

**UNIVERSIDAD LATINA DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DR. WILLIAM C. GORGAS**  
**PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Comparación de métodos enzimáticos y comerciales para el aislamiento y expansión  
de células madres mesenquimales humanas derivadas de cordón umbilical, con  
potencial terapéutico**

**ELABORADO POR:**

WENDY M. ZHUO L.

**TRABAJO DESARROLLADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2026**

**DECLARACIÓN JURADA**

Yo, **Wendy M. Zhuo L.** con cédula No. **8-1002-2363**, estudiante graduando de la carrera de Biotecnología declaro bajo la gravedad de juramento que el material que aparece en esta tesis de grado es de mi producción intelectual, en razón de lo cual asumo toda la responsabilidad sobre el uso de producción intelectual.

**Firmado:** \_\_\_\_\_

**Cédula:** \_\_\_\_\_



## UNIVERSIDAD LATINA DE PANAMÁ

### Facultad de Ciencias de la Salud Dr. William C. Gorgas

El proyecto final de graduación de la carrera de biotecnología presentado por Wendy M. Zhuo L., con el tema “**Comparación de métodos enzimáticos y comerciales para el aislamiento y expansión de células madres mesenquimales humanas derivadas de cordón umbilical, con potencial terapéutico**”, fue aprobado por el siguiente comité asesor:

**Asesor**

**Firma**

**Dr. Jonathan Hernández *MSc, PhD***

\_\_\_\_\_

**Director**

**Firma**

**Dra. María Fernanda Alves-Rosa, PhD.**

\_\_\_\_\_

**Jurado**

Universidad Latina de Panamá

Panamá, República de Panamá

2026

## DEDICATORIA

Esta dedicatoria nace desde el corazón.

A mi abuela postiza, Kiralina Añino, mi mayor regalo de la vida. La mujer que me crio con amor infinito, que fue mi confidente, mi guía y mi lugar seguro. La más hermosa e inteligente, la que me enseñó que la vida se vive con sazón, carácter y amor en cada detalle. Este logro lleva tu nombre en silencio. Me hubiera encantado tenerte a mi lado en este proceso, abrazarte al final de cada meta, pero sé que de alguna forma siempre estuviste conmigo.

A mi hermano mayor, Alexander, que ha caminado conmigo en cada etapa de mi vida. Gracias por ser mi apoyo constante, mi confidente y mi fuerza cuando dudé de mí misma. Me siento profundamente orgullosa de la persona que eres hoy y de la que sé que llegarás a ser. Gracias por demostrarme, con tu ejemplo, que el esfuerzo siempre da frutos y que rendirse nunca es una opción.

A mi mamá, Yu Chang, y a mi papá, XinQiang, quienes me enseñaron que aunque el comienzo sea difícil y existan carencias, con disciplina, trabajo y perseverancia se puede construir un camino digno. Gracias por enseñarme que, aun cuando la vida se vuelve dura, siempre podemos levantarnos y comenzar de nuevo. Todo lo que soy es reflejo de su sacrificio y amor.

A mi mejor amigo, Edgardo Nieto, por demostrarme que la amistad verdadera se convierte en familia. Gracias por permitirme acompañarte en tu etapa, por todo lo que haces por mí incluso cuando parece pequeño y por el cariño tan genuino que siempre me das. No existen palabras suficientes para expresar cuánto te quiero y lo importante que eres en mi vida.

A mi mejor amiga, Michelle, por quererme en mis días más fuertes y también en los más frágiles, por no soltarme nunca y por estar siempre, incluso cuando yo no sabía cómo estar para mí misma.

A mi tío Pancho, por enseñarme a ser chispa, a disfrutar la vida y a entender que vivir bien también es reír, compartir y sentarse a una buena mesa. A mi tío Lucho, mi tía Francia y mi abuelo Nieto, por su cariño constante. A Carlito, por siempre confiar en mí y recordarme que, aunque la vida sea dura, siempre podemos encontrar una razón para sonreír. Y a mi hermosa y fuerte Camila, mi compañera desde la infancia, porque crecer juntas ha sido uno de los mayores regalos de mi vida.

Y a la Dra. María Fernanda Alves Rosa, por recibirme con generosidad desde el primer día, por confiar en mi potencial incluso cuando yo dudaba, y por enseñarme que la ciencia no es solo conocimiento, sino pasión, entrega y vocación. Gracias por inspirarme a amar lo que hago y por convertirse en una figura de profunda admiración en mi formación profesional y personal.

## AGRADECIMIENTO

Esta tesis está dedicada, con todo mi corazón, a las personas que hicieron posible este proceso tan exigente y transformador. A mis amigos, y en especial a mi grupo, quienes fueron mi apoyo constante, mi refugio y mi fuerza en los días más difíciles. Siempre confiaron en mí más de lo que yo misma lo hacía. Fueron mis confidentes, mi base cuando sentía que podía romperme y quienes convirtieron mis años universitarios en los más hermosos y significativos de mi vida.

Gracias por su lealtad, por su paciencia, por su inteligencia y por inspirarme cada día. Me siento profundamente orgullosa de cada uno de ustedes y deseo que la vida me permita seguir creciendo a su lado, aprendiendo no solo como científica, sino como persona.

Con especial cariño agradezco a: Leighanne Bonner, Milton Almanza, Jon Jairo Tamayo Yulianis Marrero, Daniela de León, Ana Cristina Hall, Letizia Pardo, Andrea Castillo y nuestro amado coordinador del grupo Juan De Dios Noriega.

Agradezco profundamente a Lizmar Carreño, quien fue un pilar fundamental durante este proceso. Sus noches de esfuerzo, su ánimo constante y su apoyo incondicional marcaron mi formación tanto en la ciencia como en la vida. Fue un soporte firme durante toda mi estadía en la empresa, y su confianza en mí significó más de lo que las palabras pueden expresar. Le deseo un futuro tan brillante como el compromiso y la dedicación que siempre demostró.

A la empresa que me brindó la oportunidad de formar parte como una de las pioneras del Departamento de Investigación y Desarrollo (I+D), gracias por confiar en mi potencial y permitirme crecer profesionalmente. En especial, al equipo de I+D: Jorge Castro y Jessica Sucre, quienes fueron de los primeros investigadores en enseñarme con paciencia y dedicación. Asimismo, Eymi Cedeño y Jean Carlos Delgado, quienes me formaron en técnica aséptica y en el correcto manejo de un laboratorio de manufactura.

A Katherine Silvera, por enseñarme sobre mejora de procesos clínicos y por siempre confiar en mis capacidades. Y finalmente, a Pedro Barriga, por su amabilidad, confianza y disposición constante para enseñarme todo lo posible en su área. Todos ustedes fueron parte fundamental de mi crecimiento y de mi historia dentro de la empresa. Al Dr. Juan Castillo, por acompañarme en mi formación y contribuir a mi crecimiento profesional. Gracias por ver mi potencial, por creer en mí incluso cuando yo misma dudaba.

A mi madre postiza, Alina Alvarado, gracias por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles. Su apoyo fue indispensable para llegar hasta aquí. A la Dra. Elisa, por acompañarme en este camino, por cada conversación, por cada buen debate que me hizo crecer y cuestionar. Gracias por ser una buena amiga, por enseñarme tanto de medicina y por darme la oportunidad de construir una amistad sincera.

Y a todas las personas que, de una u otra forma, me acompañaron y me extendieron la mano en este largo camino, gracias infinitas. No me alcanzaría una vida para agradecer todo lo que hicieron por mí.

## ÍNDICE

<b>DECLARACIÓN JURADA</b> .....	2
<b>DEDICATORIA</b> .....	4
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	5
<b>ABREVIATURAS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	15
1. INTRODUCCIÓN .....	16
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	17
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	18
1.4 OBJETIVOS.....	19
1.4.1 Objetivo general .....	19
1.4.2 Objetivos específicos.....	19
1.5 HIPÓTESIS .....	19
1.5.1 Hipótesis de trabajo.....	19
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b> .....	20
2. MARCO TEÓRICO .....	21
2.0.1 Introducción.....	21
2.0.2 Generalidades sobre las células madre mesenquimales humanas .....	23
2.0.3 Clasificación y fuentes de obtención de las células madre mesenquimales humanas.....	25
2.0.4 Aislamiento de células madre mesenquimales humanas del cordón umbilical ...	27
2.0.5 Características fenotípicas de las células madre mesenquimales humanas .....	29
2.0.6 Aplicaciones terapéuticas actuales de las células madre mesenquimales humanas .....	31
<b>CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO</b> .....	34
3. MARCO METODOLÓGICO .....	34
3.0.1 Tipo y diseño de la investigación .....	34
3.0.2 Lugar de ejecución de la investigación.....	35

3.0.3 Población y muestra.....	36
3.0.4 Variables de estudio.....	37
3.0.5 Variable independiente.....	38
3.0.6 Variable dependiente.....	38
3.0.7 Variables controladas.....	38
3.0.8 Materiales y equipos.....	39
3.0.9 Procedimiento experimental.....	40
3.0.10 Selección y elegibilidad de la donadora.....	40
3.0.11 Recolección y transporte del cordón umbilical.....	40
3.0.12 Recepción del cordón umbilical en el laboratorio.....	40
3.0.13 Métodos de aislamiento de células madre mesenquimales humanas.....	41
3.0.14 Cultivo y expansión celular.....	41
3.0.15 Observación y registro del comportamiento celular.....	42
3.0.16 Consideraciones de confidencialidad del procedimiento.....	42
3.0.17 Síntesis del procedimiento experimental.....	42
3.0.18 Recepción y preparación del cordón umbilical.....	42
3.0.19 Aislamiento de células madre mesenquimales humanas mediante digestión enzimática con colagenasa NB4.....	44
3.0.20 Preparación del área y materiales.....	44
3.0.21 Preparación del tejido y determinación inicial de longitud y peso del cordón umbilical.....	44
3.0.22 Fragmentación mecánica del cordón umbilical.....	45
3.0.23 Digestión enzimática del tejido.....	45
3.0.24 Inactivación enzimática y disociación mecánica asistida.....	46
3.0.25 Filtración y recuperación celular.....	46
3.0.26 Obtención de la suspensión celular para cultivo primario.....	46
3.0.27 Aislamiento de células madre mesenquimales mediante kit comercial.....	47
3.0.28 Preparación del tejido para disociación.....	47
3.0.29 Preparación de reactivos del kit comercial.....	48
3.0.30 Disociación enzimática y mecánica automatizada.....	48
3.0.31 Filtración y recuperación de la suspensión celular.....	49

3.0.32 Consideraciones generales del método.....	49
3.0.33 Cultivo y expansión celular de hMSC derivadas de cordón umbilical.....	49
3.0.34 Análisis de datos .....	51
3.0.35 Limitaciones del estudio.....	52
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
4. Eficiencia del aislamiento enzimático .....	55
4.1 Rendimiento de cosecha celular en hMSC bajo diferentes condiciones de suplementación.....	56
4.2 Viabilidad celular de hMSC bajo diferentes condiciones de suplementación .....	58
4.3 Tasa de duplicación poblacional de hMSC según medio de cultivo.....	59
4.4 Rendimiento celular (Yield) de hMSC según medio de cultivo .....	60
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN .....</b>	<b>63</b>
5. Eficiencia de aislamiento: colagenasa NB4 vs kit comercial Miltenyi .....	64
5.1 Rendimiento de cosecha celular en hMSC bajo diferentes condiciones de suplementación: SFB vs hPL.....	65
5.3 Viabilidad celular de hMSC bajo diferentes condiciones de suplementación .....	66
5.4 Tasa de duplicación poblacional de hMSC según medio de cultivo.....	66
5.5 Rendimiento celular (Yield) de hMSC según medio de cultivo .....	67
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>69</b>
6.1 Conclusiones.....	70
6.2 Recomendaciones.....	71
1. Ampliación del registro y sistematización de datos de aislamiento celular.....	71
2. Caracterización inmunofenotípica completa mediante citometría de flujo .....	71
3. Evaluación comparativa ampliada de concentraciones de hPL .....	71
4. Análisis longitudinal del rendimiento celular (Yield).....	71
5. Evaluación funcional ampliada .....	72
6. Análisis comparativo bajo criterios regulatorios y GMP.....	72
7. Expansión del tamaño muestral y variabilidad biológica.....	72
<b>ANEXO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Eficiencia enzimática según método de aislamiento en función del peso inicial del tejido.....	54
Figura 1. Relación de células viables obtenidas por gramo de tejido procesado mediante digestión enzimática con kit comercial y colagenasa NB4.....	55
Tabla 2. Características de cosecha celular de hMSC cultivadas en medios suplementados con suero fetal bovino (SFB 10%) y lisado plaquetario humano (hPL 10% y 7.5%) .....	55
Figura 2. Comparación del rendimiento celular de hMSC cultivadas en diferentes condiciones de suplementación . .....	56
Tabla 3. Viabilidad celular de hMSC según medio de cultivo .....	56
Figura 3. Comparación del porcentaje de viabilidad de hMSC cultivadas en diferentes medios de suplementación.....	57
Tabla 4. Tiempo de duplicación (doubling) de hMSC según medio de cultivo. ....	58
Figura 4. Comparación de la tasa de duplicación poblacional (doubling/día) de hMSC cultivadas en diferentes medios de suplementación. ....	59
Tabla 5. Rendimiento celular (Yield) de hMSC según medio de cultivo .....	59
Figura 5. Comparación del rendimiento celular (Yield) de hMSC según medio de cultivo.....	60
Figura 6. Morfología de hMSC cultivadas en medio suplementado con hPL 7.5 % .....	73
Figura 7. Morfología comparativa de hMSC cultivadas en hPL 10 % .....	73
Figura 8. Morfología comparativa de hMSC cultivadas en SFB 10 %. .....	74

