro al 10% en un volumen de 2 mL. Se realizó el procesamiento histológico en

forma de biopsia para obtener cortes histológicos, los cuales fueron coloreados con Alcian Blue (Biolab, Argentina).

3.2 Diferenciación osteogénica

Se utilizó el kit de diferenciación STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco, US). A partir del cultivo celular de MSC se obtuvo una suspensión de células viables y se cultivó en placas de cultivo tratadas de 6 pozos (CytoOne, Korea) a razón de 5000 cel/cm² y se dejó en cultivo con el medio α -MEM completo a 37°C y 5% de CO² por 24 horas. Luego se realizó el cambio de medio con el medio de diferenciación osteogénica incubándose en las mismas condiciones y realizando cambios de medio cada 2 a 3 días hasta por 14 días. Luego se realizó la técnica de coloración con el colorante Alizarín Red S (Biolab, Argentina).

3.3 Diferenciación adipogénica

Se utilizó el kit de diferenciación STEMPRO® Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco, US). A partir del cultivo celular de MSC se obtuvo una suspensión de células viables y se cultivó en placas de cultivo tratadas de 6 pozos (CytoOne, Korea) a razón de 10,000 cel/cm² y se dejó en cultivo con el medio α -MEM completo a 37°C y 5% de CO² por 24 horas. Luego se realizó el cambio de medio con el medio de diferenciación adipogénica incubándose en las mismas condiciones y realizando cambios de medio cada 2 a 3 días hasta por 14 días. Luego se realizó la técnica de coloración con el colorante Oil Red (Biolab, Argentina).

C) OBTENCION Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS DERMICOS.

La muestra de piel fue obtenida bajo consentimiento informado (Anexo 2) durante un procedimiento de cirugía traumatológica. La muestra de tejido obtenido fue de 2cm x 2cm el cual fue colocado en un frasco con el medio de transporte que consistió del medio D-MEM (Gibco, US) con antibióticos al 1% (P/S/A). La muestra obtenida fue procesada en cabina de bioseguridad dentro de las 2 horas de extraído el tejido. El método de aislamiento de los fibroblastos dérmicos se realizó por medio de la técnica de explante, colocándose pequeños trozos previamente cortados en placas de cultivo tratadas de 6 pozos (CytoOne, Korea) con el medio D-MEM suplementado con HPL al 10% y antibióticos al 1% (P/S/A) se incubo a 37°C y 5% de CO². Se cambió de medio cada 3 días hasta por 10 días, observando células alrededor de cada tejido fijado sobre la placa de cultivo. Se retiró el tejido y se continuó incubando hasta obtener confluencia del 70% - 80%. Se realizaron pasajes sucesivos hasta el pasaje 3 para luego realizar los experimentos y criopreservar en nitrógeno líquido.

D) OBTENCION DEL CONCENTRADO PLAQUETARIO HUMANO.

El concentrado plaquetario fue obtenido mediante la técnica de aféresis sanguínea a partir de un donante voluntario de 25 años de edad y bajo consentimiento informado (Anexo 3), de acuerdo a normas nacionales establecidas para una donación de plaquetas por aféresis. El procedimiento de aféresis se realizó usando el kit de aféresis TRIMA ACCEL (Terumo

BCT, US) en su correspondiente separador celular. Se obtuvo un producto de 200 mL con una concentración de 1500 plaquetas/uL y una contaminación de leucocitos $<5 \times 10^6$. El concentrado plaquetario, también denominado PRP fue alicuotado en dos partes de 100 mL cada uno. Una de las partes fue congelada a -20°C hasta por un máximo de 6 meses. La otra parte fue centrifugada en tubos cónicos de 50 mL a 2500 rpm x 15 minutos, con la finalidad de obtener un plasma pobre en plaquetas (PPP) para la obtención del gel de fibrina pobre en plaquetas (GFPP). El PPP fue alicuotado y conservado a -20°C hasta por 6 meses.

E) PREPARACION DEL LISADO PLAQUETARIO HUMANO (HPL)

A partir del concentrado plaquetario obtenido por aféresis, se alícuota un volumen de 50 mL para la preparación del HPL, de acuerdo a protocolo establecido ⁶⁹, el cual consistió en sucesivas etapas de congelamiento y descongelamiento del producto con la finalidad de liberar los factores de crecimiento. Como etapa final se centrifugó y filtró con filtros de 0.22 μm para luego congelar a -70°C en alícuotas de 5 mL.

F) PREPARACION DEL GEL DE FIBRINA RICO EN PLAQUETAS COMBINADO CON Y SIN CELULAS MADRE MESENQUIMALES.

Se diseñaron diferentes productos a partir del PRP y las MSC de acuerdo a los siguientes protocolos:

**1) GEL DE FIBRINA RICO EN PLAQUETAS (GFRP) EN
FUNCION DEL CONCENTRADO PLAQUETARIO.**

En placas de cultivo de 6 pozos se prepararon por duplicado y en tres concentraciones de plaquetas de acuerdo a la siguiente combinación:

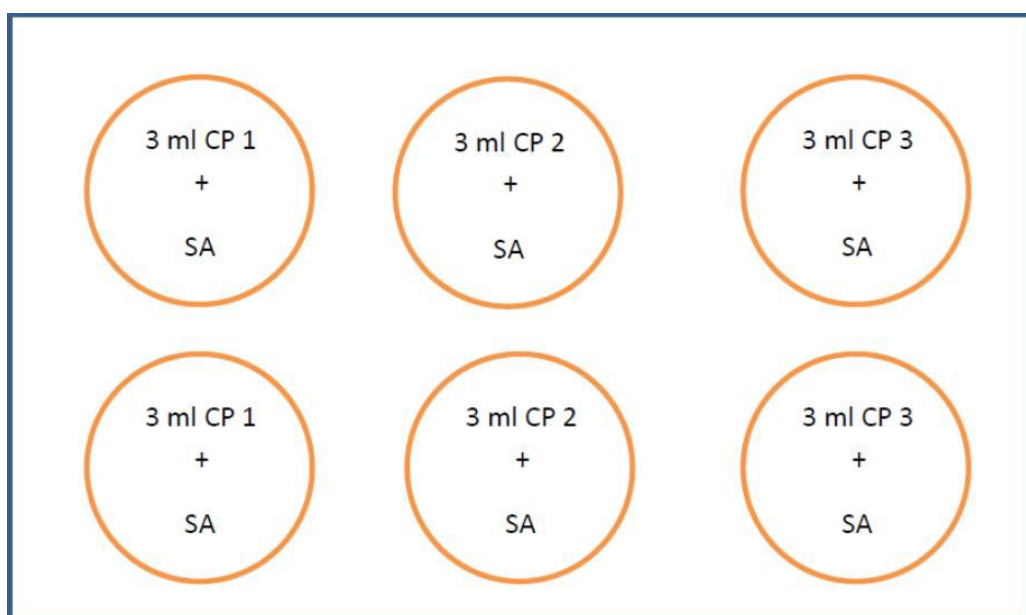
A. Solución activadora (SA): 300 uL

- Cloruro de calcio 0.025 mol/L (Siemens, Germany)
- Trombina bovina 50 UI/ml (Siemens, Germany)

B. Concentrado plaquetario (PRP): 3 mL

- CP1: Plaquetas 1.5×10^6 /uL
- CP2: Plaquetas 1.0×10^6 /uL
- CP3: Plaquetas 0.5×10^6 /uL

Esquema de preparación:



Luego de la preparación se incubó a 37°C por 96 horas, retirando el líquido liberado del gel formado a las 6, 24, 48 y 96 horas, los cuales fueron congelados a -20°C en crioviales.

GEL DE FIBRINA POBRE EN PLAQUETAS CON CELULAS MADRE MESENQUIMALES

A partir del PPP previamente obtenido y congelado se prepararon geles de fibrina pobres en plaquetas y se mezclaron con las células madre mesenquimales obtenidas del cultivo celular respectivo y de acuerdo a la siguiente combinación en placas de cultivo de 6 pozos por duplicado:

A. Solución activadora (SA): 300 uL

- Cloruro de calcio 0.025 mol/L
- Trombina bovina 50UI/ml

B. Plasma pobre en plaquetas (PPP): 1500 uL

C. Medio de cultivo α -MEM: 1500 uL

D. Células madre mesenquimales (MSC)

- 200,000 células/pozo

Luego de la preparación se incubó a 37°C hasta por 96 horas, retirando el líquido liberado del gel formado a las 6, 24, 48 y 96 horas. El líquido fue alicuotado y congelado a -20°C.

2) GEL DE FIBRINA RICO EN PLAQUETAS CON CELULAS MADRE MESENQUIMALES

En placas de cultivo de 6 pozos se preparó el gel de fibrina rico en plaquetas con adición de las células madre mesenquimales antes de la formación de fibrina, con el consiguiente atrapamiento en el gel de las células adicionadas. Se preparó por duplicado de acuerdo a las siguientes condiciones:

A. Solución activadora (SA): 300 uL

- Cloruro de calcio 0.25 mM
- Trombina bovina

B. Concentrado plaquetario (1.5×10^6 /ul): 1500 uL

C. Medio de cultivo α -MEM: 1500 uL

D. Células madre mesenquimales (MSC)

- 200,000 células/pozo

Luego de la preparación se incubó a 37°C hasta por 96 horas, retirando el líquido liberado del gel formado a las 6, 24, 48 y 96 horas. El líquido fue alicuotado y congelado a -20°C.

G) DETERMINACION DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PLAQUETAS EN LA LIBERACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF-BB) EN FUNCION AL TIEMPO DE INCUBACION.

Mediante la técnica de ELISA se determinó el efecto de liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) en función de la concentración plaquetaria y en diferentes tiempos de incubación de acuerdo al siguiente esquema:

- a) Concentración plaquetaria A (CPA): $0.5 \times 10^6/\text{ul}$
- b) Concentración plaquetaria B (CPB): $1.0 \times 10^6/\text{ul}$
- c) Concentración plaquetaria C (CPC): $1.5 \times 10^6/\text{ul}$

Solución activadora (SA): cloruro de calcio + trombina bovina (1:1)

Preparación de geles plaquetarios con activación al 10% de SA: Se realizaron las siguientes combinaciones en placas de cultivo de 6 pozos por triplicado, incubándose luego a 37°C y 5% de CO_2 .

- a. Gel 1: 2.7 ml CPA + 0.3 ml SA
- b. Gel 2: 2.7 ml CPA + 0.3 ml SA
- c. Gel 3: 2.7 ml CPA + 0.3 ml SA

Tiempos de evaluación: 12, 48, 96 y 120 horas.

H) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE LIBERACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y MOLÉCULAS INMUNOMODULADORAS.

En las muestras de líquido liberado por los geles preparados (medio condicionado) y obtenido en las diferentes horas de incubación, se midieron los factores de crecimiento: EGF (Human EGF Quantikine ELISA Kit- R&D Systems, US), PDGF-BB (Human PDGF-BB Quantikine ELISA Kit- R&D Systems) y VEGF (Human VEGF Quantikine ELISA Kit- R&D Systems, US), de acuerdo a los protocolos establecidos por el fabricante mediante la técnica de ELISA. De otro lado, se midieron moléculas implicadas en procesos inmunomodulatorios: TGF- β 1 (Human TGF- β 1 Quantikine ELISA Kit- R&D Systems, US) y prostaglandina E2 (Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit- R&D Systems, US). Se descongelaron las muestras de los diferentes tiempos de incubación de los geles (6, 24, 48 y 96 horas), se midieron las muestras por triplicado, se prepararon los estándares para cada ELISA y se hicieron diluciones a las muestras en función a la recomendación del fabricante. Los lavados durante el proceso se realizaron usando un sistema automático (Rayto-RT 3100). La lectura final de la reacción se realizó usando el lector de ELISA (Rayto-RT 2100C) con medición de longitudes de onda de 450 nm y 570 nm. La curva de calibración de cada analito se graficó en el programa Microsoft Excel y se extrapolaron los valores para cada lectura de las muestras evaluadas.

I) EFECTO DE CIERRE DE HERIDA EN UN MODELO *IN VITRO* EN CULTIVO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS.

El efecto de cierre de herida *in vitro* se realizó mediante la técnica celular (wound healing assay) en cultivo de fibroblastos dérmicos (Fig.2). El líquido liberado a las 48 horas de incubación a partir de la preparación de los geles biológicos fue utilizado para suplementar el medio de cultivo D-MEM (Gibco, US). Previamente se acondicionaron las placas de cultivo de 6 pozos generando un surco de 2 mm de ancho en cada pozo. Luego se cultivaron fibroblastos previamente tripsinizadas de cultivo reciente en pasaje 3 y se colocaron en los pozos en razón de 10,000 células/cm² con medio completo D-MEM suplementado con HPL al 5% y antibióticos al 1% (P/S/A). Se incubaron por 48 horas a 37°C y 5% de CO² luego del cual se retiró el medio de cada pozo y se realizó un lavado con medio D-MEM para eliminar las células no adheridas. Seguidamente se retiró la cinta de separación que generó un surco libre de células. Seguidamente se adicionó a cada pozo correspondiente el medio D-MEM suplementado con diferentes productos de liberación de los geles preparados, de acuerdo al siguiente esquema:

Placa A:

- a. Pozo 1: Medio suplementado con HPL al 10% (control)
- b. Pozo 2: Medio suplementado con SBF al 10% (control)
- c. Pozo 3: Medio suplementado al 10% con líquido del gel de fibrina rico en plaquetas.