**ABREVIATURAS**

**°C:** Grados Celsius

**BPL:** Buenas Prácticas de Laboratorio

**CD:** Cluster of Differentiation (Grupo de Diferenciación)

**CD11b:** Cluster of Differentiation 11b

**CD14:** Cluster of Differentiation 14

**CD19:** Cluster of Differentiation 19

**CD29:** Cluster of Differentiation 29

**CD31:** Cluster of Differentiation 31

**CD34:** Cluster of Differentiation 34

**CD44:** Cluster of Differentiation 44

**CD45:** Cluster of Differentiation 45

**CD73:** Cluster of Differentiation 73 (ecto-5'-nucleotidasa)

**CD79 $\alpha$ :** Cluster of Differentiation 79 alfa

**CD90:** Cluster of Differentiation 90 (Thy-1)

**CD105:** Cluster of Differentiation 105 (endoglina)

**CD166:** Cluster of Differentiation 166

**GMP:** Good Manufacturing Practices (Buenas Prácticas de Manufactura)

**HGF:** Hepatocyte Growth Factor (Factor de Crecimiento Hepatocitario)

**HLA-DR:** Human Leukocyte Antigen DR

**hMSC:** Human Mesenchymal Stem Cells (Células Madre Mesenquimales Humanas)

**hPL:** Human Platelet Lysate (Lisado de Plaquetas Humano)

**HTLV I–II:** Human T-Lymphotropic Virus tipos I y II

**IDO:** Indoleamina 2,3-dioxigenasa

**IGF-I:** Insulin-Like Growth Factor tipo I (Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I)

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgM:** Inmunoglobulina M

**IL-10:** Interleucina 10

**ISCT:** International Society for Cell & Gene Therapy (Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica)

**ISO 7:** Clasificación de sala limpia según norma ISO nivel 7

**MSC:** Mesenchymal Stem Cells (Células Madre Mesenquimales)

**NB4:** Colagenasa tipo NB4

**NB6:** Colagenasa tipo NB6

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

**PDGF:** Platelet-Derived Growth Factor (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas)

**PGE2:** Prostaglandina E2

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**TGF- $\beta$ 1:** Transforming Growth Factor beta 1 (Factor de Crecimiento Transformante beta 1)

**VDRL:** Venereal Disease Research Laboratory (prueba serológica para sífilis)

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular)

## RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo estandarizar y comparar métodos de aislamiento y condiciones de cultivo de células madre mesenquimales humanas (hMSC) derivadas de cordón umbilical, con el fin de optimizar su obtención y expansión in vitro para aplicaciones en biotecnología y medicina regenerativa. Las hMSC representan una población celular de alto valor terapéutico debido a su capacidad de autorrenovación, diferenciación multipotente e importante actividad inmunomoduladora y paracrina.

El estudio se desarrolló bajo un diseño experimental comparativo, evaluando dos métodos de aislamiento: digestión enzimática con colagenasa NB4 y un kit comercial estandarizado para disociación de tejido de cordón umbilical. Asimismo, se analizaron dos condiciones de suplementación del medio de cultivo: suero fetal bovino (SFB) y lisado de plaquetas humano (hPL), con el propósito de determinar su influencia en la adherencia, morfología, proliferación y viabilidad celular.

Los cordones umbilicales fueron obtenidos bajo criterios éticos establecidos, sometidos a tamizaje serológico y molecular para descartar enfermedades infectocontagiosas, y procesados en un laboratorio con condiciones controladas de bioseguridad. El procedimiento experimental incluyó recepción, preparación del tejido, fragmentación mecánica, digestión enzimática o disociación mediante kit comercial, filtración, centrifugación y establecimiento del cultivo primario.

Las células obtenidas mostraron capacidad de adherencia al plástico y morfología fibroblastoide característica de las hMSC. Se observó que ambos métodos permitieron la obtención de poblaciones celulares viables; sin embargo, el rendimiento inicial y la dinámica de expansión variaron según el método de aislamiento y el suplemento utilizado. El hPL evidenció un comportamiento favorable en la expansión celular, representando una alternativa potencialmente más segura frente al SFB en el contexto de futuras aplicaciones clínicas.

En conclusión, la estandarización de protocolos de aislamiento y cultivo es fundamental para garantizar reproducibilidad, calidad biológica y proyección traslacional de las hMSC derivadas de cordón umbilical, fortaleciendo las bases técnicas para su desarrollo en terapias celulares avanzadas.

**Palabras clave:** células madre mesenquimales humanas, cordón umbilical, gelatina de Wharton, aislamiento celular, digestión enzimática, colagenasa NB4, lisado de plaquetas humano, suero fetal bovino, cultivo celular, estandarización de protocolos, medicina regenerativa, expansión in vitro.

## ABSTRACT

This study aimed to standardize and compare isolation methods and culture conditions for human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from umbilical cord tissue, in order to optimize their procurement and in vitro expansion for applications in biotechnology and regenerative medicine. hMSCs represent a cell population of high therapeutic value due to their self-renewal capacity, multipotent differentiation potential, and significant immunomodulatory and paracrine activity.

The research was conducted under a comparative experimental design, evaluating two isolation methods: enzymatic digestion using NB4 collagenase and a standardized commercial kit for umbilical cord tissue dissociation. Additionally, two culture medium supplementation conditions were analyzed: fetal bovine serum (FBS) and human platelet lysate (hPL), with the aim of determining their influence on cell adherence, morphology, proliferation, and viability.

Umbilical cords were obtained following established ethical criteria, subjected to serological and molecular screening to exclude infectious diseases, and processed in a laboratory under controlled biosafety conditions. The experimental procedure included tissue reception, preparation, mechanical fragmentation, enzymatic digestion or commercial kit-based dissociation, filtration, centrifugation, and establishment of primary culture.

The isolated cells demonstrated plastic adherence and a fibroblast-like morphology characteristic of hMSCs. Both methods enabled the successful generation of viable cell populations; however, initial yield and expansion kinetics varied depending on the isolation method and culture supplement used. hPL showed favorable performance in promoting cellular expansion, representing a potentially safer alternative to FBS in the context of future clinical applications.

In conclusion, the standardization of isolation and culture protocols is essential to ensure reproducibility, biological quality, and translational potential of umbilical cord-derived hMSCs, thereby strengthening the technical foundation for their development in advanced cellular therapies.

### **Keywords:**

human mesenchymal stem cells, umbilical cord, Wharton's jelly, cell isolation, enzymatic digestion, NB4 collagenase, human platelet lysate, fetal bovine serum, cell culture, protocol standardization, regenerative medicine, in vitro expansion.

# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales humanas (hMSC, por sus siglas en inglés) han despertado un creciente interés en el campo de la biotecnología y la medicina regenerativa debido a su capacidad de autorrenovación, diferenciación multipotente y a sus relevantes propiedades inmunomoduladoras y paracrinas. Estas características las convierten en una herramienta prometedora para el desarrollo de terapias celulares orientadas a la regeneración de tejidos y al tratamiento de diversas patologías degenerativas e inflamatorias.

Las hMSC pueden aislarse a partir de múltiples fuentes tisulares, entre las que se incluyen la médula ósea, el tejido adiposo y diversos tejidos perinatales, tales como la placenta y el cordón umbilical.

Dentro de estas fuentes, el cordón umbilical ha adquirido especial relevancia por tratarse de un tejido de obtención no invasiva, generalmente descartado tras el parto, lo que reduce las consideraciones éticas asociadas a su uso, además de presentar una elevada capacidad proliferativa y un fenotipo celular favorable (Dominici et al., 2006; Ullah et al., 2015).

El cordón umbilical humano, y específicamente la gelatina de Wharton, ubicada en la parte interna del cordón umbilical humano, corresponde a un tejido conectivo mucoso que rodea y protege los vasos umbilicales (dos arterias y una vena), confiriéndole al cordón propiedades estructurales y biomecánicas esenciales. Este tejido se caracteriza por una matriz extracelular rica en proteoglicanos y ácido hialurónico, lo que genera un microambiente altamente hidratado y favorable para la presencia de células madre mesenquimales humanas (hMSC).

Debido a su localización anatómica y composición, la gelatina de Wharton representa una de las principales fuentes neonatales de hMSC utilizadas en investigación y aplicaciones biomédicas y constituye un microambiente rico en células madre mesenquimales con alto potencial terapéutico. Estas células se caracterizan por presentar una menor inmunogenicidad en comparación con las hMSC derivadas de fuentes adultas, así como una mayor estabilidad genética durante su expansión *in vitro*.

No obstante, el proceso de aislamiento de estas células representa una etapa crítica, ya que los métodos empleados influyen directamente en parámetros como el rendimiento celular, la viabilidad, la pureza poblacional y la conservación de sus propiedades biológicas.

La ausencia de protocolos estandarizados puede dar lugar a variabilidad significativa entre estudios, dificultando la comparación de resultados y la reproducibilidad experimental (Mushahary et al., 2018).

En este contexto, la estandarización de métodos de aislamiento y cultivo celular resulta esencial para asegurar la obtención de hMSC con características consistentes y reproducibles. Existen diversos enfoques metodológicos para el aislamiento de hMSC a partir del cordón umbilical, entre los que destacan los métodos enzimáticos tradicionales y el uso de kits comerciales diseñados para la disociación tisular.

Asimismo, las condiciones de cultivo, particularmente el tipo de suplemento utilizado, juegan un papel determinante en la expansión y funcionalidad de las células. Tradicionalmente, el suero fetal bovino ha sido el suplemento más empleado; sin embargo, su uso presenta limitaciones que han impulsado la búsqueda de alternativas más seguras y compatibles con aplicaciones clínicas.

Por lo tanto, esta investigación se enfoca en la estandarización y comparación de métodos de aislamiento y condiciones de cultivo de hMSC a partir de cordón umbilical, con el fin de contribuir al desarrollo de protocolos optimizados que puedan ser aplicados tanto en investigación como en futuros escenarios clínicos.

## **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A pesar del creciente interés y uso de las células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical en investigación biomédica y medicina regenerativa, actualmente no existe un consenso universal sobre el método óptimo para su aislamiento, lo que genera una considerable variabilidad en los resultados obtenidos entre distintos laboratorios y centros de investigación.

Esta variabilidad se manifiesta en diferencias en el rendimiento celular, la viabilidad, el tiempo de obtención de las células y las características fenotípicas finales, lo que limita la reproducibilidad de los estudios y dificulta la estandarización de protocolos (Salehinejad et al., 2020).

Entre los métodos de aislamiento más utilizados se encuentran los procedimientos enzimáticos tradicionales, que emplean colagenasas como la NB4 para la digestión de la matriz extracelular del cordón umbilical, así como los kits comerciales estandarizados, como el Umbilical Cord Dissociation Kit, human de Miltenyi Biotec, diseñados para optimizar la disociación tisular de manera reproducible.

Sin embargo, existen discrepancias en la literatura respecto a cuál de estos métodos proporciona mejores resultados en términos de eficiencia, viabilidad y conservación de las propiedades biológicas de las hMSC, lo que plantea la necesidad de estudios comparativos sistemáticos. Adicionalmente, las condiciones de cultivo celular representan otro factor crítico que influye en el comportamiento de las hMSC.

El suero fetal bovino ha sido ampliamente utilizado como suplemento de cultivo debido a su capacidad para favorecer la proliferación celular; no obstante, su uso presenta desventajas asociadas a la variabilidad entre lotes, el riesgo de contaminación por patógenos y la posible inducción de respuestas inmunológicas.

En contraste, el lisado de plaquetas humano ha emergido como una alternativa más segura y fisiológicamente relevante, aunque su efecto sobre las hMSC aisladas mediante distintos métodos aún no ha sido completamente esclarecido (Burnouf et al., 2016).

En consecuencia, se plantea la necesidad de estandarizar y comparar métodos de aislamiento y suplementos de cultivo para optimizar la obtención de hMSC a partir de cordón umbilical, garantizando su calidad y reproducibilidad.

### **1.3 JUSTIFICACIÓN**

La estandarización de protocolos para el aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales humanas a partir de cordón umbilical es fundamental para garantizar la calidad, reproducibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos en investigación biomédica.

Un método de aislamiento adecuado permite maximizar el rendimiento celular y preservar las características biológicas esenciales de las hMSC, tales como su fenotipo, viabilidad, capacidad de expansión y potencial de diferenciación (Mushahary et al., 2018).

Desde el punto de vista científico, la comparación entre métodos enzimáticos tradicionales y kits comerciales estandarizados aporta información valiosa sobre la eficiencia y aplicabilidad de cada enfoque, permitiendo seleccionar el procedimiento más adecuado según las condiciones del laboratorio y los objetivos del estudio.

Asimismo, la evaluación de diferentes suplementos de cultivo responde a la necesidad de optimizar las condiciones de expansión celular, un aspecto clave para el desarrollo de terapias celulares.

Desde una perspectiva ética y de bioseguridad, la sustitución del suero fetal bovino por alternativas como el lisado de plaquetas humano contribuye a reducir los riesgos asociados a la transmisión de patógenos y a la variabilidad biológica, además de alinearse con los principios de las buenas prácticas de manufactura (GMP), requisito indispensable para futuras aplicaciones clínicas (Burnouf et al., 2016).

Finalmente, este estudio tiene una justificación técnica y práctica, ya que permitirá establecer un protocolo optimizado y reproducible, adaptado a las condiciones del laboratorio donde se desarrolla la investigación.

De esta manera, se fortalece la capacidad institucional para el desarrollo de proyectos en el área de biotecnología y terapias celulares, contribuyendo al avance científico y tecnológico.

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 Objetivo general**

Estandarizar y comparar métodos de aislamiento y condiciones de cultivo de células madre mesenquimales humanas a partir de cordón umbilical, con el fin de optimizar su obtención y expansión in vitro.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Comparar la eficiencia del aislamiento de hMSC mediante digestión enzimática con colagenasa NB4 y el Umbilical Cord Dissociation Kit, human de Miltenyi Biotec.
- Evaluar el efecto de diferentes suplementos de cultivo, suero fetal bovino y lisado de plaquetas humano sobre la proliferación y expansión celular de las hMSC.
- Evaluar las características morfológicas y el comportamiento de adherencia de las células madre mesenquimales humanas obtenidas mediante ambos métodos de aislamiento.
- Determinar la viabilidad y el comportamiento general de las hMSC bajo las distintas condiciones de cultivo evaluadas.

## **1.5 HIPÓTESIS**

### **1.5.1 Hipótesis de trabajo**

Se plantea que el método de aislamiento influye significativamente en el rendimiento inicial y en la calidad biológica de las hMSC derivadas de cordón umbilical, existiendo diferencias entre la digestión enzimática con colagenasa y el uso de kits comerciales estandarizados. Adicionalmente, se hipotetiza que la suplementación con lisado plaquetario humano mejora la eficiencia de expansión celular manteniendo la viabilidad y las características morfológicas y fenotípicas, en comparación con el suero fetal bovino.

# **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.0.1 Introducción**

El avance sostenido de la biotecnología y de la medicina regenerativa ha consolidado a las células madre mesenquimales humanas (hMSC) como uno de los principales focos de investigación en el desarrollo de terapias celulares y estrategias de reparación tisular.

Estas células se caracterizan por su capacidad de autorrenovación, diferenciación multipotente y, especialmente, por su rol inmunomodulador y paracrino, lo que las convierte en una herramienta biológica de alto valor tanto en investigación básica como en aplicaciones clínicas.

En este contexto, la comprensión profunda de sus características biológicas, fuentes de obtención, métodos de aislamiento y criterios de identificación resulta esencial para garantizar resultados reproducibles y comparables entre distintos estudios.

A lo largo de las últimas décadas, las hMSC han sido aisladas a partir de diversas fuentes tisulares, incluyendo médula ósea, tejido adiposo y tejidos perinatales.

No obstante, la literatura científica ha evidenciado que las propiedades biológicas de estas células pueden variar significativamente en función de su origen, así como de los métodos empleados para su aislamiento y cultivo.

Esta variabilidad representa uno de los principales desafíos en el campo de la terapia celular, ya que puede influir directamente en la viabilidad celular, el fenotipo, la capacidad de diferenciación y la respuesta inmunológica asociada a las hMSC (Dominici et al., 2006).

Dentro de las fuentes alternativas, el cordón umbilical humano ha emergido como una opción particularmente atractiva para la obtención de hMSC.

Este tejido, considerado generalmente como material biológico de descarte tras el parto, ofrece múltiples ventajas frente a las fuentes adultas, entre ellas una obtención no invasiva, menor carga ética, mayor capacidad proliferativa y menor inmunogenicidad.

En particular, la gelatina de Wharton, una matriz rica en componentes extracelulares, constituye un nicho favorable para la presencia de células madre mesenquimales con características funcionales robustas y estabilidad genética durante su expansión in vitro (Ullah et al., 2015).

Sin embargo, a pesar del creciente interés por las hMSC derivadas de cordón umbilical, persiste una falta de consenso respecto a los protocolos óptimos para su aislamiento y cultivo.

La diversidad de métodos reportados en la literatura, que incluyen técnicas por explante, digestión enzimática y el uso de kits comerciales estandarizados, ha generado resultados heterogéneos entre distintos laboratorios.

Esta heterogeneidad metodológica dificulta la comparación de estudios, limita la reproducibilidad experimental y plantea interrogantes sobre la calidad y funcionalidad de las células obtenidas (Mushahary et al., 2018).

La estandarización de los métodos de aislamiento constituye, por tanto, un aspecto crítico en el estudio de las hMSC.

Los procedimientos enzimáticos, que emplean colagenasas para la disociación de la matriz extracelular, han demostrado ser eficientes en términos de rendimiento celular y rapidez del proceso. No obstante, una digestión inadecuada puede afectar la viabilidad celular y alterar la expresión de marcadores de superficie.

En paralelo, el desarrollo de kits comerciales diseñados bajo condiciones controladas busca minimizar la variabilidad técnica y facilitar la reproducibilidad, aunque su desempeño comparativo frente a métodos tradicionales aún requiere evaluación sistemática. De manera complementaria, las condiciones de cultivo celular representan otro factor determinante en el comportamiento de las hMSC.

Históricamente, el suero fetal bovino ha sido el suplemento más utilizado para la expansión celular *in vitro*; sin embargo, su empleo presenta limitaciones asociadas a la variabilidad entre lotes, riesgos de contaminación y posibles respuestas inmunológicas adversas.

En respuesta a estas limitaciones, el lisado de plaquetas humano ha sido propuesto como una alternativa más segura y fisiológicamente compatible, especialmente en el contexto de aplicaciones clínicas y procesos bajo condiciones de buenas prácticas de manufactura (Burnouf et al., 2016).

En este escenario, resulta imprescindible abordar de manera integral los fundamentos teóricos relacionados con las hMSC derivadas de cordón umbilical, considerando no solo su biología celular, sino también los aspectos técnicos que influyen en su obtención y caracterización.

El marco teórico tiene como finalidad analizar los conceptos clave asociados a las células madre mesenquimales humanas, su clasificación según el origen tisular, los métodos de aislamiento empleados a partir del cordón umbilical, los criterios fenotípicos que las definen y sus principales aplicaciones terapéuticas en la medicina actual.

Este análisis proporciona el sustento conceptual necesario para comprender la relevancia de la estandarización de protocolos de aislamiento y cultivo celular, eje central del presente estudio.

Al establecer una base teórica sólida, se busca respaldar la comparación entre distintos métodos de aislamiento y condiciones de cultivo, contribuyendo al desarrollo de

procedimientos reproducibles, eficientes y alineados con las exigencias científicas y regulatorias actuales.

### **2.0.2 Generalidades sobre las células madre mesenquimales humanas**

Las hMSC son células estromales multipotentes que forman parte del compartimento celular de diversos tejidos conectivos del organismo.

Estas células han sido ampliamente estudiadas debido a su capacidad de autorrenovación, su potencial de diferenciación hacia linajes mesodérmicos y su papel regulador en procesos de reparación tisular e inmunomodulación.

Desde su primera caracterización, las hMSC han sido consideradas una población celular clave en el desarrollo de terapias celulares y estrategias de medicina regenerativa. Desde el punto de vista biológico, las hMSC se definen como células capaces de proliferar de manera estable *in vitro*, adherirse al plástico bajo condiciones estándar de cultivo y diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos cuando son expuestas a estímulos específicos.

Estas características funcionales constituyen uno de los pilares fundamentales para su identificación y estudio, y han sido adoptadas como criterios mínimos por la International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) (Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica) (Dominici et al., 2006).

Además de su potencial de diferenciación, las hMSC desempeñan un rol central como reguladoras del microambiente tisular. Su función no se limita únicamente a la sustitución celular directa, sino que se basa principalmente en su actividad paracrina. Estas células secretan una amplia gama de factores de crecimiento, citocinas y moléculas bioactivas que influyen sobre células vecinas, promoviendo la angiogénesis, la migración celular, la inhibición de la apoptosis y la modulación de la respuesta inflamatoria.

Entre los factores más relevantes secretados por las hMSC se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), los cuales contribuyen de manera significativa a los procesos de regeneración tisular (Ullah et al., 2015).

Un aspecto particularmente relevante de las hMSC es su capacidad inmunomoduladora. Estas células interactúan con distintos componentes del sistema inmune, incluyendo linfocitos T y B, células dendríticas y macrófagos, modulando su activación y función.

Este efecto se ejerce tanto por mecanismos dependientes de contacto celular como por la liberación de mediadores solubles, tales como la interleucina 10 (IL-10), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ 1), la prostaglandina E2 (PGE2) y la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Gracias a estas propiedades, las hMSC son capaces de

atenuar respuestas inflamatorias excesivas y favorecer un entorno inmunológico más tolerogénico, lo que resulta de gran interés terapéutico (células madre/estromales mesenquimales. Su potencial terapéutico en medicina, 2020).

Desde una perspectiva experimental, las propiedades biológicas de las hMSC pueden verse influenciadas por múltiples factores, entre ellos la fuente de obtención, las condiciones de aislamiento, el medio de cultivo y el número de pases celulares.

La literatura ha demostrado que variaciones en estos parámetros pueden afectar la tasa de proliferación, la expresión de marcadores de superficie y la capacidad funcional de las células. Por esta razón, la estandarización de los protocolos de aislamiento y cultivo resulta esencial para garantizar la reproducibilidad de los resultados y la comparabilidad entre distintos estudios (Mushahary et al., 2018).

Las hMSC derivadas de tejidos perinatales, como el cordón umbilical, han mostrado características particularmente favorables en comparación con aquellas obtenidas de fuentes adultas. Estas incluyen una mayor capacidad proliferativa, menor senescencia celular temprana y un perfil inmunológico más estable. Dichas propiedades se atribuyen, en parte, a la menor exposición de estas células a factores ambientales adversos y al estado biológico más “joven” del tejido de origen (Ullah et al., 2015).

En el contexto de la investigación biotecnológica, el estudio de las generalidades de las hMSC no solo permite comprender su comportamiento celular, sino que también proporciona las bases para evaluar críticamente los métodos empleados en su obtención y expansión.

Una comprensión detallada de sus propiedades intrínsecas resulta indispensable para interpretar adecuadamente los resultados experimentales y para establecer protocolos que aseguren la calidad y funcionalidad de las células obtenidas.

En síntesis, las células madre mesenquimales humanas representan una población celular de alto valor biológico y terapéutico, cuyas características funcionales, inmunomoduladoras y regenerativas justifican el creciente interés en su estudio.

El análisis de sus generalidades constituye un paso fundamental para abordar de manera crítica los aspectos técnicos relacionados con su aislamiento, caracterización y aplicación, sirviendo como base conceptual para las secciones posteriores al marco teórico.

### **2.0.3 Clasificación y fuentes de obtención de las células madre mesenquimales humanas**

Las células madre mesenquimales humanas pueden clasificarse principalmente en función de su origen tisular, criterio que ha demostrado tener una influencia directa sobre sus propiedades biológicas, capacidad proliferativa, perfil inmunológico y potencial terapéutico.

Aunque estas células comparten criterios fenotípicos y funcionales comunes, la evidencia científica indica que su comportamiento puede variar significativamente dependiendo del tejido del cual se aíslan, así como de las condiciones de obtención y cultivo empleadas.

De manera general, las hMSC se agrupan en dos grandes categorías: hMSC adultas y hMSC perinatales. Las hMSC adultas son aquellas obtenidas de tejidos desarrollados, siendo la médula ósea y el tejido adiposo las fuentes más ampliamente estudiadas.

Por otro lado, las hMSC perinatales se derivan de tejidos asociados al nacimiento, tales como la placenta, las membranas amnióticas, la sangre del cordón umbilical y la gelatina de Wharton (Células madre/estromales mesenquimales. Su potencial terapéutico en medicina, 2020).