- d. Pozo 4: Medio suplementado al 20% con líquido del gel de fibrina rico en plaquetas.

Placa B:

- a. Pozo 1: Medio suplementado con HPL al 10% (control)
- b. Pozo 2: Medio suplementado con SBF al 10% (control)
- c. Pozo 3: Medio suplementado al 10% con líquido del gel de fibrina y MSC.
- d. Pozo 4: Medio suplementado al 20% con líquido del gel de fibrina y MSC.

Placa C:

- a. Pozo 1: Medio suplementado con HPL al 10% (control)
- b. Pozo 2: Medio suplementado con SBF al 10% (control)
- c. Pozo 3: Medio suplementado al 10% con líquido del gel de fibrina rico en plaquetas y MSC.
- d. Pozo 4: Medio suplementado al 20% con líquido del gel de fibrina rico en plaquetas y MSC.

Todos los cultivos fueron incubados a 37°C y 5% de CO² y se fue evaluando el cierre del surco por el crecimiento de los fibroblastos, tomando fotografías y determinando el porcentaje de cierre hasta por 48 horas de incubación, con evaluaciones cada 12 horas.

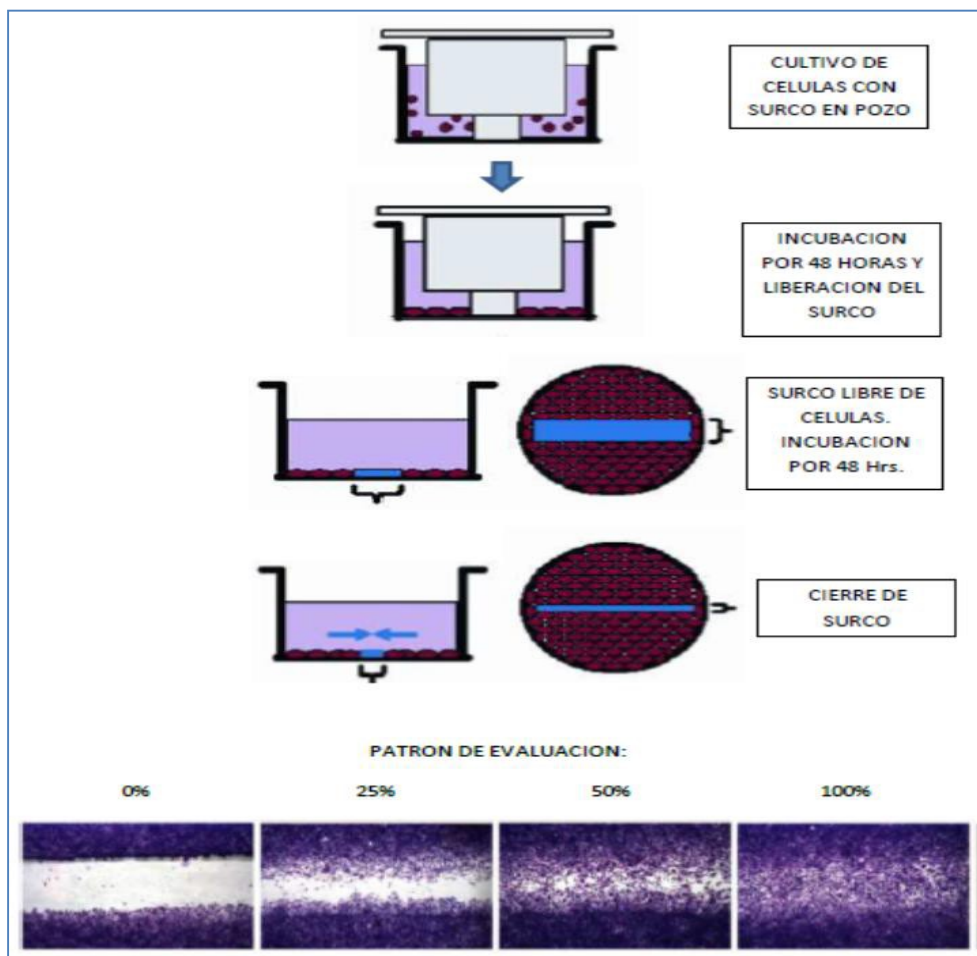


Fig.2: Esquema del ensayo de cierre de herida *in vitro* (wound healing assay).

J) EFECTO PROLIFERATIVO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE EL CULTIVO DE FIBROBLASTOS DERMICOS.

Los fibroblastos dérmicos obtenidos en cultivo fueron cultivados en placas de cultivo de 96 pozos (CytoOne, Korea) en razón de 5,000 células/cm² con medio DMEM suplementado con 5% de HPL a 37°C y 5% de CO² por 4 horas, verificándose al microscopio invertido la adherencia de las células en cultivo. Seguidamente se retiró el medio de cultivo y se realizó un enjuague

con el medio DMEM para luego añadir a cada pozo el respectivo medio DMEM suplementado con el líquido liberado a las 48 horas de incubación a partir de la preparación de los geles de biológicos de acuerdo al siguiente esquema de cultivo y por triplicado cada ensayo:

Pozo 1: Medio suplementado con HPL al 5% (control)

Pozo 2: Medio suplementado con HPL al 10% (control)

Pozo 3: Medio suplementado con SBF al 10% (control)

Pozo 4: Medio suplementado al 10% con líquido del gel de fibrina rico en plaquetas.

Pozo 5: Medio suplementado al 20% con líquido del gel de fibrina rico en plaquetas.

Pozo 6: Medio suplementado al 10% con líquido del gel de fibrina rico en plaquetas y MSC.

Pozo 7: Medio suplementado al 20% con líquido del gel de fibrina rico en plaquetas y MSC.

Todos los cultivos fueron incubados a 37°C y 5% de CO² por 48 horas, luego del cual se realizó la técnica de MTT usando el kit MTT Cell Growth Assay Kit (Sigma, US) de acuerdo al protocolo estandarizado.

5.3 ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética para humanos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (código CIE-UPCH N° 66252) y se establecieron los consentimientos informados (Anexos 1,2 y 3) para la toma de muestra de los productos biológicos (obtención de plaquetas por aféresis, obtención de biopsia de piel y obtención de cordón umbilical humano) con los cuales se realizaron los ensayos. También se obtuvo la aprobación del comité de ética del Hospital Nacional Cayetano Heredia para la obtención de las muestras biológicas correspondientes (código N° 027-16).

5.4 PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO

Los valores se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media. Los resultados cuantitativos obtenidos fueron analizados mediante el uso del software estadístico GRAPHPAD PRISM versión 7. Las comparaciones entre grupos fueron hechas por el análisis de varianza ANOVA factorial y one-way ANOVA. El test Two-way RM ANOVA Matching by cols se utilizó para comparaciones múltiples. Un valor de probabilidad menor de 0.05 ($p < 0.05$) fueron considerados estadísticamente significativos.

VI. RESULTADOS

1) CULTIVO DE LAS CELULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células tuvieron el aspecto fibroblástico característico (Fig.3) y fueron expandidas hasta 4 pases. Se obtuvo un aproximado de 1×10^6 de células en un frasco de cultivo de 25 cm^2 y 3×10^6 en 75 cm^2 . Se obtuvo un crecimiento positivo a las 48 horas de cultivo y alcanzaron la confluencia de 70-80% a los 7 días de cultivo, luego del cual se realizaron pases sucesivos previo desprendimiento de la monocapa de células adheridas mediante tripsinización, cambiando de morfología tal como se muestra en la foto a menor y mayor aumento (Fig.4 y 5). Se sub-cultivó a razón de 5000 cel/cm^2 en nuevos frascos de cultivo de 75 cm^2 hasta realizar 4 pases en total.

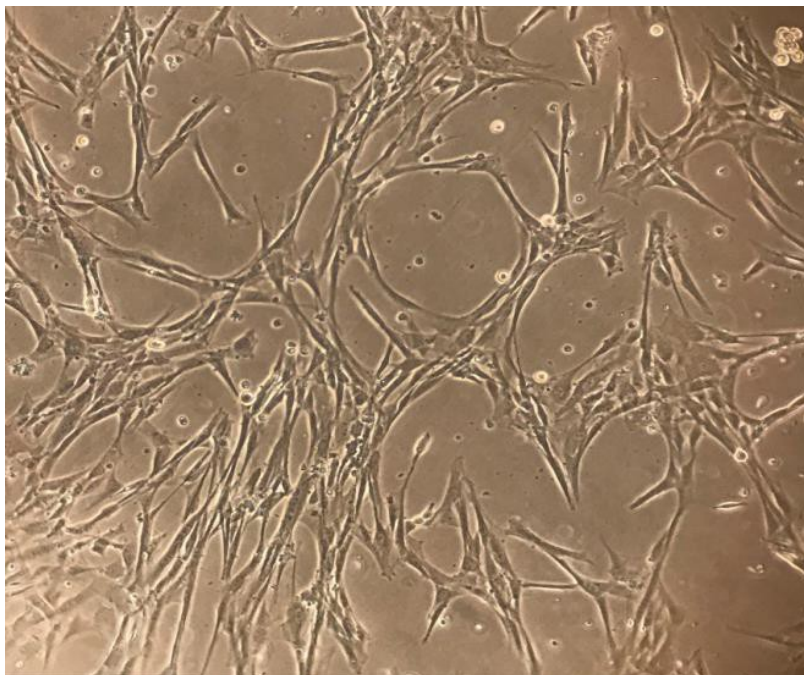


Fig.3: Células madre mesenquimales de cordón umbilical humano en cultivo. Las células muestran el aspecto fibroblástico característico. (microscopía invertida 40X).

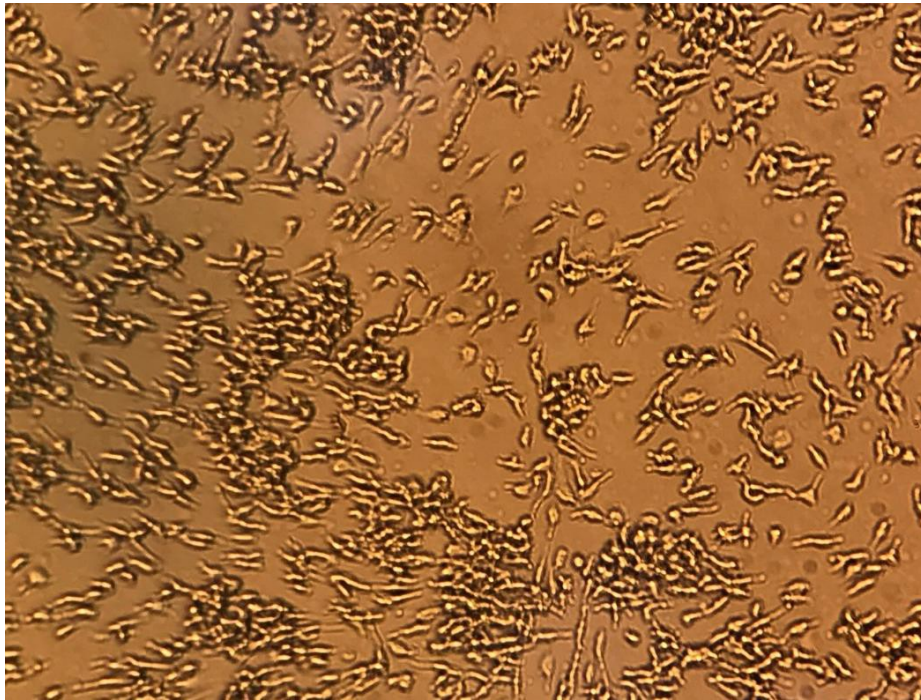


Fig.4: MSC-CU en proceso de tripsinización. Las células adoptan una morfología circular a medida que van desprendiéndose de la superficie del frasco de cultivo.



Fig.5: Morfología de las MSC-CU a mayor aumento, en proceso de desprendimiento en el frasco de cultivo celular.

2) INMUNOFENOTIPO DE MSC-CU POR CITOMETRIA DE FLUJO

El análisis de citometría mostró una población variada en tamaño y complejidad celular, del cual se seleccionó el área de mayor densidad para los análisis correspondientes (Fig. 6). Los marcadores positivos y negativos fueron analizados con su respectivo control de isotipo (Fig.7), mostrando una pureza mayor al 98% en los marcadores positivos (CD90, CD105 y CD73) y una contaminación menor de 2% en el coctel de marcadores negativos (CD45, HLA-DR, CD19, CD34, CD11b), cumpliendo con los estándares internacionales establecidos.