Históricamente, la médula ósea ha sido considerada la fuente clásica de hMSC. Las células derivadas de este tejido presentan un fenotipo bien caracterizado y han sido utilizadas en numerosos estudios preclínicos y clínicos. No obstante, el procedimiento de obtención es invasivo, puede generar molestias al donante y suele asociarse a un menor rendimiento celular.

Además, se ha descrito que las hMSC de médula ósea presentan una disminución progresiva de su capacidad proliferativa y un aumento de la senescencia celular conforme aumenta la edad del donante, lo que limita su uso en determinadas aplicaciones (Ullah et al., 2015).

El tejido adiposo ha emergido como una alternativa a la médula ósea debido a su mayor disponibilidad y al elevado número de células madre que pueden obtenerse por unidad de volumen. Sin embargo, las hMSC derivadas de tejido adiposo pueden mostrar variaciones importantes en su perfil funcional, influenciadas por factores metabólicos del donante y por la técnica de liposucción empleada. Estas variaciones representan un desafío para la estandarización de protocolos y la reproducibilidad experimental.

En contraste, las hMSC perinatales han cobrado un interés creciente en los últimos años debido a las ventajas biológicas y técnicas que presentan frente a las fuentes adultas. Estas células se obtienen a partir de tejidos generalmente considerados como material biológico de descarte, lo que reduce las implicaciones éticas y facilita su disponibilidad.

Además, las hMSC perinatales suelen presentar una mayor capacidad proliferativa, menor senescencia celular temprana y un perfil inmunológico más estable, características altamente deseables para aplicaciones terapéuticas (Ullah et al., 2015).

Dentro de las fuentes perinatales, el cordón umbilical humano destaca como una de las más prometedoras. Este tejido está compuesto por dos arterias, una vena y una matriz rica en mucopolisacáridos conocida como gelatina de Wharton, la cual constituye un nicho biológico favorable para la presencia de células madre mesenquimales.

Las hMSC derivadas de la gelatina de Wharton han demostrado una elevada capacidad de expansión in vitro, así como una expresión estable de marcadores mesenquimales y una baja inmunogenicidad, lo que las posiciona como una fuente ideal para el desarrollo de terapias celulares (A GMP-compliant manufacturing method for Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells, 2024).

Desde el punto de vista funcional, las hMSC del cordón umbilical presentan una potente actividad inmunomoduladora, atribuida a la secreción de factores tróficos y citocinas antiinflamatorias que regulan la respuesta inmune y favorecen la regeneración tisular. Estas propiedades las hacen especialmente atractivas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y degenerativas. Asimismo, su menor exposición a agentes ambientales y patológicos, en comparación con las fuentes adultas, contribuye a una mayor estabilidad genética durante su expansión in vitro.

Otro aspecto relevante en la clasificación de las hMSC es la influencia del origen tisular sobre la respuesta celular a las condiciones de cultivo. Diversos estudios han demostrado que las hMSC perinatales, incluyendo aquellas derivadas del cordón umbilical, responden de manera más favorable a diferentes suplementos de cultivo y presentan una mayor tolerancia a los procesos de expansión prolongada.

Esta característica resulta particularmente importante en el contexto de la estandarización de protocolos, ya que permite una mayor flexibilidad experimental sin comprometer la calidad celular.

En el ámbito de la biotecnología aplicada, la selección de la fuente celular no debe basarse únicamente en la facilidad de obtención, sino también en la reproducibilidad de los resultados y en la posibilidad de cumplir con estándares regulatorios.

En este sentido, las hMSC del cordón umbilical ofrecen ventajas significativas para el desarrollo de procesos bajo condiciones de buenas prácticas de manufactura (GMP), requisito indispensable para la traslación clínica de terapias celulares (A GMP-compliant manufacturing method for Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells, 2024).

En síntesis, la clasificación de las células madre mesenquimales humanas según su origen tisular permite comprender las diferencias funcionales y biológicas entre las distintas poblaciones celulares.

Las hMSC derivadas del cordón umbilical, particularmente de la gelatina de Wharton, representan una fuente altamente ventajosa debido a su disponibilidad, propiedades proliferativas, perfil inmunológico y potencial terapéutico.

Estas características justifican su elección como objeto de estudio en investigaciones orientadas a la estandarización de métodos de aislamiento y cultivo celular, estableciendo una base sólida para los análisis experimentales desarrollados en este trabajo.

#### **2.0.4 Aislamiento de células madre mesenquimales humanas del cordón umbilical**

El aislamiento de células madre mesenquimales humanas a partir del cordón umbilical constituye una etapa crítica dentro del desarrollo de protocolos experimentales orientados a la obtención de poblaciones celulares viables, funcionales y reproducibles. La elección del método de aislamiento influye de manera directa sobre el rendimiento celular inicial, la viabilidad, la estabilidad fenotípica y el comportamiento proliferativo de las hMSC durante su expansión *in vitro*. Por ello, el análisis y la optimización de los procedimientos de aislamiento resultan fundamentales para garantizar la calidad biológica de las células obtenidas.

El cordón umbilical humano está conformado estructuralmente por dos arterias y una vena, inmersas en una matriz gelatinosa rica en mucopolisacáridos conocida como gelatina de Wharton. Este tejido representa el principal reservorio de hMSC dentro del cordón y constituye el objetivo central del procesamiento celular. De manera general, el aislamiento comienza con la apertura longitudinal del cordón umbilical bajo condiciones estériles, seguida de la remoción cuidadosa de los vasos sanguíneos, con el fin de evitar la contaminación con células endoteliales o hematopoyéticas. Posteriormente, la gelatina de Wharton es separada y fragmentada en porciones de tamaño reducido, usualmente entre 1 y 4 mm, para facilitar la liberación celular (A GMP-compliant manufacturing method for Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells, 2024).

Una vez obtenido el tejido, se han descrito principalmente dos estrategias para el aislamiento de hMSC: el método por explante y la digestión enzimática. El método por explante se basa en la siembra directa de los fragmentos de gelatina de Wharton sobre superficies de cultivo tratadas para favorecer la adhesión celular. Bajo condiciones adecuadas de cultivo, las hMSC migran progresivamente desde el tejido hacia el plástico, donde se adhieren y comienzan a proliferar. Este enfoque se caracteriza por ser técnicamente sencillo y menos agresivo, ya que evita la exposición directa de las células a enzimas proteolíticas. No obstante, uno de sus principales inconvenientes es el tiempo prolongado requerido para la aparición de colonias celulares, lo que puede retrasar etapas posteriores del proceso experimental.

En contraste, la digestión enzimática tiene como objetivo disociar la matriz extracelular de la gelatina de Wharton mediante el uso de enzimas proteolíticas, permitiendo una liberación

más rápida de las hMSC. Entre las enzimas más comúnmente empleadas se encuentran las colagenasas, particularmente las formulaciones NB4 y NB6, las cuales actúan sobre los componentes colagénicos del tejido. En algunos protocolos, estas enzimas se combinan con otras como hialuronidasa, dispasa o proteasas neutras, con el propósito de mejorar la eficiencia de disociación. El tratamiento enzimático suele realizarse a 37 °C durante varias horas, seguido de procesos de filtración y centrifugación para la recuperación de la fracción celular (A GMP-compliant manufacturing method for Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells, 2024).

Desde el punto de vista técnico, la digestión enzimática ofrece la ventaja de un mayor rendimiento celular inicial y una reducción significativa del tiempo necesario para obtener poblaciones celulares utilizables. Sin embargo, este método requiere una estandarización rigurosa de parámetros como la concentración enzimática, el tiempo de incubación y las condiciones de agitación, ya que una digestión excesiva puede comprometer la viabilidad celular y afectar la integridad de los marcadores de superficie. Por esta razón, la digestión enzimática demanda un control experimental más estricto que el método por explante.

Diversos estudios comparativos han evaluado las diferencias entre ambos métodos de aislamiento, indicando que, una vez superada la fase inicial de obtención, las hMSC aisladas por explante y por digestión enzimática presentan características similares en términos de morfología fibroblastoide, capacidad proliferativa y potencial de diferenciación hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico. Asimismo, no se han observado diferencias significativas en la expresión de los marcadores fenotípicos establecidos por la International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) (Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica), lo que sugiere que ambos métodos permiten la obtención de poblaciones celulares funcionalmente comparables cuando se aplican de manera adecuada.

En el contexto de la traslación clínica y la biotecnología aplicada, la estandarización del aislamiento de hMSC adquiere una relevancia adicional. La producción de células bajo condiciones de buenas prácticas de manufactura (GMP) requiere procedimientos reproducibles, escalables y seguros. En este sentido, se han desarrollado kits comerciales de disociación de cordón umbilical que combinan métodos mecánicos y enzimáticos con formulaciones preestablecidas, como el Umbilical Cord Dissociation Kit, los cuales buscan minimizar la variabilidad interoperatoria y facilitar la generación de suspensiones celulares estandarizadas (A GMP-compliant manufacturing method for Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells, 2024).

En síntesis, el aislamiento de hMSC del cordón umbilical representa una etapa determinante para el éxito de los protocolos de cultivo y caracterización celular. La elección entre el método por explante y la digestión enzimática debe basarse en los objetivos específicos del estudio, considerando factores como el tiempo disponible, el rendimiento celular requerido y la necesidad de cumplir con estándares regulatorios. La correcta estandarización de esta

fase constituye el punto de partida para garantizar la calidad y reproducibilidad de las hMSC empleadas en aplicaciones experimentales y terapéuticas, fundamento central del presente trabajo.

### **2.0.5 Características fenotípicas de las células madre mesenquimales humanas**

La correcta identificación y caracterización de las células madre mesenquimales humanas constituye un aspecto esencial en cualquier investigación orientada a su aislamiento, expansión y aplicación terapéutica. Debido a la heterogeneidad celular presente en los tejidos de origen y a la ausencia de un marcador único y exclusivo para las hMSC, su definición se basa en un conjunto de criterios fenotípicos y funcionales estandarizados. Estos criterios permiten distinguirlas de otras poblaciones celulares y garantizar la reproducibilidad de los resultados experimentales.

En el año 2006, International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) (Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica) estableció los lineamientos mínimos para la identificación de las hMSC, los cuales continúan siendo el referente principal en investigación básica, aplicada y clínica. Según estos criterios, las hMSC deben cumplir tres condiciones fundamentales: adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo, un perfil fenotípico específico de marcadores de superficie y la capacidad de diferenciarse in vitro hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico (Dominici et al., 2006).

Desde el punto de vista fenotípico, las hMSC se caracterizan por la expresión positiva de un conjunto de marcadores de superficie asociados a su identidad mesenquimal. Entre los marcadores más representativos se encuentran CD73 (ecto-5'-nucleotidasa), CD90 (Thy-1) y CD105 (endoglina), los cuales deben expresarse en al menos el 95 % de la población celular analizada. Adicionalmente, es frecuente la expresión de otros marcadores como CD29, CD44 y CD166, que si bien no forman parte del criterio mínimo obligatorio, contribuyen a reforzar la caracterización de estas células (Dominici et al., 2006).

La ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos y endoteliales constituye otro rasgo definitorio de las hMSC. Estas células deben ser negativas o presentar una expresión inferior al 2 %, para marcadores como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19, CD31 y HLA-DR. Esta característica permite diferenciar a las hMSC de células hematopoyéticas, monocíticas, linfocíticas y endoteliales, las cuales pueden encontrarse como contaminantes durante los procesos de aislamiento a partir de tejidos complejos como el cordón umbilical (Dominici et al., 2006).

La evaluación del perfil fenotípico se realiza comúnmente mediante citometría de flujo, técnica que permite el análisis simultáneo de múltiples marcadores en poblaciones celulares en suspensión. Esta metodología resulta especialmente útil para el control de calidad de las hMSC, ya que posibilita cuantificar de manera precisa la proporción de células que cumplen

con los criterios fenotípicos establecidos, así como detectar posibles variaciones asociadas al método de aislamiento, al medio de cultivo o al número de pases celulares.

Además de los marcadores de superficie, las hMSC presentan una morfología característica cuando se cultivan in vitro. Generalmente adoptan una forma fibroblastoide, alargada y fusiforme, con disposición en remolinos o patrones paralelos a medida que aumenta la confluencia del cultivo. Si bien la morfología no constituye un criterio diagnóstico por sí sola, su evaluación aporta información complementaria sobre el estado de salud y homogeneidad de la población celular.

Un aspecto clave de la caracterización de las hMSC es su capacidad funcional de diferenciación. Bajo condiciones de cultivo específicas, estas células deben demostrar su potencial para diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos. La diferenciación osteogénica se evidencia mediante la deposición de matriz mineralizada, la adipogénica por la acumulación de gotas lipídicas intracelulares y la condrogénica por la producción de matriz rica en proteoglicanos. Este criterio funcional confirma el carácter multipotente de las hMSC y las distingue de células estromales diferenciadas.

Es importante destacar que el perfil fenotípico de las hMSC puede verse influenciado por diversos factores experimentales. El tejido de origen, el método de aislamiento, el tipo de medio de cultivo, el suplemento utilizado y el número de pases celulares pueden afectar la expresión de marcadores de superficie y el comportamiento biológico de las células. En particular, se ha observado que cultivos prolongados pueden inducir cambios fenotípicos asociados a senescencia celular, disminución de la capacidad proliferativa y alteraciones en el potencial de diferenciación (Ullah et al., 2015).

En el caso de las hMSC derivadas del cordón umbilical, diversos estudios han demostrado que estas células mantienen de manera estable la expresión de los marcadores mesenquimales clásicos durante los primeros pases celulares y presentan una menor tendencia a la senescencia en comparación con hMSC adultas, como las derivadas de médula ósea. Esta estabilidad fenotípica constituye una ventaja relevante para su uso en protocolos de investigación y aplicaciones terapéuticas (Células madre/estromales mesenquimales. Su potencial terapéutico en medicina, 2020).

En el contexto de esta investigación, la caracterización fenotípica adquiere una relevancia particular, ya que permite evaluar de manera objetiva el impacto de los diferentes métodos de aislamiento y condiciones de cultivo sobre la identidad mesenquimal de las células obtenidas. La confirmación de la expresión adecuada de los marcadores de superficie, junto con la ausencia de marcadores no deseados, es indispensable para validar la eficacia del protocolo estandarizado propuesto.

En conjunto, las características fenotípicas de las hMSC constituyen un pilar fundamental para su identificación, control de calidad y aplicación en biotecnología y medicina regenerativa. La correcta evaluación de estos parámetros garantiza que las células utilizadas cumplan con los criterios internacionales aceptados y respalda la confiabilidad de los resultados obtenidos en estudios experimentales y preclínicos.

### **2.0.6 Aplicaciones terapéuticas actuales de las células madre mesenquimales humanas**

Las células madre mesenquimales humanas han adquirido un papel protagónico en el desarrollo de terapias celulares y estrategias de medicina regenerativa debido a su perfil biológico multifuncional. A diferencia de otras poblaciones de células madre, las hMSC no ejercen su efecto terapéutico únicamente mediante la diferenciación celular, sino principalmente a través de mecanismos paracrinos e inmunomoduladores que influyen de manera directa en el microambiente tisular. Esta característica ha ampliado significativamente el espectro de patologías en las que las hMSC pueden ser utilizadas de forma experimental y clínica.

Uno de los principales atributos que sustentan el uso terapéutico de las hMSC es su baja inmunogenicidad. Estas células presentan una expresión reducida de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR) y carecen de moléculas coestimuladoras, lo que disminuye la activación de respuestas inmunes adversas tras su administración. Esta propiedad resulta especialmente relevante en el caso de las hMSC derivadas del cordón umbilical, las cuales exhiben un perfil inmunológico aún más favorable en comparación con las hMSC adultas, permitiendo su uso en terapias alogénicas con menor riesgo de rechazo (Ullah et al., 2015).

En el ámbito de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias, las hMSC han demostrado una notable capacidad para modular la respuesta inmune. A través de la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ 1, así como de mediadores inmunosupresores como la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la prostaglandina E2 (PGE2), estas células pueden inhibir la proliferación de linfocitos T, regular la actividad de células dendríticas y promover la generación de células T reguladoras. Estas propiedades han sido exploradas en patologías como la enfermedad injerto contra huésped, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal, donde se han observado efectos clínicos prometedores en la reducción de la inflamación y el daño tisular (Células madre/estromales mesenquimales. Su potencial terapéutico en medicina, 2020).

En el campo de la neurología, las hMSC han sido evaluadas como una estrategia terapéutica innovadora para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central y periférico. Aunque

su capacidad de diferenciarse directamente en neuronas funcionales es limitada, su principal mecanismo de acción se relaciona con la secreción de factores neurotróficos y angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I). Estos factores contribuyen a la protección neuronal, la reducción del daño secundario y la estimulación de procesos de reparación tisular. En este contexto, se han desarrollado ensayos clínicos para el tratamiento de accidente cerebrovascular isquémico, lesiones de médula espinal y enfermedades neurodegenerativas, con resultados que respaldan la seguridad y viabilidad de las hMSC como herramienta terapéutica (A GMP-compliant manufacturing method for Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells, 2024).

Las patologías cardiovasculares representan otro campo de aplicación relevante para las hMSC. En modelos de infarto de miocardio e isquemia vascular, estas células han demostrado favorecer la neovascularización y mejorar la perfusión tisular mediante la liberación de factores angiogénicos y antiinflamatorios. Si bien la integración directa de las hMSC en el tejido cardíaco es limitada, su efecto paracrino contribuye a la preservación de la función miocárdica y a la reducción del remodelado patológico posterior al daño isquémico (Células madre/estromales mesenquimales. Su potencial terapéutico en medicina, 2020).

En el área musculoesquelética, las hMSC han sido ampliamente estudiadas debido a su capacidad de diferenciarse hacia linajes osteogénicos y condrogénicos. Estas propiedades las convierten en candidatas ideales para la regeneración ósea, la reparación de cartílago y el tratamiento de enfermedades degenerativas como la osteoartritis. Diversos estudios han reportado mejoras en la funcionalidad articular y en la regeneración de tejido cartilaginoso tras la administración de hMSC, particularmente cuando estas se combinan con biomateriales o matrices tridimensionales que favorecen su integración y actividad biológica.

Adicionalmente, las hMSC derivadas del cordón umbilical han sido evaluadas en el tratamiento de enfermedades hepáticas, renales, pulmonares, oftalmológicas y dermatológicas. En estos contextos, su acción se asocia principalmente a la modulación del entorno inflamatorio y a la estimulación de procesos endógenos de reparación. En enfermedades pulmonares, por ejemplo, se ha observado una reducción de la fibrosis y de la respuesta inflamatoria, mientras que en patologías cutáneas se ha reportado una aceleración de la cicatrización y mejora de la calidad del tejido regenerado.

El avance de las aplicaciones terapéuticas de las hMSC se refleja en el creciente número de ensayos clínicos registrados a nivel mundial. Actualmente existen miles de estudios clínicos que evalúan la seguridad y eficacia de las hMSC en distintas indicaciones médicas, varios de los cuales se encuentran en fases avanzadas. Asimismo, algunos productos celulares basados en MSC han recibido aprobación regulatoria para indicaciones específicas, como Prochymal®, Temcell® y Alofisel®, lo que evidencia la transición progresiva de estas células desde la investigación experimental hacia la práctica clínica.

No obstante, a pesar de los avances alcanzados, uno de los principales desafíos para la implementación clínica generalizada de las hMSC es la variabilidad asociada a los métodos de aislamiento, expansión y caracterización celular. Las diferencias en los protocolos pueden influir directamente en la calidad, seguridad y eficacia terapéutica del producto celular final. En este sentido, la estandarización de los procesos de obtención y cultivo de hMSC, especialmente aquellas derivadas del cordón umbilical, resulta indispensable para garantizar resultados consistentes y comparables entre distintos laboratorios y aplicaciones clínicas.

En conclusión, las hMSC del cordón umbilical representan una herramienta terapéutica de alto valor en la medicina regenerativa contemporánea. Su perfil inmunomodulador, su capacidad proliferativa y su potencial paracrino las posicionan como una de las fuentes celulares más prometedoras para el desarrollo de terapias avanzadas. Sin embargo, el aprovechamiento pleno de su potencial terapéutico depende directamente de la implementación de protocolos estandarizados y reproducibles, lo que refuerza la relevancia científica y aplicada del estudio.

# CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.0.1 Tipo y diseño de la investigación

Esta investigación se enmarca dentro de un enfoque cualitativo, con un alcance experimental y comparativo, orientado a la estandarización de métodos para el aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales humanas (hMSC) a partir de cordón umbilical. El estudio se desarrolló bajo condiciones controladas de laboratorio, permitiendo la observación sistemática de variables asociadas al rendimiento celular, comportamiento en cultivo y respuesta a diferentes métodos de procesamiento tisular.

Desde el punto de vista metodológico, el diseño corresponde a una investigación experimental de tipo comparativa, ya que se evaluaron dos métodos distintos de aislamiento celular: un método basado en digestión enzimática convencional y un método estandarizado mediante el uso de un kit comercial. Ambos procedimientos fueron aplicados bajo condiciones similares, con el objetivo de analizar diferencias en la obtención y expansión celular, sin intervención directa sobre el material biológico más allá de los procedimientos establecidos.

El estudio posee además un carácter descriptivo–analítico, debido a que se describen las características generales del proceso de aislamiento y cultivo de las hMSC, así como el comportamiento morfológico y adherente de las células obtenidas. La comparación de los métodos permitió analizar su desempeño relativo, sin pretender establecer relaciones causales clínicas, sino generar evidencia técnica que contribuya a la optimización de protocolos de laboratorio.

La investigación se desarrolló *in vitro*, utilizando muestras de cordón umbilical humano obtenidas bajo criterios éticos y normativos establecidos. No se realizaron intervenciones en seres humanos ni se aplicaron procedimientos terapéuticos, por lo que el estudio se clasifica como de riesgo mínimo, enfocado exclusivamente en el manejo y análisis de material biológico destinado a investigación. Este diseño metodológico permitió generar información reproducible y pertinente para la estandarización de procedimientos, aportando bases técnicas para futuros estudios en el área de biotecnología y terapias celulares.

### **3.0.2 Lugar de ejecución de la investigación**

La investigación se desarrolló en un laboratorio de biotecnología y procesamiento celular que dispone de cuartos limpios con presión positiva clasificados bajo norma ISO 7, equipados con instalaciones de bioseguridad de nivel II para la manipulación de material biológico humano. El laboratorio cuenta con áreas diferenciadas para el procesamiento de tejidos y el cultivo celular, bajo condiciones ambientales estrictamente controladas de temperatura, humedad y calidad del aire, lo que permitió la correcta ejecución de los procedimientos de aislamiento y expansión de células madre mesenquimales humanas (hMSC).

Las actividades experimentales se llevaron a cabo bajo estándares avanzados de bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio (BPL), garantizando la protección del personal, la trazabilidad de los procedimientos, la integridad de las muestras y la confiabilidad científica

de los resultados obtenidos. El laboratorio se encuentra equipado con infraestructura apropiada para la manipulación aséptica de tejidos humanos, así como para el mantenimiento de cultivos celulares bajo condiciones controladas de temperatura y atmósfera. Cabe destacar que el laboratorio donde se desarrolló la investigación opera bajo lineamientos institucionales que regulan el manejo de material biológico humano, incluyendo el uso de equipos de protección personal y el cumplimiento de procedimientos operativos internos. Estos lineamientos contribuyen a mantener condiciones reproducibles y seguras durante todo el desarrollo experimental.

La elección de este lugar de ejecución permitió llevar a cabo el estudio de manera controlada y sistemática, proporcionando un entorno adecuado para la comparación de métodos de aislamiento y cultivo celular, y asegurando que los resultados obtenidos responden a criterios técnicos y científicos acordes con los objetivos planteados en la investigación.

### **3.0.3 Población y muestra**

La población de estudio estuvo constituida por cordones umbilicales humanos, obtenidos posterior al parto de acuerdo con los lineamientos éticos y normativos establecidos para el manejo de material biológico humano. Estos tejidos representan una fuente rica en células madre mesenquimales humanas, particularmente a nivel de la gelatina de Wharton, lo que los convierte en un material de alto interés para estudios de aislamiento y cultivo celular. La muestra estuvo conformada por cordones umbilicales, seleccionados de manera no probabilística e intencional, en función de su disponibilidad y del cumplimiento de criterios técnicos previamente establecidos. Esta estrategia de selección permitió asegurar que el material biológico utilizado presentara condiciones adecuadas para su procesamiento, garantizando la viabilidad del estudio y la consistencia de los resultados.

Para la selección de las muestras se establecieron criterios de inclusión, relacionados tanto con las características del tejido como con las condiciones clínicas de la donadora. Se consideraron cordones umbilicales íntegros, sin alteraciones macroscópicas evidentes y procesados dentro de un intervalo de tiempo adecuado posterior a su obtención. Asimismo, se incluyeron únicamente aquellas muestras que cumplieron con las condiciones de transporte y conservación requeridas para preservar la integridad del tejido y la viabilidad celular.

En relación con la elegibilidad de la donadora, no se estableció un criterio específico de edad materna. La aceptación de la donación estuvo determinada principalmente por la evaluación clínica y los resultados de las pruebas de tamizaje infectocontagioso realizadas previamente al parto, consideradas como criterio fundamental de seguridad biológica.