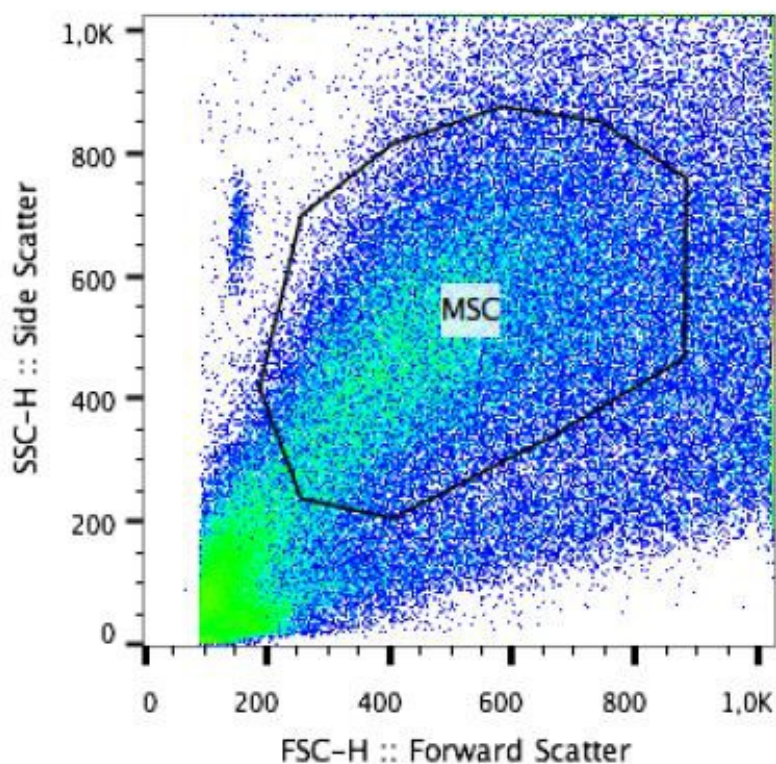
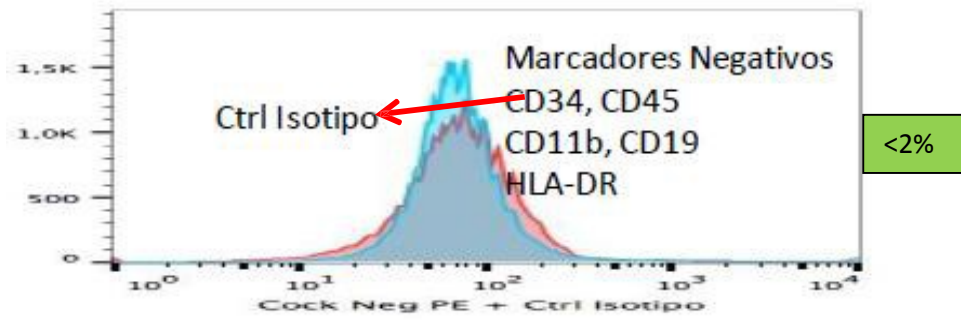
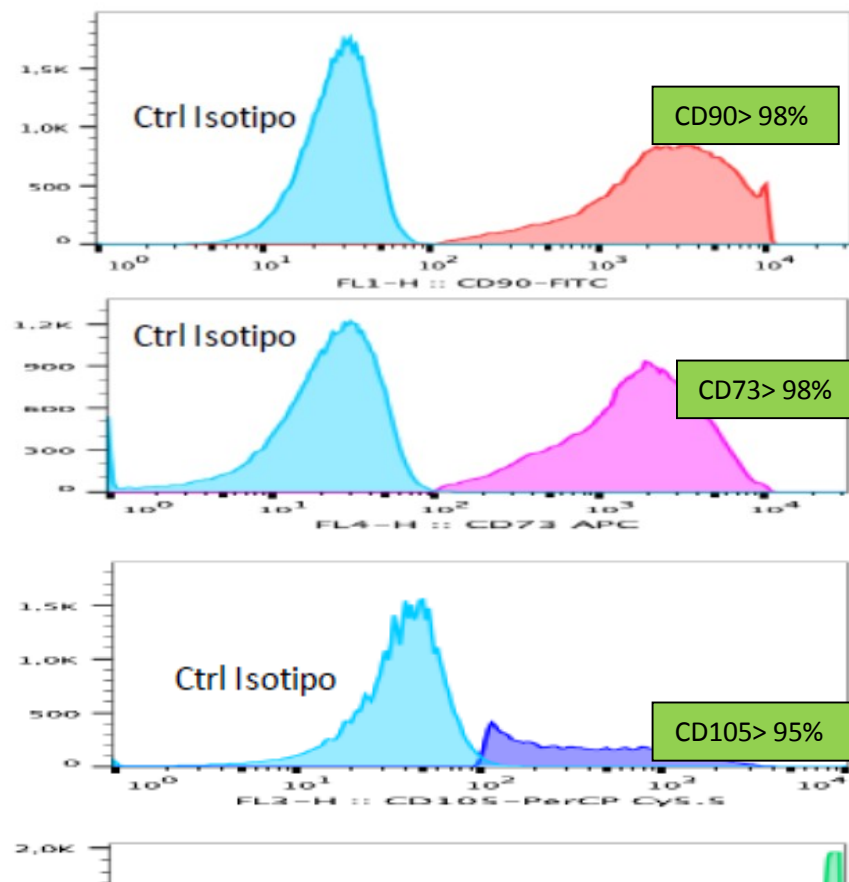


Fig.6: Análisis por citometría de flujo de las MSC cultivadas en función al tamaño y complejidad celular.



A) Citometría de flujo de MSC con el coctel negativo y control de isotipo



B. Citometría de flujo con marcadores positivos de MSC

Fig. 7: Análisis por citometría de flujo de los marcadores positivos y negativos de MSC-CU. A) Análisis de marcadores negativos. B) Análisis de marcadores positivos.

3) DIFERENCIACION DE MSC-CU

Luego de 14 días de cultivo en los medios de diferenciación, se realizaron las coloraciones para evidenciar la diferenciación hacia los linajes correspondientes.

3.1 DIFERENCIACION ADIPOGÉNICA

Hubo una diferenciación positiva evidenciada por la presencia de vacuolas lipídicas intracelulares que se tiñeron de rojo con el colorante específico para adipocitos (Fig.8 y 9).

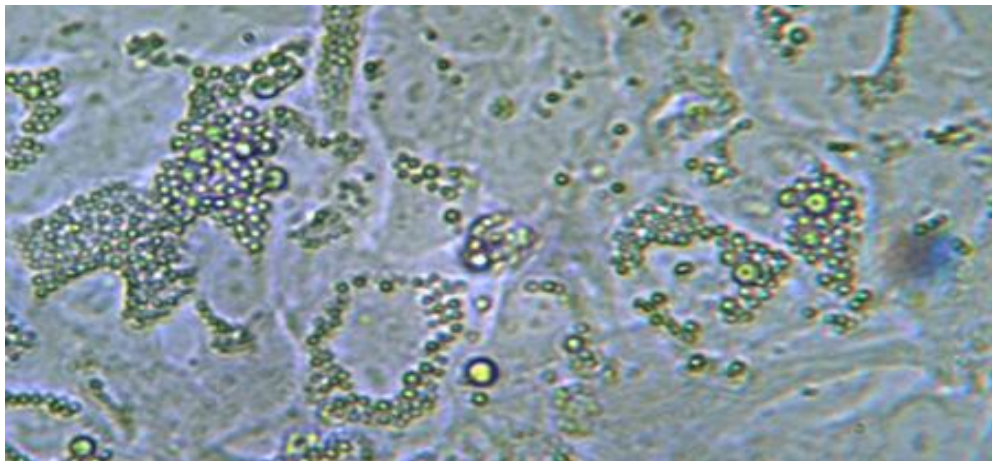


Fig.8: Vacuolas lipídicas intracelulares en MSC-CU diferenciadas en medio adipogénico.

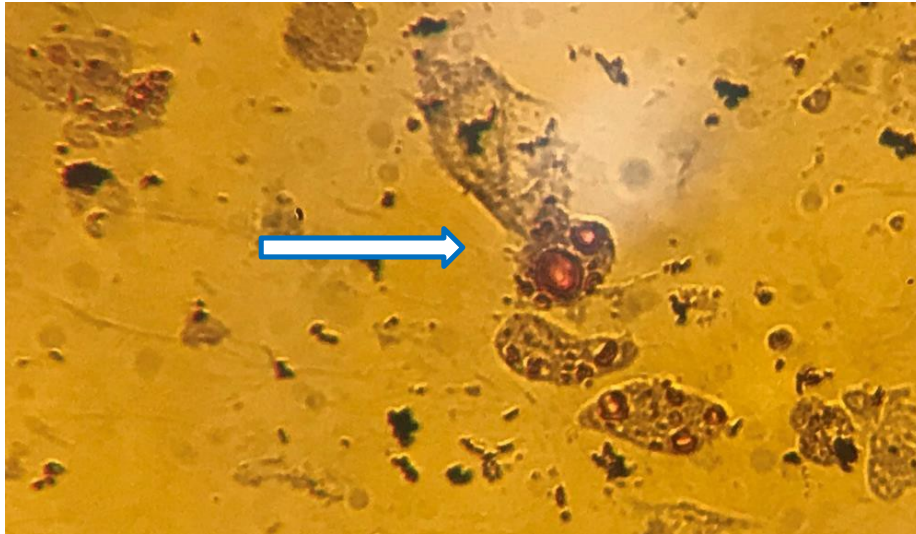


Fig.9: Coloración con Oil Red del cultivo de diferenciación adipogénica de MSC-CU. La flecha indica vacuolas coloreadas de color rojo.

3.2 DIFERENCIACION OSTEOGÉNICA

Hubo una diferenciación positiva evidenciada por la presencia de depósitos de calcio extracelular derivados de los osteoblastos maduros y que se tiñen de rojo-anaranjado intenso con el colorante Rojo de Alizarín (Fig. 10 y 11).

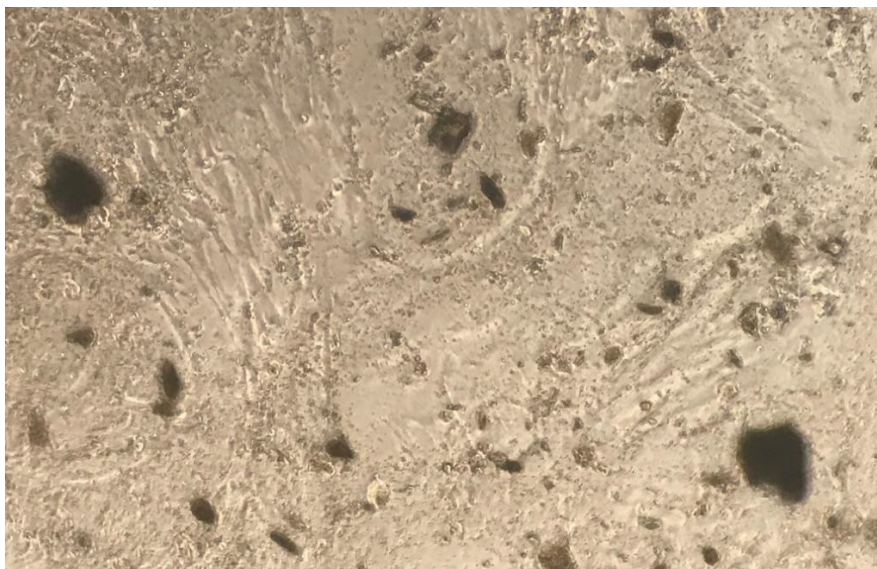


Fig.10: Depósitos de calcio en cultivo de diferenciación osteogénica.

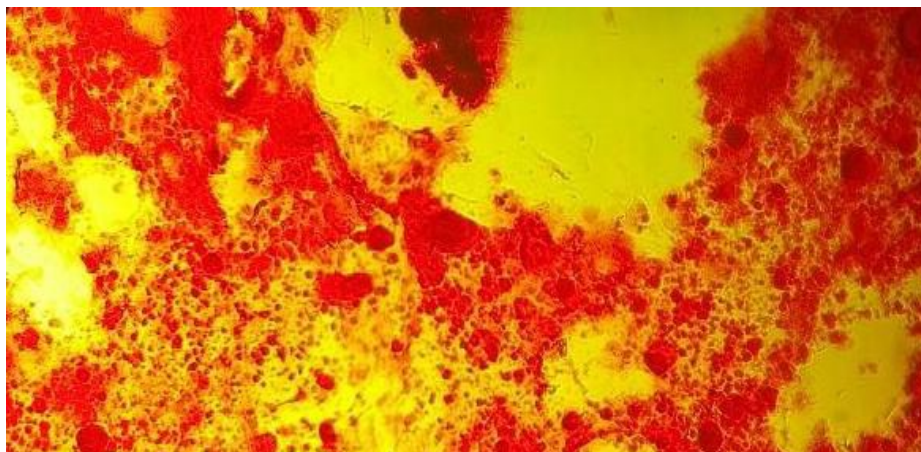


Fig. 11: Coloración con Rojo de Alizarín del cultivo de diferenciación osteogénica de MSC-CU.