A las pacientes donantes se les realizó la toma de muestras biológicas que incluyeron sangre periférica y orina. Las muestras sanguíneas fueron analizadas mediante pruebas serológicas para la detección de enfermedades infectocontagiosas, incluyendo hepatitis B (antígeno de superficie y core), hepatitis C (IgG e IgM), sífilis (VDRL), HTLV I–II, citomegalovirus IgM, toxoplasmosis IgM, hepatitis A IgM y *Trypanosoma cruzi* (IgM e IgG), además de hemograma completo.

De manera complementaria, se definieron criterios de exclusión, como la muestra de orina fue evaluada mediante un panel molecular por metodología PCR para la detección cualitativa de patógenos asociados a enfermedades de transmisión sexual, tales como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, especies de *Ureaplasma*, *Mycoplasma hominis*, virus Herpes Simplex tipos 1 y 2, *Treponema pallidum* y variantes del género *Candida*, entre otros microorganismos clínicamente relevantes.

Una vez obtenidos los resultados, el expediente clínico completo fue remitido al médico responsable, quien realizó la evaluación integral de la información serológica y molecular para determinar la aceptabilidad del cordón umbilical para fines de procesamiento e investigación. Solo aquellas donaciones con resultados negativos para marcadores infectocontagiosos fueron incluidas en el estudio.

De igual manera, se incluyeron cordones umbilicales que presentaran signos visibles de deterioro, contaminación, daño estructural o que no cumplieran con los requisitos mínimos de manipulación previa al procesamiento. Estas medidas permitieron reducir variables externas que pudieran afectar el rendimiento del aislamiento celular y el comportamiento posterior de las células en cultivo.

Cada muestra fue procesada de manera independiente, siguiendo protocolos internos estandarizados, lo que permitió evaluar el comportamiento celular obtenido mediante los distintos métodos de aislamiento empleados. La utilización de varias muestras contribuyó a fortalecer la validez técnica del estudio, al permitir la comparación de resultados bajo condiciones similares.

La definición clara de la población y la muestra resultó fundamental para el desarrollo del estudio, ya que permitió delimitar el alcance de la investigación y asegurar que los resultados obtenidos fueran representativos del material biológico analizado, en coherencia con los objetivos planteados en el marco metodológico.

### **3.0.4 Variables de estudio**

En la presente investigación se identificaron y definieron las variables de estudio con el propósito de analizar de manera sistemática el comportamiento de las células madre mesenquimales humanas aisladas a partir de cordón umbilical, así como de evaluar el

desempeño de los métodos de aislamiento y las condiciones de cultivo empleadas. La correcta delimitación de las variables permitió estructurar el análisis comparativo y garantizar la coherencia metodológica del estudio.

### **3.0.5 Variable independiente**

La variable independiente estuvo representada por el método de aislamiento de las células madre mesenquimales humanas, el cual fue aplicado bajo dos modalidades distintas. La primera modalidad correspondió al aislamiento mediante digestión enzimática, empleando una colagenasa específica para la disociación del tejido del cordón umbilical. La segunda modalidad consistió en el aislamiento celular utilizando un kit comercial estandarizado para la disociación de tejido de cordón umbilical humano. La aplicación de ambos métodos permitió comparar su comportamiento general y su desempeño en condiciones de laboratorio controladas.

Adicionalmente, se consideró como variable independiente el tipo de suplemento del medio de cultivo, empleándose dos alternativas: suero fetal bovino y lisado de plaquetas humano. Esta variable permitió evaluar el efecto de la suplementación sobre la expansión celular y el comportamiento general de las hMSC en cultivo.

### **3.0.6 Variable dependiente**

La variable dependiente estuvo constituida por el comportamiento y rendimiento celular de las hMSC obtenidas, evaluado a través de parámetros observables durante el cultivo *in vitro*. Entre estos parámetros se incluyeron la adherencia al plástico, la morfología celular, la capacidad de expansión, la proliferación celular y la viabilidad general de las células obtenidas mediante cada método de aislamiento y condición de cultivo.

La adherencia al plástico fue considerada un criterio fundamental, ya que constituye una de las características básicas que definen a las células madre mesenquimales humanas según los lineamientos internacionales. Asimismo, la observación de una morfología fibroblastoide y un patrón de crecimiento uniforme permitió inferir la presencia de poblaciones celulares compatibles con hMSC.

### **3.0.7 Variables controladas**

Se consideraron como variables controladas las condiciones generales de cultivo celular, tales como el ambiente de incubación, el manejo aséptico del material biológico, el uso de medios basales similares y la aplicación de protocolos internos estandarizados. El control de estas variables permitió reducir la influencia de factores externos y asegurar que las diferencias observadas estuvieran asociadas principalmente a las variables independientes evaluadas.

### 3.0.8 Materiales y equipos

Para el desarrollo de esta investigación se emplearon materiales, reactivos y equipos propios de un laboratorio especializado en procesamiento celular y cultivo de células humanas. Todos los insumos utilizados fueron seleccionados en función de su compatibilidad con procedimientos de aislamiento y expansión de células madre mesenquimales humanas, garantizando condiciones adecuadas de bioseguridad, esterilidad y reproducibilidad experimental.

Entre los materiales biológicos, se utilizaron cordones umbilicales humanos destinados a investigación, los cuales fueron manipulados bajo condiciones asépticas desde su recepción hasta su procesamiento. Todas las etapas del manejo del tejido se realizaron en una cabina de bioseguridad Clase II A2, conforme a protocolos internos establecidos, asegurando la preservación de la integridad estructural del material y la viabilidad celular durante las diferentes fases del procedimiento.

Para el procesamiento del tejido y aislamiento celular, se emplearon reactivos enzimáticos específicos destinados a la disociación de la matriz extracelular del cordón umbilical, así como un kit comercial estandarizado diseñado para la disociación de tejido de cordón umbilical humano. Estos insumos permitieron la comparación entre un método convencional y un método comercial, manteniendo condiciones de trabajo controladas y reproducibles.

En cuanto a los reactivos de cultivo celular, se utilizaron medios basales formulados para el mantenimiento y expansión de células madre mesenquimales humanas, suplementados con diferentes fuentes de factores de crecimiento, incluyendo suero fetal bovino y lisado de plaquetas humano. Asimismo, se emplearon soluciones tampón, medios de lavado y otros reactivos de uso común en cultivo celular, todos ellos adecuados para aplicaciones *in vitro* con células humanas.

Los materiales de consumo incluyeron recipientes de cultivo celular, sistemas de filtración, tubos de procesamiento, material plástico estéril y dispositivos auxiliares necesarios para la manipulación segura y eficiente de las muestras. Todo el material descartable fue utilizado siguiendo las normas de bioseguridad vigentes y los procedimientos internos del laboratorio.

Respecto a los equipos, se dispuso de sistemas de trabajo que permitieron la manipulación aséptica del material biológico, así como equipos destinados al mantenimiento de condiciones ambientales controladas para el cultivo celular. Asimismo, se utilizaron dispositivos para la observación microscópica de las células, lo que permitió evaluar la adherencia, morfología y comportamiento general de las hMSC durante su expansión *in vitro*.

La adecuada selección y utilización de los materiales y equipos descritos permitió llevar a cabo el estudio de manera sistemática y segura, garantizando la calidad del proceso experimental y la confiabilidad de los resultados obtenidos.

### **3.0.9 Procedimiento experimental**

El procedimiento experimental de esta investigación fue diseñado con el objetivo de estandarizar y comparar métodos para el aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales humanas (hMSC) a partir de cordón umbilical. Todas las etapas del proceso se desarrollaron bajo condiciones controladas de laboratorio, siguiendo protocolos internos validados y lineamientos institucionales para el manejo de material biológico humano, garantizando la reproducibilidad, seguridad y calidad del procedimiento.

De manera general, el procedimiento experimental comprendió una secuencia ordenada de etapas que incluyeron la recepción y preparación del cordón umbilical, el aislamiento celular mediante dos metodologías distintas, el cultivo y expansión de las células obtenidas y la evaluación de su comportamiento *in vitro*. Cada una de estas fases fue ejecutada bajo condiciones asépticas, empleando materiales estériles y técnicas apropiadas para minimizar riesgos de contaminación y preservar la viabilidad celular.

### **3.0.10 Selección y elegibilidad de la donadora**

En primer lugar, con la selección y elegibilidad de la donadora, la cual fue determinada mediante una evaluación conjunta entre el personal médico responsable y el laboratorio receptor, siguiendo criterios clínicos, éticos y técnicos previamente establecidos. A la paciente se le brindó información clara y detallada sobre el procedimiento de donación del cordón umbilical, su finalidad y los posibles usos del tejido, asegurando su comprensión del proceso. Posteriormente, se procedió a la lectura, explicación y firma del consentimiento informado, el cual fue completado y suscrito tanto por la donadora como por el médico tratante, junto con la documentación correspondiente requerida para el seguimiento del material biológico.

### **3.0.11 Recolección y transporte del cordón umbilical**

Una vez obtenido el consentimiento, se preparó un kit de transporte estéril, destinado a la recolección y traslado del cordón umbilical desde el centro hospitalario hasta el laboratorio. Dicho kit incluyó un recipiente de transporte estéril que contenía un medio de transporte, formulado para preservar la integridad del tejido mediante la presencia de sales, agentes antimicrobianos y componentes anticoagulantes, así como materiales complementarios para la toma de muestras destinadas a pruebas de control infectocontagioso. Adicionalmente, se incorporaron los formularios y registros asociados a la donación, junto con elementos de bioseguridad para el manejo adecuado del material. El conjunto fue acondicionado con elementos refrigerantes y colocado dentro de un contenedor térmico, con el objetivo de mantener el tejido en condiciones de temperatura controlada durante el traslado.

### **3.0.12 Recepción del cordón umbilical en el laboratorio**

Al arribo al laboratorio, el cordón umbilical fue recibido por el personal autorizado, quien verificó la integridad del recipiente de transporte, la correcta identificación del material

biológico y la documentación asociada, incluyendo los registros clínicos y las muestras destinadas a análisis complementarios. Tras esta verificación, el cordón fue ingresado al área correspondiente y mantenido bajo condiciones de almacenamiento temporal controladas, hasta dar inicio al procedimiento de procesamiento y aislamiento celular según los protocolos establecidos.

### **3.0.13 Métodos de aislamiento de células madre mesenquimales humanas**

Posteriormente, el aislamiento de las células madre mesenquimales humanas se llevó a cabo utilizando dos enfoques metodológicos distintos. El primer enfoque correspondió a un método basado en digestión enzimática, el cual emplea enzimas específicas para la disociación de la matriz extracelular del tejido del cordón umbilical, permitiendo la liberación de las células presentes en la gelatina de Wharton. El segundo enfoque consistió en el uso de un kit comercial diseñado para la disociación de tejido de cordón umbilical humano, el cual combina procesos de disgregación mecánica y enzimática bajo condiciones estandarizadas. Ambos métodos de aislamiento fueron aplicados de manera paralela y comparativa, manteniendo condiciones generales similares de manipulación y cultivo, con el fin de evaluar su desempeño relativo. La aplicación de estos procedimientos permitió obtener suspensiones celulares que fueron posteriormente sembradas en condiciones de cultivo apropiadas para favorecer la adherencia y expansión de las células con características mesenquimales.

### **3.0.14 Cultivo y expansión celular**

Una vez concluido el proceso de aislamiento, las células obtenidas fueron cultivadas en medios basales formulados para el mantenimiento y expansión de células madre mesenquimales humanas. Dichos medios fueron suplementados con fuentes definidas de factores de crecimiento incluyendo suero fetal bovino o lisado de plaquetas humano, según la condición experimental evaluada, así como con antibióticos y otros componentes necesarios para preservar la viabilidad celular y prevenir contaminaciones durante el cultivo.

Durante esta etapa, se realizó el seguimiento del comportamiento general de las células en cultivo, evaluando su capacidad de adherencia a superficies plásticas, la adquisición de una morfología fibroblastoide característica y su expansión progresiva a lo largo del tiempo. El mantenimiento de los cultivos se llevó a cabo conforme a prácticas estándar de cultivo celular, respetando intervalos regulares de observación microscópica y recambio de medio, de acuerdo con los procedimientos internos establecidos.

### **3.0.15 Observación y registro del comportamiento celular**

La observación microscópica constituyó una herramienta fundamental durante el procedimiento experimental, ya que permitió monitorear de forma continua el estado de los cultivos celulares. A través de esta evaluación se registraron cambios morfológicos, patrones de crecimiento y la presencia de células adherentes con morfología compatible con hMSC. Estas observaciones fueron documentadas como parte del análisis comparativo entre los métodos de aislamiento y las condiciones de cultivo empleadas.

### **3.0.16 Consideraciones de confidencialidad del procedimiento**

Es importante destacar que, debido a la naturaleza confidencial de algunos aspectos del procedimiento, ciertos parámetros técnicos específicos no fueron detallados de manera explícita en este documento. No obstante, todas las etapas descritas fueron ejecutadas conforme a protocolos internos validados, garantizando la consistencia y reproducibilidad del proceso experimental.