3.3 DIFERENCIACION CONDROGENICA

Se realizaron cortes histológicos a la esfera de cartílago formada a partir del cumulo de células que fueron diferenciadas con medio condrogénico. Al ser coloreadas con Alcian blue mostraron la presencia de matriz extracelular característico de tejido cartilaginoso, específicamente mucosustancias fuertemente sulfatas, el cual se muestra como fibras coloreadas de color celeste (Fig.12).

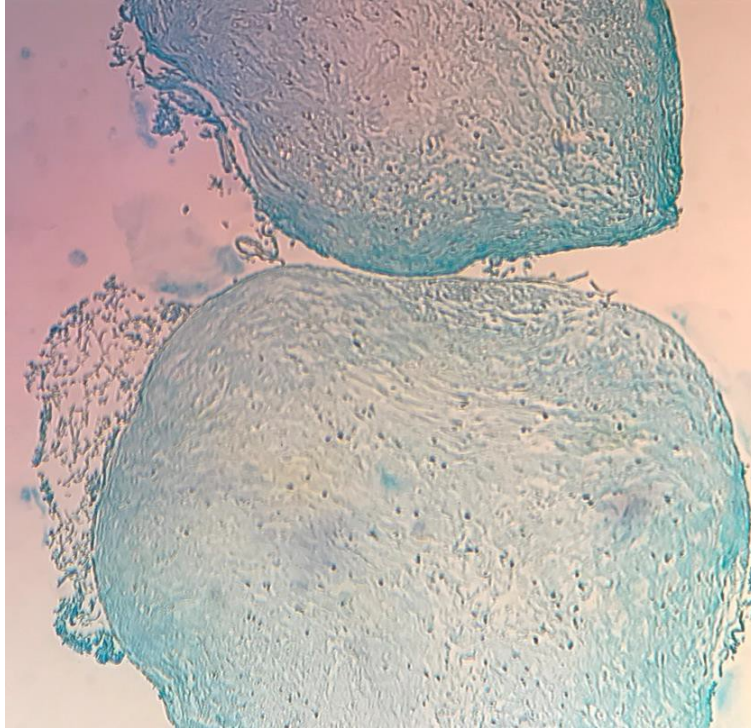


Fig.12: Corte histológico coloreado con Alcian Blue que muestra fibras de color celeste correspondiente a la matriz extracelular de condrocitos.

4. CULTIVO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS

Los fibroblastos dérmicos crecieron en monocapa sobre el frasco de cultivo obteniéndose una confluencia al 70-80% al quinto día después del subcultivo (Fig. 13).

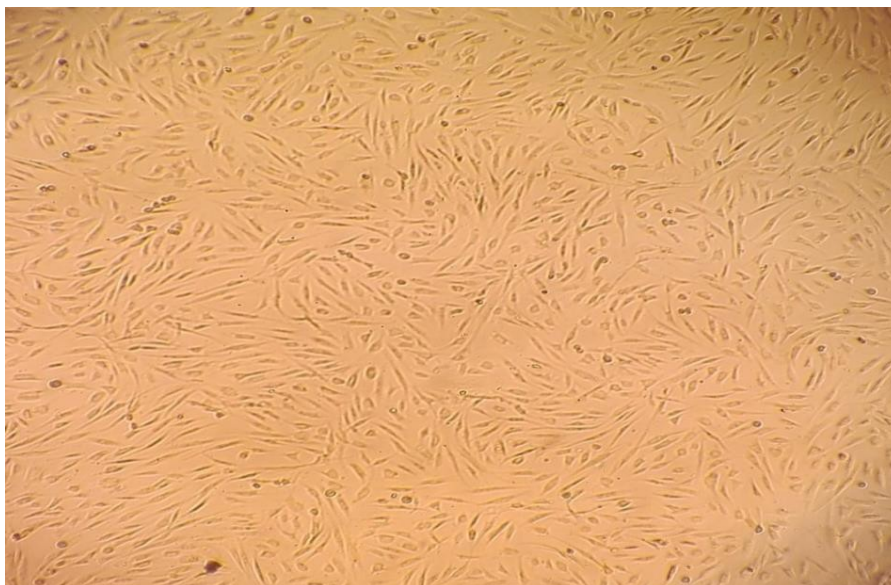


Fig.13: Cultivo de fibroblastos dérmicos en confluencia al 70% (10X)

5. OBTENCION DEL GEL DE FIBRINA POBRE EN PLAQUETAS.

Se obtuvo un gel semisólido a partir de la activación del plasma pobre en plaquetas, observándose al microscopio invertido un aspecto granulado uniforme correspondiente a la fibrina (Fig.14).



Fig.14: Gel de fibrina pobre en plaquetas observado bajo microscopia invertida (10X).

6. OBTENCION DEL GEL DE FIBRINA RICO EN PLAQUETAS.

Se obtuvo un gel de consistencia semisólida que, al ser observado en microscopia invertida, evidencio la presencia de gránulos gruesos correspondientes a las plaquetas en la malla de fibrina (fig.15).

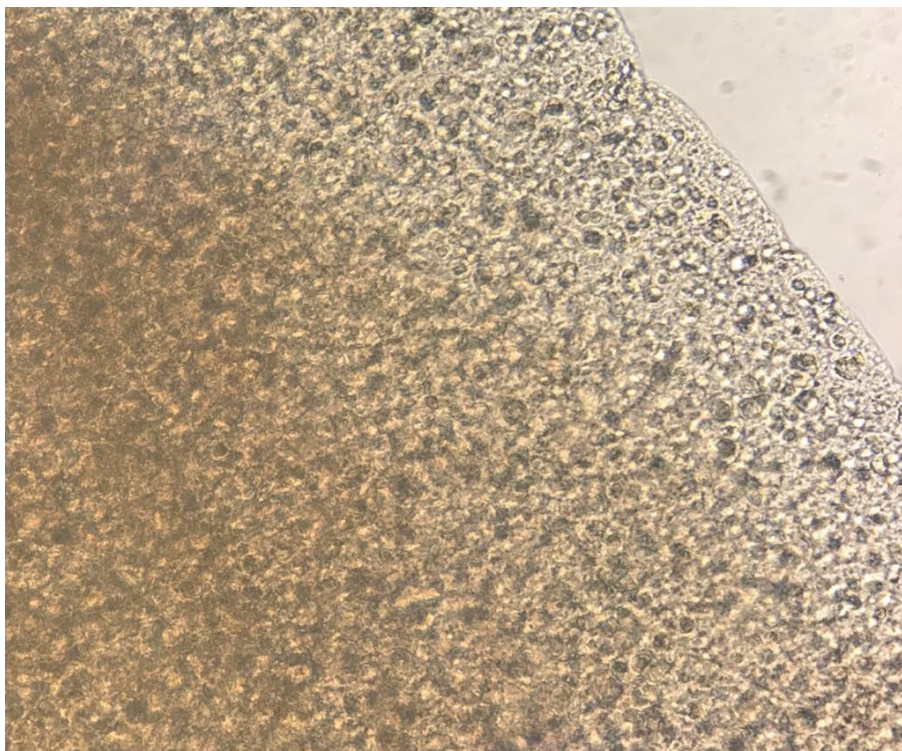


Fig.15: Gel de fibrina rico en plaquetas observado bajo microscopia invertida (40X).

7. OBTENCION DEL GEL DE FIBRINA RICO EN PLAQUETAS COMBINADO CON CELULAS MADRE MESENQUIMALES.

Se obtuvo un gel semisólido (Fig.16) que después de 48 horas de incubación en condiciones de cultivo celular se observó el crecimiento de la MSC-CU en forma espigada sobre la malla de fibrina con plaquetas (Fig.17).



Fig.16: Gel de fibrina rico en plaquetas con células madre mesenquimales.

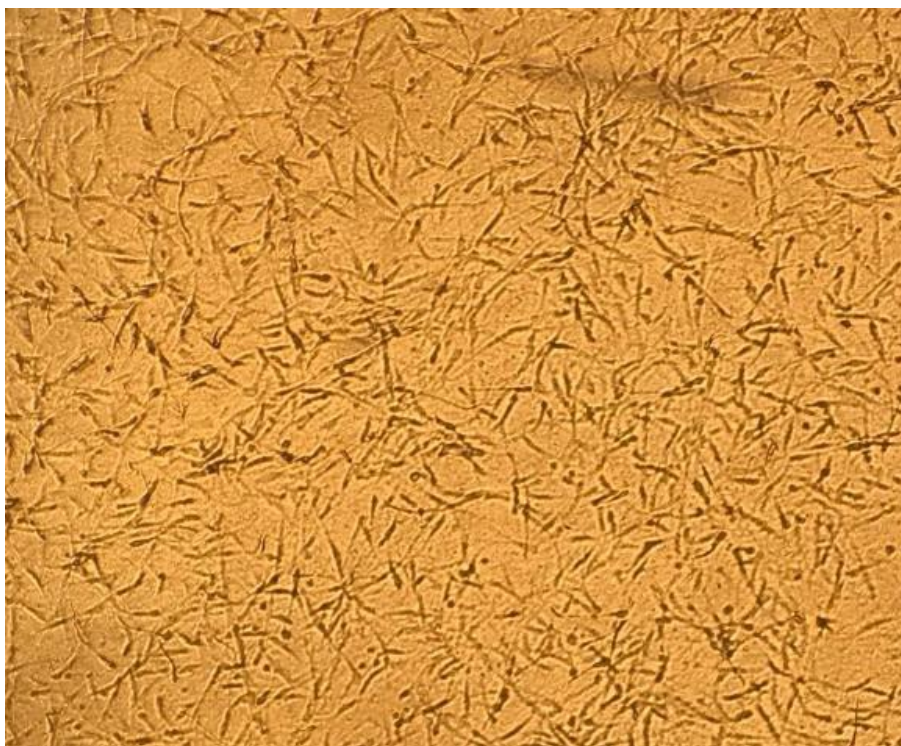


Fig.17: Gel de fibrina con plaquetas y células madre mesenquimales (forma espigada) en condiciones de cultivo celular (10X).

8. MEDICION DE LA LIBERACION DE LAS BIOMOLÉCULAS A PARTIR DEL GEL PLAQUETARIO CON Y SIN CELULAS MADRE MESENQUIMALES.

Las mediciones se realizaron en el líquido liberado por los geles respectivos, en las placas de cultivo de 6 pozos. El líquido liberado fue evaluado por medio de la técnica del ELISA tipo sándwich de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en placas de 96 pozos. Se usó como control de la presencia de los factores de crecimiento, el sobrenadante del cultivo de MSC-CU suplementado con LPH.

a. EVALUACION DEL EFECTO DE CONCENTRACION PLAQUETARIA Y CINETICA DE LIBERACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS BB (PDGF-BB)

Se determinó por ELISA la concentración de proteína liberada en las concentraciones de plaquetas descritas y en los tiempos de incubación hasta por 120 horas. Se muestra (Tabla 1) la concentración de liberación en función a la concentración plaquetaria y el tiempo de incubación. Los resultados obtenidos muestran una liberación constante significativa ($p < 0.0001$) hasta las 120 horas de incubación entre la concentración más alta (1.5×10^6 pq/ul) y las más baja (0.5×10^6 pq/ul).

Tabla 1. PDGF-BB liberado en pg/mL en función al tiempo de incubación

y

c	TIEMPO			
	(horas)			
Concentración plaquetaria	12 (pg/mL)	48 (pg/mL)	96 (pg/mL)	120 (pg/mL)
1.5 x 10 ⁶ pg/ul	22741 +/- 191	45785 +/- 223	46541 +/- 287	46217 +/-231
1.0 x 10 ⁶ pg/ul	48712 +/- 188	40726 +/- 234	35514 +/- 256	36171 +/- 198
0.5 x 10 ⁶ pg/ul	37131 +/- 270	14510 +/- 178	11958 +/- 234	10887 +/- 255

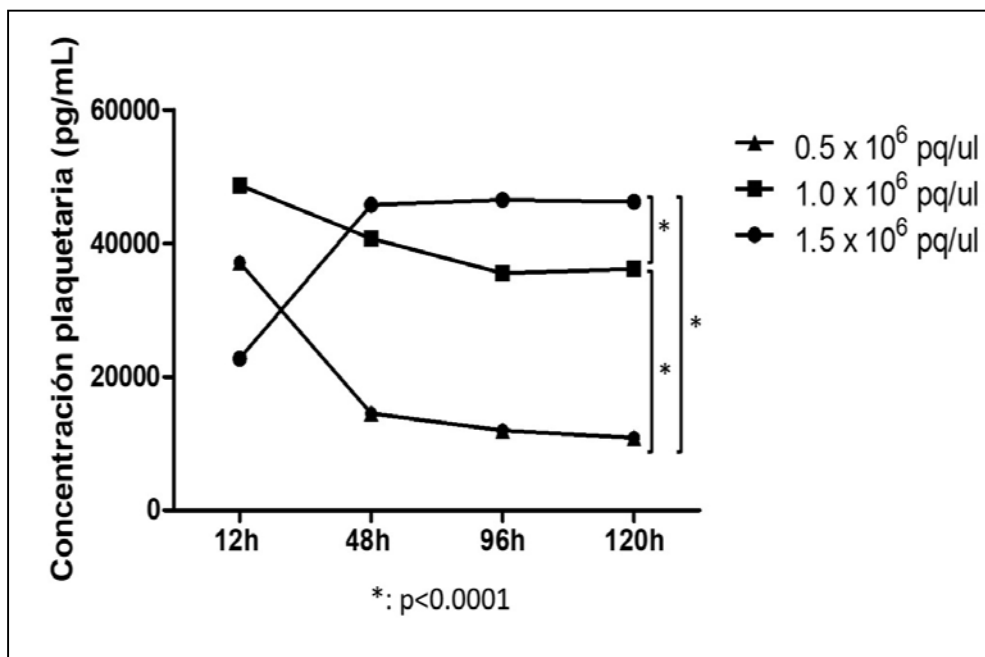


Fig. 18: Cinética de liberación del PDGF-BB a partir del gel en función de la concentración plaquetaria. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media. Test Two-way RM ANOVA Matching by cols. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Two-way RM ANOVA Matching by cols

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	41.76	$P < 0.0001$
Time	2.28	$P < 0.0001$
Concentración plaquetaria	55.93	$P < 0.0001$
Subjects (matching)	0.0112	0.1008

b. DETERMINACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS FRACCION BB.

Se descongeló las muestras obtenidas a las 6, 24, 48 y 96 horas de cada gel preparado y se realizó un ELISA con curva de calibración para determinar la cantidad de PDGF-BB liberada en la muestra. Los resultados muestran

valores promedio altos para los preparados que contienen plaquetas en su composición y los que no contienen plaquetas valores mucho menores ($p < 0.0001$). Además, se evidencia una liberación constante del PDGF-BB tanto en el producto de plaquetas solas y mezcladas con células MSC (Fig.19).

Tabla 2. Concentración de PDGF-BB (pg/mL) obtenido en cada producto elaborado y en los tiempos de incubación propuestos.

PRODUCTO	TIEMPO			
	6 horas (pg/mL)	24 horas (pg/mL)	72 horas (pg/mL)	96 horas (pg/mL)
GEL PQ	38050 +/- 170	55050 +/- 165	45050 +/- 234	39050 +/- 176
GEL PQ + MSC	39050 +/- 154	39050 +/- 345	51050 +/- 167	53050 +/- 178
GEL FIBRINA + MSC	11050 +/- 145	11050 +/- 187	12050 +/- 190	8050 +/- 167
GEL DE FIBRINA	7050 +/- 188	8050 +/- 128	1050 +/- 219	1050 +/- 132
MSC CULTIVO + HPL	10050 +/- 134	11050 +/- 168	9050 +/- 133	12050 +/- 147

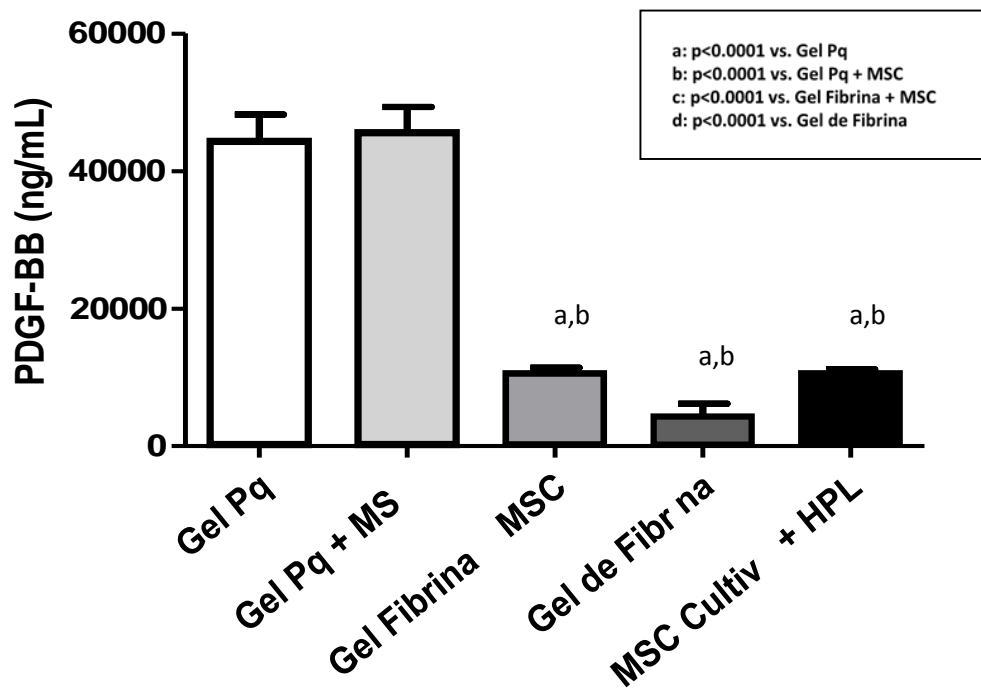


Fig. 19: Comparación de la liberación de PDGF-BB a partir de los diferentes productos preparados hasta las 96 horas de incubación. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Se hizo un test Two-way RM ANOVA Matching by cols. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Gel Pq=gel de plaquetas, MSC=células madre mesenquimales, HPL=Lisado plaquetario humano.

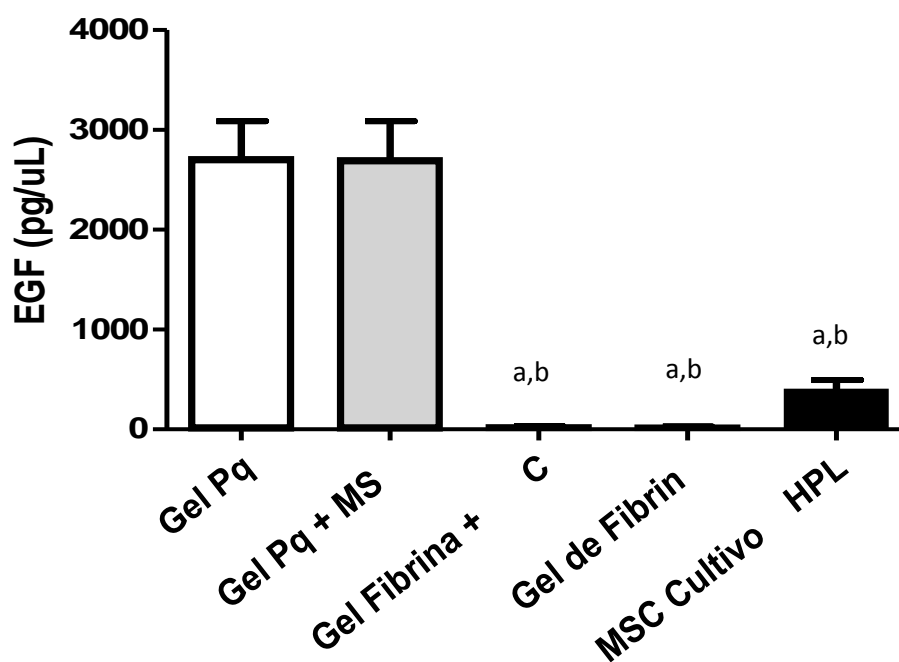
c. DETERMINACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

La liberación de EGF en el medio condicionado mostro una cinética constante similar a la liberación de PDGF-BB, y la mayor liberación se dio en los productos que contenían plaqueta como constituyente y muy poca

liberación de los otros productos pobres en plaquetas. Al análisis en conjunto de la liberación a lo largo de 96 horas, se determinó una significancia ($p < 0.05$) con respecto a los productos que solo contenían fibrina o fibrina con células (fig.20).

Tabla 3. Concentración de EGF (pg/mL) liberado por cada producto hasta las 96 horas.

PRODUCTO	TIEMPO (horas)			
	6 (pg/mL)	24 (pg/mL)	72 (pg/mL)	96 (pg/mL)
GEL PQ	2920 +/- 270	1562 +/- 345	3062 +/- 253	3262 +/- 341
GEL PQ + MSC	3320 +/- 321	3129 +/- 245	2762 +/- 156	1562 +/- 199
GEL FIBRINA + MSC	32 +/- 5	42 +/- 4	13 +/- 3	3 +/- 2
GEL DE FIBRINA	53 +/- 6	13 +/- 6	3 +/- 1	3 +/- 2
MSC CULTIVO + HPL	262 +/- 16	462 +/- 19	662 +/- 35	132 +/- 23



a: $p < 0.0001$ vs. Gel Pq
b: $p < 0.0001$ vs. Gel Pq + MSC
c: $p < 0.0001$ vs. Gel Fibrina + MSC
d: $p < 0.0001$ vs. Gel de Fibrina

Fig.20: Comparación en grupos de la liberación de EGF hasta las 96 horas de incubación. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Se hizo un test Two-way RM ANOVA Matching by cols. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Gel Pq=gel de plaquetas, MSC=células madre mesenquimales, HPL=Lisado plaquetario humano.

d. DETERMINACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR

La liberación de VEGF en el medio condicionado mostro una cinética constante similar a la liberación de PDGF-BB y EGF, y la mayor liberación

se dio en los productos que contenían plaquetas como constituyentes y muy poca liberación de los otros productos pobres en plaquetas. Se evidenció una mayor liberación del producto que contenía plaquetas y células, aunque no fue estadísticamente significativo. Al análisis en conjunto de la liberación a lo largo de 96 horas, se determinó una significancia ($p < 0.05$) con respecto a los productos que solo contenían fibrina ó fibrina con células (Fig.21).

Tabla 4. Concentración de VEGF (pg/mL) liberado por cada producto hasta las 96 horas.

PRODUCTO	TIEMPO			
	6 horas (pg/mL)	24 horas (pg/mL)	72 horas (pg/mL)	96 horas (pg/mL)
GFRP: GEL PQ	1550 +/- 35	1785 +/- 48	1750 +/- 56	1810 +/- 34
GFRP-MSC: GEL PQ + MSC	ND	4118 +/- 78	3451 +/- 76	3800 +/- 88
GFPP-MSC: GEL FIBRINA + MSC	118 +/- 23	451 +/- 15	500 +/- 25	350 +/- 35
GFPP: GEL DE FIBRINA	100 +/- 10	118 +/- 14	90 +/- 23	120 +/- 24
MSC cultivadas con HPL al 10%: MSC CULTIVO + HPL	451 +/- 17	1451 +/- 34	1700 +/- 37	1900 +/- 45

ND: No determinado

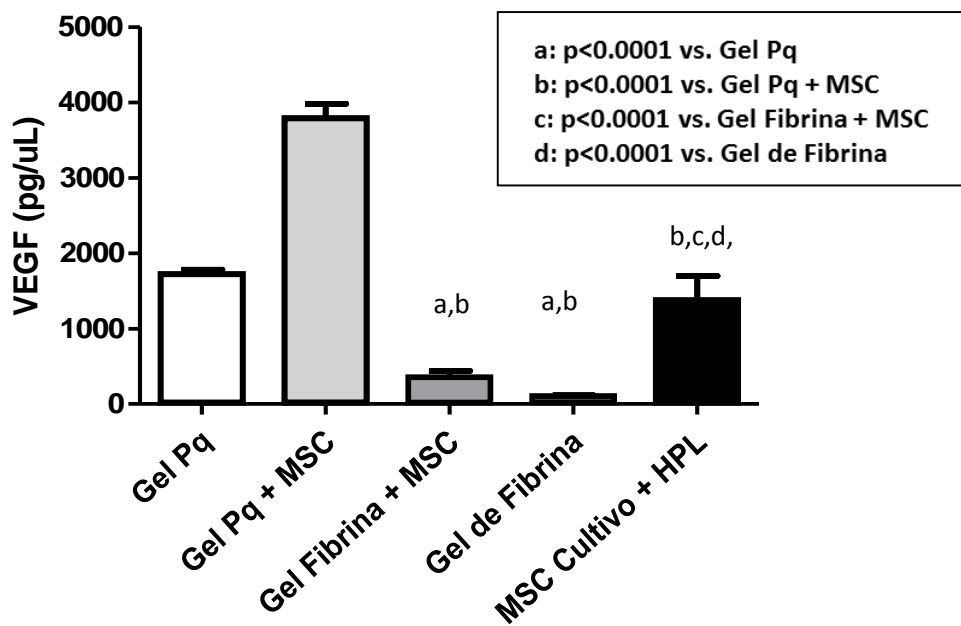


Fig.21: Comparación en grupos de la liberación de VEGF en el medio condicionado hasta las 96 horas de incubación. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Se hizo un test Two-way RM ANOVA Matching by cols. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Gel Pq=gel de plaquetas, MSC=células madre mesenquimales, HPL=Lisado plaquetario humano.