### **3.0.17 Síntesis del procedimiento experimental**

En conjunto, el procedimiento experimental permitió generar información relevante sobre el comportamiento de las células madre mesenquimales humanas aisladas a partir de cordón umbilical, así como establecer bases técnicas para la comparación y estandarización de métodos de aislamiento y cultivo. Esta estructura metodológica proporcionó el soporte necesario para el análisis de resultados presentado en los capítulos posteriores de la investigación.

### **3.0.18 Recepción y preparación del cordón umbilical**

La recepción y preparación del cordón umbilical constituyen una etapa crítica dentro del procedimiento experimental, ya que de esta fase depende en gran medida la calidad del material biológico y la viabilidad de las células madre mesenquimales humanas a aislar. Por esta razón, el manejo inicial del tejido fue realizado bajo condiciones controladas, siguiendo lineamientos internos estandarizados y normas básicas de bioseguridad para el procesamiento de material biológico humano.

Los cordones umbilicales fueron recibidos en el laboratorio en condiciones adecuadas de conservación, con el fin de preservar la integridad del tejido y minimizar la degradación celular. Al momento de la recepción, cada muestra fue sometida a una inspección macroscópica inicial que permitió verificar su estado general, descartando aquellas que presentaran signos evidentes de deterioro, daño estructural o contaminación visible. Esta

evaluación preliminar resultó fundamental para garantizar la calidad del material utilizado en las etapas posteriores del estudio.

Una vez aceptadas, las muestras fueron manipuladas en áreas designadas para el trabajo con tejidos humanos, bajo condiciones asépticas y utilizando equipo de protección personal adecuado. El cordón umbilical fue sometido a un proceso de limpieza inicial con soluciones apropiadas, con el objetivo de remover residuos externos y reducir la carga microbiana superficial. Este procedimiento se realizó conforme a protocolos internos, asegurando un equilibrio entre la desinfección del tejido y la preservación de la viabilidad celular.

Posteriormente, el cordón umbilical fue preparado para su procesamiento mediante procedimientos de acondicionamiento que facilitaron el acceso al tejido de interés. De manera general, se realizó la apertura del cordón y la separación de las estructuras vasculares principales, permitiendo aislar el tejido conjuntivo circundante, conocido como gelatina de Wharton, el cual constituye la principal fuente de células madre mesenquimales humanas. Estas actividades se llevaron a cabo con instrumental estéril y bajo técnicas que minimizaron el daño mecánico del tejido.

El tejido obtenido fue fragmentado en porciones de tamaño adecuado para su posterior procesamiento celular. Esta fragmentación permitió aumentar la superficie de contacto durante las etapas de aislamiento, favoreciendo la liberación de las células presentes en la matriz extracelular. Durante todo este proceso, se mantuvieron condiciones controladas de manipulación y se evitó la exposición prolongada del tejido a factores ambientales que pudieran comprometer la viabilidad celular.

Con el fin de asegurar la trazabilidad de las muestras, cada fragmento de tejido fue identificado y registrado de acuerdo con los procedimientos internos del laboratorio. Este control permitió asociar cada muestra con el método de aislamiento correspondiente y con las condiciones de cultivo evaluadas posteriormente, facilitando el análisis comparativo de los resultados.

Es importante destacar que, debido a la naturaleza confidencial del procedimiento institucional, ciertos parámetros específicos relacionados con tiempos, concentraciones y secuencias operativas no son descritos de manera detallada en este documento. No obstante, todas las actividades de recepción y preparación del cordón umbilical fueron realizadas conforme a protocolos validados, garantizando la reproducibilidad del proceso y la calidad del material biológico utilizado.

En conjunto, la correcta recepción y preparación del cordón umbilical permitió establecer una base adecuada para el aislamiento exitoso de células madre mesenquimales humanas, contribuyendo a la obtención de cultivos celulares viables y consistentes y asegurando la confiabilidad de las etapas posteriores del procedimiento experimental.

### **3.0.19 Aislamiento de células madre mesenquimales humanas mediante digestión enzimática con colagenasa NB4**

El aislamiento de células madre mesenquimales humanas (hMSC) a partir del cordón umbilical se llevó a cabo mediante un procedimiento de digestión enzimática controlada, precedido por una fase de preparación y caracterización macroscópica inicial del tejido. Esta etapa preliminar tuvo como finalidad asegurar la limpieza adecuada del cordón, así como la determinación estandarizada de sus dimensiones físicas, variables consideradas críticas para evaluar el aprovechamiento del tejido y la reproducibilidad del proceso de aislamiento. El procedimiento fue ejecutado en un cuarto limpio, bajo condiciones estrictas de bioseguridad y esterilidad, utilizando una cabina de bioseguridad Clase II A2.

### **3.0.20 Preparación del área y materiales**

Previo al inicio del procedimiento, se acondicionó el área de trabajo dentro del cuarto limpio, organizando los materiales necesarios y estableciendo zonas diferenciadas para material estéril no utilizado y material ya empleado. La superficie de trabajo fue desinfectada y cubierta con campos estériles, asegurando un entorno adecuado para el procesamiento del tejido biológico.

La cabina de bioseguridad fue encendida y verificada conforme a los procedimientos internos del laboratorio. Posteriormente, se realizó la limpieza interna de la cabina y se organizaron los materiales dentro de esta, designando un área “limpia”, un área “sucio” y un espacio central libre para la manipulación del tejido, evitando la obstrucción del flujo de aire.

### **3.0.21 Preparación del tejido y determinación inicial de longitud y peso del cordón umbilical**

Inicialmente, el cordón umbilical fue separado de la placenta mediante el uso de tijeras desechables y pinzas estériles, facilitando su manipulación sin comprometer la integridad del tejido. Posteriormente, el cordón fue transferido a un plato Petri estéril y cubierto con su tapa, mientras que la placenta fue devuelta a su recipiente de origen.

Una vez dispuesto el cordón en condiciones estériles, se procedió a la eliminación del exceso de líquido mediante gasas estériles y pinzas desechables. Seguidamente, se realizó la determinación inicial de la longitud del cordón, colocando una regla milimétrica bajo el plato Petri y registrando la medición correspondiente en el Formulario de Aislamiento de hMSC. Con base en esta medición, el cordón fue segmentado en porciones de tamaño uniforme, con una longitud máxima aproximada de 10 cm por segmento.

Finalmente, los fragmentos obtenidos fueron transferidos a tubos cónicos estériles de 50 mL y colocados en una balanza previamente tarada para la determinación del peso inicial del tejido. Este valor fue registrado como referencia para el cálculo posterior del rendimiento del aislamiento y para la evaluación del grado de aprovechamiento del cordón umbilical durante el proceso experimental.

### **3.0.22 Fragmentación mecánica del cordón umbilical**

Una vez concluida la limpieza y preparación del cordón umbilical, los fragmentos de tejido fueron transferidos a placas Petri estériles. Utilizando tijeras quirúrgicas estériles y pinzas desechables, el cordón fue cortado inicialmente en segmentos de tamaño intermedio, con el fin de facilitar su posterior digestión.

Posteriormente, los segmentos fueron introducidos en tubos cónicos estériles de 50 mL, donde se realizó una fragmentación mecánica más fina. Para ello, se introdujeron las tijeras quirúrgicas estériles directamente en el interior del tubo, efectuando movimientos repetidos de apertura y cierre, manteniendo las hojas sumergidas en solución tampón. Durante este proceso, el tubo fue rotado suavemente para asegurar un corte uniforme del tejido. La fragmentación continuó hasta obtener fragmentos pequeños y relativamente homogéneos, observándose una suspensión tisular consistente.

### **3.0.23 Digestión enzimática del tejido**

Una vez alcanzado el grado adecuado de fragmentación mecánica, los tubos fueron preparados para la digestión enzimática. Se añadió la solución de colagenasa NB4 previamente preparada conforme al protocolo institucional, asegurando que los fragmentos de tejido quedaran completamente cubiertos.

Los tubos fueron colocados en un rotor incubador previamente encendido y estabilizado a 37 °C, temperatura óptima para favorecer la actividad y el desempeño enzimático durante el proceso de digestión, permitiendo la disociación controlada del tejido mediante agitación continua. Durante este período, el progreso de la digestión fue monitoreado de forma periódica, retirando los tubos para una breve homogenización mediante vórtex cuando fue necesario, con el fin de favorecer la disociación tisular y evitar la sedimentación de fragmentos.

La digestión se consideró adecuada cuando se observó una disminución evidente de los fragmentos sólidos y la obtención de una suspensión celular más homogénea, indicativa de la disolución parcial de la matriz extracelular de la gelatina de Wharton y de una liberación efectiva de las células presentes en el tejido.

### **3.0.24 Inactivación enzimática y disociación mecánica asistida**

Finalizada la digestión enzimática, la actividad de la colagenasa fue detenida mediante la adición de un medio específico de inactivación, siguiendo los lineamientos internos del laboratorio. Posteriormente, la suspensión resultante fue diluida y transferida a un recipiente estéril de mayor capacidad, facilitando su manipulación y preparación para los siguientes pasos.

Si bien la digestión enzimática permitió la degradación parcial de la matriz extracelular del tejido, este proceso no logró la disociación completa de todos los fragmentos tisulares, observándose la persistencia de agregados y restos de estroma. Por esta razón, se incorporó una etapa adicional de disociación mecánica asistida, orientada a optimizar la liberación celular sin comprometer la viabilidad de las células obtenidas.

Con este objetivo, la suspensión celular, junto con los fragmentos tisulares remanentes, fue transferida a los tubos específicos del sistema comercial gentleMACS™ (Miltenyi Biotec), los cuales cuentan con estructuras internas diseñadas para generar fuerzas mecánicas controladas durante la rotación y el procesamiento automatizado. Estos tubos fueron procesados utilizando un programa preestablecido del equipo, diseñado para la disociación mecánica suave de tejidos biológicos, permitiendo la fragmentación adicional del tejido y mejorando la separación celular mediante un efecto de trituración controlada.

### **3.0.25 Filtración y recuperación celular**

La suspensión celular obtenida fue sometida a un proceso de filtración secuencial utilizando filtros celulares de diferente tamaño de poro, ensamblados mediante un sistema estéril de filtración que incluyó embudo y anillo conector. La filtración se realizó de manera gradual mediante la aplicación de vacío controlado, facilitando el paso de la suspensión celular a través de los filtros y permitiendo la retención de restos tisulares y agregados no deseados, mientras se preservaba la integridad de las células.

El filtrado resultante fue recolectado en tubos cónicos estériles y posteriormente sometido a centrifugación controlada para la recuperación de las células. Tras la centrifugación, el sobrenadante fue retirado cuidadosamente y los pellets celulares obtenidos fueron resuspendidos de forma homogénea en medio de cultivo adecuado, asegurando una suspensión celular uniforme para su posterior siembra. Las suspensiones celulares recuperadas fueron posteriormente unificadas y sometidas a lavados adicionales mediante centrifugación, con el objetivo de eliminar residuos del procesamiento previo, incluyendo restos enzimáticos, y para obtener una suspensión celular limpia y uniforme, adecuada para su posterior siembra y cultivo primario.

### **3.0.26 Obtención de la suspensión celular para cultivo primario**

Finalmente, los pellets celulares obtenidos tras los procesos de filtración y lavado fueron resuspendidos de forma homogénea en medio de cultivo completo para células madre

mesenquimales humanas, suplementado SFB o HPL y antibióticos, con el objetivo de preservar la viabilidad celular y prevenir contaminaciones durante el establecimiento del cultivo primario. Luego, la suspensión celular fue preparada para su siembra en frascos de cultivo tratados para favorecer la adherencia celular.

La siembra de las células se realizó considerando la relación entre la masa de tejido procesado y el área de cultivo disponible (g de tejido por  $\text{cm}^2$ ), con el fin de normalizar el rendimiento celular y minimizar la influencia de variables asociadas a la viabilidad celular inicial o al estado intrínseco del cordón umbilical. Este enfoque permitió controlar la variabilidad biológica inherente al tejido de origen y asegurar una comparación más precisa entre las condiciones experimentales evaluadas.

Las células obtenidas mediante este procedimiento demostraron capacidad de adherirse a las superficies plásticas del cultivo, adoptando progresivamente una morfología alargada y fibroblastoide característica de las hMSC, lo cual permitió su posterior expansión en cultivo primario bajo condiciones controladas.

### **3.0.27 Aislamiento de células madre mesenquimales mediante kit comercial**

El aislamiento de células madre mesenquimales humanas a partir de cordón umbilical mediante kit comercial se realizó empleando el Umbilical Cord Dissociation Kit, human (Miltenyi Biotec, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante para tejido fresco y utilizando el sistema automatizado gentleMACS™ Dissociator. Este método combina digestión enzimática controlada y disociación mecánica estandarizada, permitiendo la obtención de suspensiones celulares de manera reproducible.