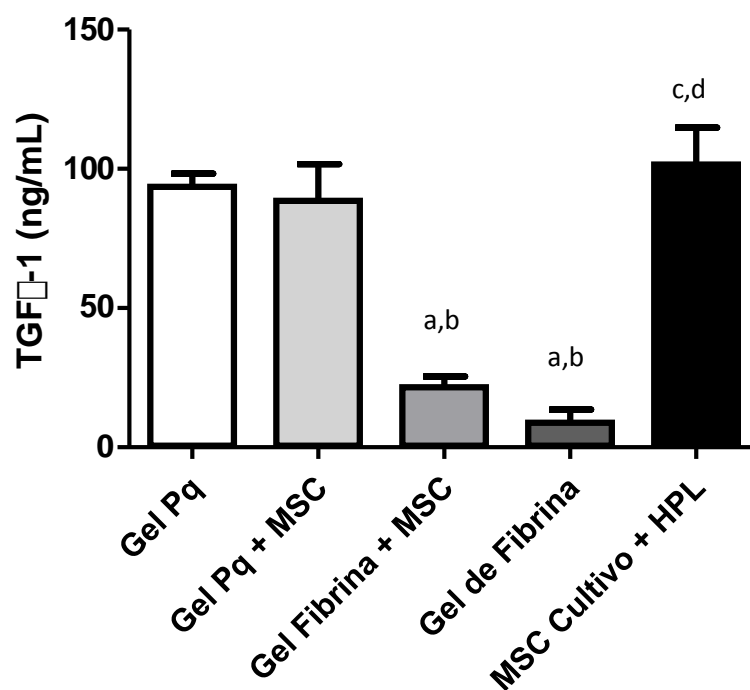
e. DETERMINACION DE TGF- β 1

La liberación de TGF- β 1 en el medio condicionado mostro también cinética constante similar a la liberación de los otros factores de crecimiento evaluados, y la mayor liberación se dieron en los productos que contenían plaquetas como constituyentes y muy poca liberación de los otros productos pobres en plaquetas. La cantidad de proteína en ng/mL fue la más alta dentro de los factores evaluados requiriendo realizar diluciones de hasta 50 veces. Al análisis en conjunto de la liberación a lo largo de 96 horas, se

determinó una significancia ($p < 0.05$) con respecto a los productos que solo contenían fibrina o fibrina con células (Fig.22).

Tabla 5. Concentración de TGF-B1 liberado por cada producto hasta las 96 horas.

PRODUCTO	TIEMPO			
	6 horas (ng/mL)	24 horas (ng/mL)	72 horas (ng/mL)	96 horas (ng/mL)
GEL PQ	81 +/- 3	91 +/- 5	101 +/- 6	101 +/- 5
GEL PQ + MSC	51 +/- 4	101 +/-6	111 +/-6	91 +/-10
GEL FIBRINA + MSC	21 +/- 5	22 +/- 8	31 +/- 3	12 +/- 5
GEL DE FIBRINA	21 +/- 4	12 +/- 3	1 +/- 1	1 +/-1
MSC CULTIVO + HPL	82 +/- 5	92 +/- 7	91 +/- 8	141 +/- 13



a: $p < 0.0001$ vs. Gel Pq
 b: $p < 0.0001$ vs. Gel Pq + MSC
 c: $p < 0.0001$ vs. Gel Fibrina + MSC
 d: $p < 0.0001$ vs. Gel de Fibrina

Fig.22: Comparación en grupos de la liberación de TGF-β1 en el medio condicionado hasta las 96 horas de incubación. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Se hizo un test Two-way RM ANOVA Matching by cols. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Gel Pq=gel de plaquetas, MSC=células madre mesenquimales, HPL=Lisado plaquetario humano.

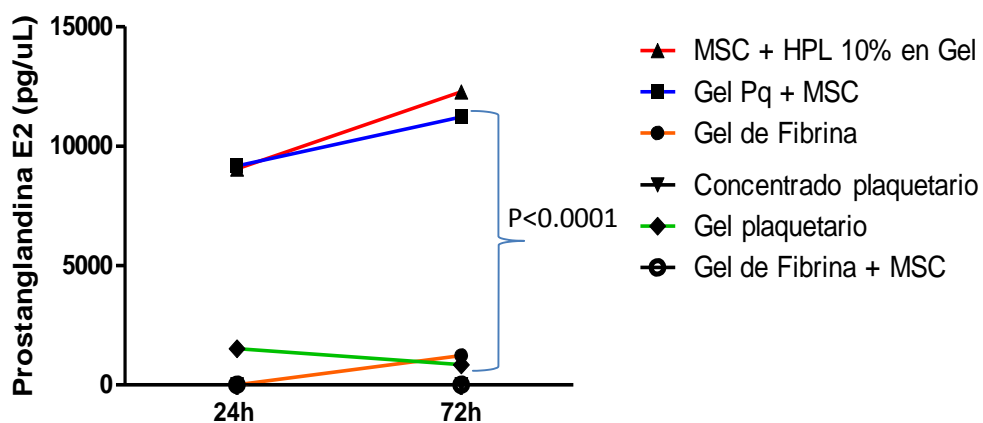
f. DETERMINACION DE PROSTAGLANDINA E2

La evaluación de PGE2 se determinó en dos tiempos de incubación, con la finalidad de demostrar la liberación a partir de plaquetas ó de células en

cultivo con plaquetas. Los resultados muestran (Fig.23) que hay una liberación sostenida hasta las 72 horas a partir del producto del GFRP-MSc en comparación con el GFRP ($p < 0.01$).

Tabla 6. Concentración de PGE2 liberado en cada uno de los productos elaborados

Producto	TIEMPO (horas)	
	24 (pg/mL)	72 (pg/mL)
Gel de fibrina	0	1233 +/- 80
Gel de plaquetas + MSC	9166 +/- 210	11213 +/- 353
MSC + HPL 10% en gel	9043 +/- 290	12266 +/- 180
Concentrado plaquetario	0	0
Gel plaquetario	1520 +/- 85	848 +/- 201
Gel de fibrina + MSC	0	0



Two-way RM ANOVA Matching by cols		
Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	1.97	P<0.0001
Time	1.02	P<0.0001
Treatment by group	96.65	P<0.0001
Subjects (matching)	0.0893	0.9683

Fig.23: Liberación de PG-E2 en el medio condicionado. Se hizo un test Two-way RM ANOVA Matching by cols. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Gel Pq=gel de plaquetas, MSC=células madre mesenquimales, HPL=Lisado plaquetario humano.

9. ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA *IN VITRO*

De acuerdo al protocolo establecido para el ensayo, los cultivos de fibroblastos que fueron suplementados con HPL al 5% y 10% mostraron un efecto de cierre del surco del 100% a las 48 horas de incubación. Cuando se suplementó al 10% con el medio condicionado derivado del gel de fibrina rico en plaquetas (gel plaquetario) se evidenció un 100% de cierre. Al suplementarse al 10% con el medio condicionado derivado del gel plaquetario con MSC, se obtuvo un 75% de cierre. Los productos que no tenían plaquetas, no mostraron ningún efecto en el cierre. El aumento del porcentaje de suplementación a 20% retardo el efecto de cierre a 50% con el gel plaquetario y 25% con el gel plaquetario y MSC. Un aumento del porcentaje de suplementación disminuye la cantidad de medio de cultivo,

que es esencial para un adecuado crecimiento celular. Los ensayos se realizaron por triplicado teniendo los mismos resultados.

Tabla 7. Suplementación del cultivo de fibroblastos y su efecto sobre el cierre de herida *in vitro* expresado en porcentaje.

POZO	MEDIO DE CULTIVO CON SUPLEMENTO (%)	% CIERRE 48 Horas
1	Suero bovino fetal al 10%	50%
2	Lisado plaquetario humano al 5%	100%
3	Lisado plaquetario humano al 10%	100%
4	GFPP + MSC al 10%	0%
5	GFPP + MSC al 20%	0%
6	GFRP + MSC al 10%	75%
7	GFRP + MSC al 20%	25%
8	GFRP al 10%	100%
9	GFRP al 20%	50%

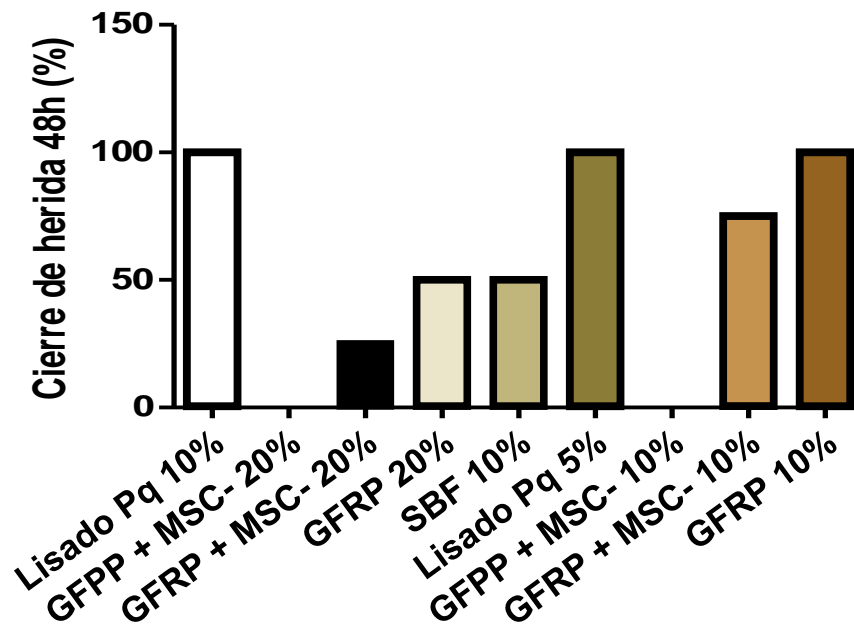


Fig.24: Porcentaje del cierre de herida en función del tipo de medio condicionado colocado como suplemento en el cultivo de fibroblastos. GFRP=gel plaquetario, SBF=suero bovino fetal, GFPP=gel de fibrina, MSC=células madre mesenquimales, Lisado Pq= lisado plaquetario humano.

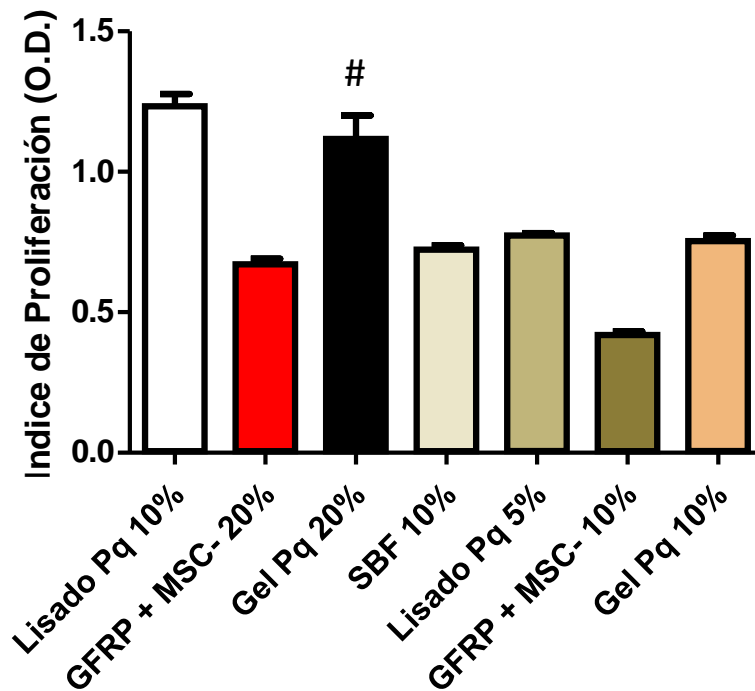
10. EFECTO SOBRE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS

Los resultados muestran que la suplementación con el medio condicionado al 20% del gel plaquetario es significativo ($p < 0.0001$) con respecto al gel plaquetario con MSC. Comparado con el control de suplementación (SBF al 10%) el gel plaquetario evidencia un efecto proliferativo superior ($p < 0.0001$) al 20% y similar efecto cuando está al 10% en el medio de cultivo. El gel plaquetario con MSC suplementando al 20% el medio, muestra similar efecto que el SBF al 10%. El HPL al 10% muestra el mejor efecto proliferativo que todos los productos diseñados ($p < 0.05$).

Tabla 8. Efecto de la suplementación del medio de cultivo sobre la proliferación de fibroblastos dérmicos mediante el ensayo de MTT.

Pozo	Suplemento en cultivo	Índice de proliferación
1	Suero bovino fetal al 10%	0.72 +/- 0.022
2	Lisado plaquetario humano al 5%	0.77 +/- 0.015
3	Lisado plaquetario humano al 10%	1.25 +/- 0.05
4	MSC + gel plaquetario al 10%	0.42 +/- 0.02
5	MSC + gel plaquetario al 20%	0.67 +/- 0.03
6	Gel plaquetario al 10%	0.75 +/- 0.04
7	Gel plaquetario al 20%	1.1 +/- 0.03

Proliferación de fibroblastos



*: $p < 0.05$ vs. Lisado Pq 10%

#: $p < 0.05$ vs. GFRP + MSC-20%

Fig. 25: Se muestran los índices de proliferación de fibroblastos cultivados con los diferentes medios condicionados y suplementados en los porcentajes que se indican. Los resultados se muestran en O.D. (densidad óptica para la técnica de MTT). Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Se hizo un ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

VII. DISCUSION

La presente investigación tuvo como pilar fundamental una adecuada obtención y caracterización de MSC de cordón umbilical, para lo cual se definió el aislamiento de MSC a partir de la región proximal a la placenta, el cual es recomendado de acuerdo a un estudio previo ⁽⁵⁷⁾, siendo de alta capacidad proliferativa las células cultivadas.

Otro aspecto que fue incorporado en el protocolo de obtención de MSC de cordón umbilical, es la suplementación de los cultivos con el lisado plaquetario humano (HPL) ⁽⁵⁸⁾, el cual demostró tener un mejor efecto proliferativo del cultivo de MSC en comparación con el suero bovino fetal (SBF). En los ensayos de migración y proliferación celular se pudo evidenciar la capacidad de estimulación entre el SBF y el HPL, siendo este último muy superior. EL HPL fue además usado como sustituto del SBF para el cultivo de fibroblastos dérmicos, siendo un 5% suficiente para una proliferación adecuada. En el estudio de Sovkova y col. ⁽⁵⁹⁾ mostraron que una concentración de 7% de HPL era comparable al 10% de SBF. También el HPL muestra efecto proliferativo sobre las células endoteliales de vena de cordón umbilical, que al suplementarse al 5% se obtiene la morfología característica y una confluencia en un tiempo menor en comparación con el SBF al 10%, tal como lo evidenció Hofbauer y col. ⁽⁶⁰⁾.

Las plaquetas son la principal fuente de factores de crecimiento tal como se evidencia en estudios anteriores ^(44,46). De acuerdo a los ensayos realizados se evidenció una relación entre la cantidad plaquetaria y la liberación del

PDGF-BB, encontrándose que la concentración de 1.5×10^6 /ul de plaquetas presenta una mejor liberación ($p < 0.0001$) con respecto a las otras dos concentraciones menores, lo que indica que la cantidad plaquetaria es un factor esencial para la liberación de los factores de crecimiento.

La formación del gel de fibrina está dada por el uso de agentes activadores, y de acuerdo a un trabajo publicado ⁽⁶¹⁾, ha mostrado que el suero tiene un efecto liberador de los factores de crecimiento (trombina autóloga), pero en el presente estudio se utilizó trombina comercial libre de suero para evitar el efecto de las proteínas fibrinolíticas y de esa manera se mantuvo estable el gel hasta por 5 días. El cloruro de calcio como activador también ha sido evaluado en la formación del gel de fibrina, demostrando que hay una liberación constante de proteínas a lo largo de varios días ⁽⁶³⁾, tal como evidenciamos en el presente estudio.

La incorporación de MSC sobre matrices de fibrina ha sido evaluada en varios estudios ^(48,54), pero aquí evaluamos el crecimiento celular sobre el gel de fibrina con plaquetas a una concentración de 1.5×10^6 plaquetas/ul, demostrando que las células pueden crecer y proliferar, manteniendo su viabilidad mientras se encuentren en condiciones de cultivo, tal como se demostró en un estudio ⁽⁶⁴⁾, donde a concentraciones de 1×10^6 plaquetas/ul y 2×10^6 plaquetas/ul mostraron viabilidades óptimas de MSC hasta por 7 días.

El principal aporte de la presente investigación ha sido medir diversas biomoléculas de carácter regenerativo e inmunomodulatorio liberados a

partir de los geles de fibrina con plaquetas y/ó combinadas con MSC-CU, en condiciones de cultivo celular y del cual no existen publicaciones similares. Los resultados mostraron que hay un comportamiento similar en la producción de PDGF-BB, EGF, VEGF y TGF- β 1 en los productos elaborados e incubados hasta las 96 horas. Evidenciamos que las plaquetas son la principal fuente de producción de las proteínas estudiadas tal como se evidencio en un estudio anterior ⁽⁴⁶⁾, y que al combinarse con MSC, no encontramos diferencias significativas en la producción de los factores estudiados. Al medir las proteínas en los geles de fibrina pobre en plaquetas y en los de fibrina solo con MSC, encontramos muy poca cantidad ($p < 0.0001$) en comparación con los productos que contenían plaquetas. Estos resultados sugieren el escaso aporte de MSC en el diseño del gel y refuerza a las plaquetas como el principal constituyente para diseñar geles de fibrina con fines regenerativos.

Se ha descrito a la prostaglandina E2 como uno de los principales factores inmunomodulatorios producidos por MSC, por lo que se analizó su liberación en los productos diseñados, encontrándose una mayor liberación en el gel de fibrina con plaquetas y MSC en comparación con el gel de fibrina con plaquetas ($p < 0.0001$) y con el gel de fibrina y MSC. Estos resultados muestran que es la MSC el principal productor de PGE-2 y que en forma similar a otro estudio previo ⁽⁶⁵⁾, no requiere de un estímulo inflamatorio para su producción en cultivo. Los resultados también evidencian que MSC requiere de los factores de crecimiento para la liberación de PGE-2. La matriz de fibrina por si sola aparentemente no

ejerce un efecto estimulador sobre MSC, lo que debe ser tomado en cuenta para futuros estudios.

En el ensayo de cierre de herida los resultados evidenciaron que hay un estímulo hacia la migración y cierre del surco en cultivo de los fibroblastos cuando se cultivan con el medio condicionado producido por el gel de fibrina rico en plaquetas suplementado en el medio al 10% en forma similar al cultivado con el lisado plaquetario al 10%. La suplementación al 10% con el gel de fibrina con plaquetas y MSC evidenció un cierre al 75% en el mismo tiempo. Un menor efecto por parte del producto con MSC es debido probablemente a que hay menos factores de crecimiento por el efecto dilucional del medio de cultivo presente en el gel con MSC. La misma tendencia se observó al suplementar con el 20%, lo que sugiere que el medio de cultivo es un factor importante que se debe tomar cuenta para los ensayos *in vitro*. Los productos que no contienen plaquetas, no promueven la migración, muy al contrario, evidenciaron muerte celular, por la falta de factores de crecimiento.

El índice de proliferación evaluado por la técnica de MTT, evidenció que los fibroblastos proliferan cuando el medio de cultivo es suplementado con los medios condicionados derivados de los geles que contienen plaquetas ya sea con células o sin células, no habiendo proliferación con los productos que no contenían plaquetas. En un estudio previo ⁽⁶⁶⁾, demostraron el efecto del plasma rico en plaquetas sobre el cultivo de fibroblastos gingivales, encontrando similar efecto que, con el SBF, pero sin realizar ningún tipo de activación de las plaquetas, lo que no determina si el aporte de factores de

crecimiento procede del plasma ó de las plaquetas. En el presente estudio demostramos que son las plaquetas las que generan el mayor aporte para el crecimiento celular de los fibroblastos. A diferencia del modelo de cierre de herida las concentraciones de suplementación al 20% del gel de fibrina con plaquetas tuvo mejor efecto proliferativo en comparación con el gel de fibrina con plaquetas y MSC ($p < 0.0001$). Los resultados obtenidos no evidencian un aporte de MSC en el medio condicionado, para estimular la proliferación de fibroblastos.

El gel de fibrina rico en plaquetas ó gel plaquetario, ha mostrado ser un medio factible para su aplicación como un biomaterial y se correlaciona con otros estudios previamente publicados ⁽⁶³⁾. El presente estudio demuestra el efecto significativo de las plaquetas como fuente de factores de crecimiento en el contexto de la reparación tisular a nivel dérmico.

El estudio realizado, si bien no evidencia un aporte de MSC en el diseño del gel de fibrina y plaquetas, ha mostrado que puede promover la liberación de otras biomoléculas propias de MSC como la prostaglandina E2 y que es un medio adecuado para el crecimiento celular de MSC, teniendo potencial para futuros ensayos.

VIII. CONCLUSIONES

- Se protocolizó de acuerdo a los estándares internacionales el aislamiento, cultivo y caracterización de las células madre mesenquimales derivados del cordón umbilical humano.
- Se diseñó exitosamente el gel de fibrina con plaquetas con crecimiento celular de MSC dentro del gel, el cual puede ser usado en futuras investigaciones.
- Las plaquetas son la principal fuente de factores de crecimiento, no habiendo un aporte adicional por parte de MSC en los geles de fibrina diseñados.
- Los ensayos de cierre de herida *in vitro* y de proliferación de fibroblastos dérmicos han evidenciado que no es necesario la incorporación de MSC en el gel de fibrina con plaquetas para fines regenerativos.
- La producción de prostaglandina E2 por parte de MSC no evidenció un aporte mayor que el de el gel con sólo plaquetas en los ensayos *in vitro*, no descartando su efecto *in vivo*.
- En conclusión, el gel de fibrina con plaquetas y MSC muestra un efecto regenerativo *in vitro* similar con el gel de fibrina con plaquetas, lo que sugiere que este último producto es suficiente para tratar las úlceras de índole crónica a nivel clínico.

IX. RECOMENDACIONES

Para futuros estudios usando el gel de fibrina con plaquetas y MSC, también se debe analizar la producción de citoquinas, moléculas de adhesión y otras moléculas con propiedades inmunomoduladoras, con la finalidad de definir aún más el rol que puedan cumplir cada uno de los productos biológicos en la regeneración tisular. Se debe evaluar en mayor detalle el efecto sobre las células endoteliales y queratinocitos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27 (5):1047-1053.
2. Luis Farro, Raquel Tapia, Luz Bautista, Rosa Montalvo, Hermelinda Iriarte. Características clínicas y demográficas del paciente amputado. *Rev. Med. Hered.* 2012; 23(4):240-243.
3. International Diabetes Federation. Time to act: Diabetes and foot care. Brussels: International Diabetes Federation; 2005.
4. Babaei V, Afradi H, Gohardani HZ, Nasser F, Azarafza M, Teimourian S. Management of chronic diabetic foot ulcers using platelet-rich plasma. *J Wound Care.* 2017 Dec 2; 26(12):784-787.
5. Cao Y, Gang X, Sun C, Wang G. Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. *J Diabetes Res.* 2017; 2017:9328347.
6. Apelqvist J, Bakker K, Van Houtum. Practical Guidelines on the management and prevention of the diabetic foot: based upon the international consensus on the diabetic foot (2007) prepared by the International Working group on the Diabetic Foot. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24 SUPPL 1:S181-187.
7. Boniakowski AE¹, Kimball AS, Jacobs BN, Kunkel SL, Gallagher KA. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J Immunol.* 2017 Jul 1;199(1):17-24.

8. Tentolouris N, Al-Sabbagh S, Walker MG, Boulton AJ, Jude EB. Mortality in diabetic and nondiabetic patients after amputations performed from 1990 to 1995: a 5-year follow-up study. *Diabetes Care* (2014) 27:1598–1604.
9. Lazo MdlA, Bernabé -Ortiz A, Pinto ME, Ticse R, Malaga G, et al. Diabetic Peripheral Neuropathy in Ambulatory Patients with Type 2 Diabetes in a General Hospital in a Middle Income Country: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE*.2014; 9(5).
10. Alcantara W, Flores R, Garmendia F. Prevalencia y riesgo de amputación en pacientes con pie diabético. *Anales Fac. Medicina*. 1999; 60(3):159.
11. Torres-Aparcana HL, et al. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes hospitalizados por pie diabético en el Hospital Nacional Dos de Mayo entre 2006 y 2008, Lima-Perú. *Rev. Perú. Epidemiol.* Diciembre 2012; 16(3).
12. Luis Neyra-Arisméndiz, José Solís-Villanueva, Óscar Castillo-Sayán y Freddy García-Ramos. Diabetic foot review. *Rev Soc Peru Med Interna*. 2012; vol 25 (2).
13. Willy Ramos, Tania López, Luis Revilla, Luis More, María Huamaní, Milagros Pozo. Results of the epidemiological surveillance of diabetes mellitus in hospitals in Peru, 2012. *Rev. peru. med. exp. salud publica*. 2014; 31(1).
14. Inaba S, Egashira K, Komori K. Peripheral-blood or bone marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis?. *Lancet*. 2002;360(9350):2083.

15. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) study investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*. 2002;360:427 – 35.
16. Subrammanian R, Amalorpavanathan J, Shankar R, Rajkumar M, Baskar S, Manjunath SR, Senthilkumar R, Murugan P, Srinivasan VR, Abraham S. Application of autologous bone marrow mononuclear cells in six patients with advanced chronic critical limb ischemia as a result of diabetes: our experience. *Cytotherapy*. 2011 Sep;13(8):993-9.
17. R Onodera et al. Bone marrow mononuclear cells versus G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells for treatment of lower limb ASO: pooled analysis for long-term prognosis. *Bone Marrow Transplantation*. 2011; 46: 278–284.
18. Teraa M1, Sprengers RW, van der Graaf Y, Peters CE, Moll FL, Verhaar MC. Autologous bone marrow-derived cell therapy in patients with critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Ann Surg*. 2013 Dec; 258(6): 922-9.
19. Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. Fibroblast Precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol*. 1976; 4: 267–274.
20. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment

- of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation 1974; 17:331-40.
21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Staper Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8:315-317.
 22. Jyoti A. Kode, Shayanti Mukherjee, Mugdha V. Joglekar and Anandwardhan A. Hardikar. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. Review. Cytotherapy. 2009;11(4):77.
 23. Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation in vitro Expansion and Characterization. Handb Exp Pharmacol. 2006;174:249-282.
 24. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM. Adipose-derived stromal cells their utility and potential in bone formation. Int J Obes Relat Metab Disord. 2000; 24 Suppl 4, S41-S44.
 25. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001; 7: 211-228.
 26. Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I, Sen Y, Kawanishi K, Inada Y, et al. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. Plast Reconstr Surg. 2008;121:860.
 27. Vojtassak J, Danisovic L, Kubes M, Bakos D, Jarabek L, Ulicna M, et al. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. Neuro Endocrinol Lett. 2006;27(Suppl) 2:134.

28. Han Cheol Lee, MD, PhD; Sung Gyu An, MD; Hye Won Lee, MD; Jin-Sup Park, MD; Kwang Soo Cha, MD, PhD; Taek Jong Hong, MD, PhD; Jong Ha Park, PhD; Sun Young Lee, BSc; Sang-Pil Kim, MD; Yeong Dae Kim, MD, PhD; Sung Woon Chung, MD, PhD; Yong Chan Bae, MD, PhD; Yong Beom Shin, MD, PhD; Jeung Il Kim, MD; Jin Sup Jung, MD, PhD. Safety and Effect of Adipose Tissue-Derived Stem Cell Implantation in Patients With Critical Limb Ischemia: a pilot study. *Circulation Journal Official Journal of the Japanese Circulation Society*. 2012;76(7):1750-60.
29. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1:142-149.
30. Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory Curr Pharm Des. 2013;19(27):4893-9.
31. Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*. 2015;24(3):339-47.
32. Li XY1, Zheng ZH, Li XY, Guo J, Zhang Y, Li H, Wang YW, Ren J, Wu ZB. Treatment of foot disease in patients with type 2 diabetes mellitus using human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: response and correction of immunological anomalies. *J Cell Physiol* 2012: 702-709.
33. Gupta PK, Chullikana A, Parakh R, Desai S, Das A, Gottipamula S, Krishnamurthy S, Anthony N, Pherwani A, Majumdar AS. A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and

- efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia.. *J Transl Med.* 2013 Jun 10;11:143.
34. Das AK, Bin Abdullah BJ, Dhillon SS, Vijanari A, Anoop CH, Gupta PK. Intra-arterial allogeneic mesenchymal stem cells for critical limb ischemia are safe and efficacious: report of a phase I study. *World J Surg.* 2013 Apr;37(4):915-22.
35. John W. Semple, Joseph E. Italiano Jr. and John Freedman. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews, immunology* volume 11, april 2011.
36. Rachita Dhurat and MS Sukesh. Principles and Methods of Preparation of Platelet Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg.* 2014 OctDec; 7(4): 189–197.
37. F. Passaretti, M. Tia, V. D'Esposito, M. De Pascale, M. Del Corso, R. Sepulveres, D. Liguoro, R. Valentino, F. Beguinot, P. Formisano, & G. Sammartino. Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives. *Platelets.* 2014;25(4):252-6.
38. J. Alsousou, A. Ali, K. Willett & P. Harrison. The role of platelet-rich plasma in tissue regeneration. *Platelets,* May 2013; 24(3): 173–182.
39. Gino Bernuzzi, Saverio Tardito, Ovidio Bussolati, Daniela Adorni, Stefano Cantarelli, Francesco Fagnoni, Angelo Rossetti, Matteo Azzarone, Elena Ficarelli, Edoardo Caleffi , Giancarlo Gazzola, Massimo Franchini. Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma. *Blood Transfus.* 2010 Oct;8(4):237-47.

40. Yuan-Sheng Tzeng, Shou-Cheng Deng, Chih-Hsing Wang, Jui-Che Tsai, Tim-Mo Chen, and Thierry Burnouf. Treatment of Nonhealing Diabetic Lower Extremity Ulcers with Skin Graft and Autologous Platelet Gel: A Case Series. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 837620, 9 pages.
41. Marissa J. Carter, PhD, MA,^a Carelyn P. Fylling, MSN, RN, CWS, CLNC, and Laura K. S. Parnell, MSc, CWSc. Use of Platelet Rich Plasma Gel on Wound Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eplasty*. 2011; 11: e38. Published online Sep 15, 2011.
42. Torsten Slesaczeck, Hartmut Paetzold, Thomas Nanning, Andreas Reichel, Andreas Barthel, Stefan Bornstein, and Matthias Weck. Autologous derived, platelet-rich plasma gel in the treatment of nonhealing diabetic foot ulcer: a case report.. *Ther Adv Endocrinol Metab*. Apr 2012; 3(2): 75–78.
43. Giuseppe Aprili, Giorgio Gandini, Roberto Guaschino, Laura Mazzucco, Laura alvaneschi, Stefania Vaglio. SIMTI recommendations on blood components for non-transfusional use. SIMTI Working Group. *Blood Transfus*. 2013; 11: 611-22.
44. Jan Philipp Krüger^a, Undine Freymann^a, Samuel Vetterlein^a, Katja Neumann^a, Michaela Endres^{a,b}, Christian Kapsa. Bioactive Factors in Platelet-Rich Plasma Obtained by Apheresis. *Transfus Med Hemother* 2013;40:432–440.
45. Law Jia xian, shiplu roy chowdhury, aminuddin bin saim & ruszymah bt hj idrus. Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing. *Cytotherapy*, 2014; 0: 1e8.

46. C. Durante, F. Agostini, L. Abbruzzese, R. T. Toffola, S. Zanolin, C. Suine & M. Mazzucato. Growth factor release from platelet concentrates: analytic quantification and characterization for clinical applications. *Vox Sanguinis*. 2013;
47. Shuko Suzuki, Natsumi Morimoto and Yoshito Ikada. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *J Biomater Appl* published online 13 February 2013.
48. N. M. Argo[^] lo Neto, R. J. Del Carlo, B. S Monteiro, N. B. Nardi, P. C. Chagastelles, A. F. S. de Brito. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice.. *Clinical and Experimental Dermatology*, 37, 544–553.
49. Zhenzhen Lian, Xiaojing Yin¹, Hua Li, Lili Jia, Xiuzhen He, Yongbo Yan, Naihua Liu, Kayiu Wan, Xiaokun Li, Shaoqiang. Synergistic Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Lin. Ann Dermatol* Vol. 26, No. 1, 2014.
50. Wen Y, Gu W, Cui J, Yu M, Zhang Y, Tang C, Yang P, Xu X. Platelet-rich plasma enhanced umbilical cord mesenchymal stem cells-based bone tissue regeneration. *Arch Oral Biol*. 2014 Nov;59(11):1146-54.
51. Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation in vitro Expansion and Characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; 174:249-282.
52. La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Corrao S, Farina F, Anzalone R. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Maintain the Expression of Key Immunomodulatory Molecules When Subjected to Osteogenic,

- Adipogenic and Chondrogenic Differentiation In Vitro: New Perspectives for Cellular Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013 Jan 1;8(1):100-13.
53. Dobroslav Kyurkchiev, Ivan Bochev, Ekaterina Ivanova-Todorova, Milena Mourdjeva, Tsvetelina Oreshkova, Kalina Belemezova, Stanimir Kyurkchiev. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014 November 26; 6(5): 552-570.
54. Radwa A.Mehanna, Iman Nabil, Noha Attia, Amany A. Bary, Khalid A. Razek, Tamer A. E. Ahmed, and Fatma Elsayed. The Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media Topically Delivered in Fibrin Glue on Chronic Wound Healing in Rats. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 846062, 12 pages.
55. Michael O. Schaër, Jose Diaz-Romero, Sandro Kohl, Matthias A. Zumstein, Dobrila Nesic. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 2015 May;473(5):1635-43.
56. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2009; 156:149–60.
57. Naimisha Beeravolu, Irfan Khan, Christina McKee, Sumi Dinda, Bryan Thibodeau, George Wilson, Mick Perez-Cruet, Ray Bahado-Singh, G. Rasul Chaudhry. Isolation and comparative analysis of potential stem/progenitor

- cells from different regions of human umbilical cord. *Stem Cell Research*. 2016; 16: 696–71.
58. Stig-Frederik Trojahn Kølbe, Roberto S. Oliveri, Peter V. Glovinski, Maria Kirchhoff, Anders Bruun Mathiasen, Jens Jørgen Elberg, Peter Stemann Andersen, Krzysztof Tadeusz Drzewiecki & Anne Fischer-Nielsen. Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum—investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use. *Cytherapy*. 2013; 15: 1086-1097.
59. Sovkova V, Vocetkova K, Rampichova M, Mickova A, Buzgo M, Lukasova V, Dankova J, Filova E, Necas A, Amler E. Platelet lysate as a serum replacement for skin cell culture on biomimetic PCL nanofibers. *Platelets*. 2017 Jun; 26:1-11.
60. Hofbauer P, Riedl S, Witzeneder K, Hildner F, Wolbank S, Groeger M, Gabriel C, Redl H, Holnthoner W. Human platelet lysate is a feasible candidate to replace fetal calf serum as medium supplement for blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Cytherapy*. 2014 Sep;16(9):1238-44.
61. Huber SC, Cunha JL, Montalvão SAL, da Silva LQ, Paffaro AU, da Silva FAR, Rodrigues BL, Lana JFSD, Annichino-Bizzacchi JM. *In vitro* study of the role of thrombin in platelet rich plasma (PRP) preparation: utility for gel formation and impact in growth factors release. *J Stem Cells Regen Med*. 2016; 12(1).

62. Bruno Baudin, Arnaud Bruneel, Nelly Bosselut & Michel Vaubourdolle. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Prot.* 2007; 2 (3).
63. Mahmoud Sadeghi-Ataabadi , Zohreh Mostafavi-pour , Zahra Vojdani , Mahsa Sani , Mona Latifi, Tahereh Talaei-Khozani. Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Feb; 1;71:372-380.
64. Jagoda M. Jalowiec, Matteo D'Este, Jennifer Jane Bara, Jessica Denom, Ursula Menzel, Mauro Alini, Sophie Verrier, and Marietta Herrmann. An In Vitro Investigation of Platelet-Rich Plasma-Gel as a Cell and Growth Factor Delivery Vehicle for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2016 Jan;22(1):49-58.
65. Daniel J. Kota, Karthik S. Prabhakara, Naama Toledano-Furman, Deepa Bhattarai, Qingzheng Chen, Bryan Dicarolo, Philippa Smith, Fabio Triolo, Pamela I. Wenzel, Charles s. Cox Jr and Scott D. Olson. Prostaglandin E2 Indicates Therapeutic Efficacy Of Mesenchymal Stem Cells In Experimental Traumatic Brain Injury. *STEM CELLS* 2017; 00:000–000.
66. Javier Ramos-Torrecillas, PhD; Elvira de Luna-Bertos, PhD; Francisco J. Manzano-Moreno, MS; Olga Garcia-Martinez, PhD; and Concepcion Ruiz, PhD. Human Fibroblast-Like Cultures in the Presence of Platelet-Rich Plasma as a Single Growth Factor Source: Clinical Implications. *Advances in skin & wound care & vol. 27 no. 3.*
67. Hofbauer P, Riedl S, Witzeneder K, Hildner F, Wolbank S, Groeger M, Gabriel C, Redl H, Holnthoner W. Human platelet lysate is a feasible

candidate to replace fetal calf serum as medium supplement for blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Cytotherapy*. 2014 Sep;16(9):1238-44.

68. Ceron W, Lozada-Requena I, Ventocilla K, Jara S, Pinto M, Cabello M, Aguilar JL. Mesenchymal stem cells: definitions, culture and potential applications. *Rev Peru Med. Exp. Salud Pública*. 2016 Oct-Dec;33(4):758-771.

69. Katharina Schallmoser, Dirk Strunk. Preparation of Pooled Human Platelet Lysate (pHPL) as an Efficient Supplement for Animal Serum-Free Human Stem Cell Cultures. *Journal of Visualized Experiments*. 2009.