### **3.0.28 Preparación del tejido para disociación**

Previo al proceso de disociación, el cordón umbilical fue procesado bajo condiciones estériles dentro de una cabina de bioseguridad Clase II A2. Inicialmente, el tejido fue sometido a una caracterización macroscópica básica que incluyó la medición de su longitud y la determinación de su peso, con el objetivo de estandarizar la cantidad de material biológico procesado por unidad experimental.

Para ello, el cordón umbilical previamente limpio fue dispuesto en un plato Petri estéril, donde se realizó la medición de su longitud utilizando una regla milimetrada. Posteriormente, el tejido fue transferido a tubos cónicos estériles y pesado en una balanza previamente tarada, registrando estos valores como referencia para el control del aprovechamiento del tejido y la reproducibilidad del proceso de aislamiento.

Una vez registrados estos parámetros, el cordón fue reducido mecánicamente utilizando tijeras quirúrgicas estériles y pinzas desechables. El tejido fue cortado en fragmentos de aproximadamente 2 mm de longitud, procurando obtener piezas homogéneas que permitieran una exposición uniforme a los reactivos del sistema comercial. Esta fragmentación se realizó asegurando que los cortes fueran completos y alcanzaran el fondo del recipiente, favoreciendo una disociación eficiente del tejido.

Los fragmentos obtenidos fueron distribuidos en tubos C específicos del sistema gentleMACS™ (Miltenyi Biotec), los cuales permiten el procesamiento del tejido en un sistema cerrado y estandarizado. En cada tubo C se colocó una cantidad definida de tejido, correspondiente a un total aproximado de 4,4 g de cordón umbilical por tubo, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta estandarización permite asegurar la reproducibilidad del procedimiento y una disociación tisular consistente entre las diferentes muestras procesadas.

### **3.0.29 Preparación de reactivos del kit comercial**

Los reactivos enzimáticos incluidos en el kit comercial (Enzimas A, B, D y P, junto con el Buffer L) fueron previamente preparados conforme a las indicaciones del fabricante. Las enzimas liofilizadas fueron reconstituidas en el buffer correspondiente y manejadas cuidadosamente para evitar agitación excesiva que pudiera comprometer su actividad. Las soluciones enzimáticas fueron mantenidas en condiciones adecuadas hasta su utilización, evitando ciclos repetidos de congelación y descongelación.

### **3.0.30 Disociación enzimática y mecánica automatizada**

Una vez preparado el tejido y añadida la combinación enzimática correspondiente, la digestión inicial del cordón umbilical se llevó a cabo en tubos cónicos estériles de 50 mL, con el objetivo de optimizar el uso de insumos. Los tubos fueron colocados en un termorrotador previamente estabilizado a 37 °C, permitiendo la acción enzimática controlada sobre el tejido durante un período aproximado de una hora, bajo agitación continua, con el fin de favorecer la degradación parcial de la matriz extracelular.

Transcurrido el tiempo de digestión enzimática, la actividad de las enzimas fue detenida mediante la adición de un medio específico de inactivación, siguiendo los lineamientos del protocolo del kit comercial.

Una vez inactivada la acción enzimática, la solución celular fue colocada en tubos C específicos del sistema gentleMACS™ (Miltenyi Biotec), para su homogeneización. El proceso de disociación se llevó a cabo mediante la ejecución de programas preestablecidos del equipo gentleMACS™, los cuales combinan ciclos de disgregación mecánica automatizada diseñados para completar la liberación celular iniciada por la digestión enzimática previa. Este enfoque permitió una disociación más eficiente del tejido residual, reduciendo la presencia de fragmentos tisulares y minimizando el daño celular asociado a métodos manuales intensivos.

### **3.0.31 Filtración y recuperación de la suspensión celular**

La suspensión resultante fue transferida cuidadosamente a sistemas de filtración estériles utilizando MACS® SmartStrainers de 70  $\mu\text{m}$  y 30  $\mu\text{m}$  (Miltenyi Biotec), con el objetivo de eliminar restos tisulares no disociados y obtener una suspensión celular homogénea adecuada para cultivo y análisis posteriores. Durante este proceso se realizaron lavados de los strainers para maximizar la recuperación celular y preservar la integridad de la población celular obtenida.

Posteriormente, la suspensión filtrada fue centrifugada para concentrar las células, y el sobrenadante fue retirado cuidadosamente. El pellet celular obtenido fue resuspendido en medio apropiado para su posterior cultivo primario o para aplicaciones experimentales posteriores.

### **3.0.32 Consideraciones generales del método**

El uso del Umbilical Cord Dissociation Kit, human permitió estandarizar el proceso de aislamiento mediante una combinación controlada de digestión enzimática y disociación mecánica, reduciendo la variabilidad asociada a la manipulación manual del tejido. La utilización del sistema gentleMACS™ aseguró condiciones reproducibles entre procesamientos y facilitó la obtención de suspensiones celulares adecuadas para cultivo y expansión de células madre mesenquimales.

Las células obtenidas mediante este método fueron destinadas inmediatamente a cultivo primario bajo condiciones controladas. La siembra se realizó considerando la relación entre la masa de tejido procesado y el área de cultivo disponible (g de tejido por  $\text{cm}^2$ ), con el objetivo de normalizar el rendimiento celular y minimizar la influencia de variables asociadas a la viabilidad inicial o a las propiedades intrínsecas del cordón umbilical. Este enfoque permitió asegurar la consistencia entre cultivos y fortalecer la comparabilidad de los resultados obtenidos durante el proceso de estandarización.

### **3.0.33 Cultivo y expansión celular de hMSC derivadas de cordón umbilical**

Una vez obtenida la suspensión celular resultante de los procesos de aislamiento, las células madre mesenquimales humanas fueron destinadas a cultivo primario con el objetivo de evaluar su capacidad de adherencia, supervivencia y expansión in vitro. El cultivo celular se

realizó bajo condiciones controladas de temperatura, atmósfera y esterilidad, siguiendo los lineamientos internos establecidos para el manejo de cultivos celulares humanos.

La suspensión celular final fue resuspendida cuidadosamente en medio de cultivo completo previamente preparado y suplementado ya sea con HPL o SFB, evitando la formación de burbujas y asegurando una distribución homogénea de las células. Posteriormente, las células fueron sembradas en frascos de cultivo tratados para favorecer la adherencia celular, seleccionados de acuerdo con el área de crecimiento requerida. Cada frasco fue rotulado adecuadamente con la identificación de la muestra, fecha de siembra, tipo de medio utilizado y condición experimental correspondiente.

Los frascos sembrados fueron incubados en una incubadora de cultivo celular bajo condiciones fisiológicas controladas manteniendo una temperatura constante cercana a los 37 °C, una atmósfera humidificada con 5 % de dióxido de carbono y niveles de 90 % de humedad relativa. Estas condiciones permitieron la adecuada regulación del pH del medio de cultivo y favorecieron la supervivencia y proliferación celular. Durante las primeras 24 a 48 horas posteriores a la siembra no se realizaron manipulaciones del cultivo, con el fin de permitir el asentamiento, la adhesión al plástico y la estabilización inicial de las células.

Transcurrido este período inicial, se procedió a la observación microscópica de los cultivos mediante un microscopio invertido. Se evaluó la presencia de células adherentes, su distribución sobre la superficie del frasco y su morfología. En esta etapa se observaron colonias celulares discretas, organizadas en conglomerados redondeados con disposición similar a “monedas apiladas”, que progresivamente dieron origen a células con morfología alargada y fibroblastoide. Estas características morfológicas son compatibles con células madre mesenquimales humanas en cultivo primario.

El mantenimiento del cultivo se realizó mediante cambios periódicos de medio de cultivo, retirando cuidadosamente el sobrenadante para eliminar restos celulares no adherentes y productos de desecho metabólico, y reemplazándolo por medio fresco sin antibiótico. Este procedimiento permitió mantener condiciones óptimas para la expansión celular y reducir el riesgo de acumulación de sustancias tóxicas en el microambiente de cultivo.

A medida que avanzó el tiempo de cultivo, se monitoreó de forma regular el grado de confluencia celular mediante observación microscópica. Cuando los cultivos alcanzaron un alto nivel de confluencia, se consideró necesario realizar un pase celular con el objetivo de evitar la senescencia celular temprana asociada al fenómeno de inhibición por contacto. Para ello, las células adherentes fueron desprendidas de la superficie del frasco mediante el uso de enzimas de disociación celular basadas en tripsina recombinante xeno-free, recolectadas y posteriormente resuspendidas en medio de cultivo completo para su replaqueo en nuevos frascos de cultivo, permitiendo así la continuidad del proceso de expansión celular bajo

condiciones controladas. Durante el proceso de expansión celular se registraron observaciones cualitativas relacionadas con la velocidad de crecimiento, la homogeneidad morfológica y la estabilidad del cultivo. Estas observaciones permitieron evaluar de manera indirecta la calidad del aislamiento y la adecuación de las condiciones de cultivo empleadas.

Cabe destacar que, en este estudio, la caracterización de las células madre mesenquimales humanas se basó en criterios funcionales y morfológicos tempranos, tales como la capacidad de adherencia al plástico, la morfología fibroblastoide y la proliferación sostenida en cultivo, de acuerdo con las recomendaciones de la International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT) para la identificación inicial de MSC. Las evidencias obtenidas mediante observación microscópica fueron documentadas mediante registros fotográficos, los cuales respaldan la identificación de las células obtenidas como compatibles con hMSC.

En conjunto, el cultivo y expansión celular permitieron confirmar la viabilidad de las células aisladas por los diferentes métodos evaluados y proporcionaron una base sólida para la comparación del desempeño de los protocolos de aislamiento, objetivo central del presente estudio de estandarización.

### **3.0.34 Análisis de datos**

El análisis de los datos obtenidos durante el desarrollo del estudio se realizó utilizando el *software* GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, EE. UU.), empleado principalmente para la organización, visualización gráfica y análisis descriptivo de los resultados. Dado que el objetivo del trabajo fue la estandarización y comparación de métodos de aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales humanas, el enfoque del análisis se centró en la evaluación comparativa de parámetros cualitativos y cuantitativos básicos, más que en pruebas estadísticas inferenciales complejas.

Los datos registrados durante las diferentes etapas del procedimiento experimental incluyeron variables relacionadas con el procesamiento inicial del cordón umbilical, tales como longitud y peso del tejido, así como observaciones asociadas al rendimiento del aislamiento celular y al comportamiento del cultivo primario. Estos valores fueron organizados en hojas de datos y posteriormente importados al *software* GraphPad Prism 10 para su representación gráfica.

Para la comparación entre los métodos de aislamiento, los resultados fueron representados mediante gráficos de columnas, en los cuales se expresó el valor promedio acompañado de su respectiva desviación estándar (promedio  $\pm$  DS). Estas representaciones gráficas permitieron visualizar de manera comparativa el aprovechamiento del tejido, la obtención de suspensiones celulares y la evolución del cultivo a lo largo del tiempo. Los análisis se realizaron considerando diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de  $p < 0.05$ .

En el caso del cultivo y expansión celular, el análisis se basó principalmente en la observación morfológica y en el seguimiento temporal del crecimiento celular. Las imágenes microscópicas obtenidas durante el cultivo primario fueron utilizadas como evidencia visual del comportamiento celular, documentando características como la adherencia al plástico, la morfología fibroblastoide y la progresión hacia la confluencia. Estas observaciones fueron correlacionadas con el método de aislamiento empleado y el tipo de suplemento de cultivo utilizado.

Dado que el estudio no incluyó caracterización fenotípica por citometría de flujo ni cuantificación celular automatizada, no se realizaron análisis estadísticos inferenciales ni pruebas de significancia. En su lugar, el análisis gráfico permitió establecer tendencias y patrones generales que contribuyeron a la evaluación del desempeño de los protocolos ensayados.

El uso de GraphPad Prism 10 facilitó la presentación clara y ordenada de los resultados, permitiendo una interpretación visual intuitiva y coherente con los objetivos del estudio. Este enfoque resultó adecuado para un trabajo de estandarización metodológica, en el cual la reproducibilidad del proceso, la consistencia del cultivo y la comparación cualitativa entre métodos constituyen los principales criterios de evaluación.

### **3.0.35 Limitaciones del estudio**

A pesar de que el estudio permitió estandarizar y comparar dos métodos de aislamiento de células madre mesenquimales humanas (hMSC) derivadas de cordón umbilical bajo condiciones controladas de laboratorio, es importante reconocer ciertas limitaciones metodológicas que deben ser consideradas al interpretar los resultados obtenidos. Estas limitaciones no invalidan los hallazgos del estudio, sino que delimitan su alcance y abren oportunidades para investigaciones futuras que complementen y profundicen los resultados aquí presentados.

Una de las principales limitaciones del estudio fue el tamaño muestral reducido, condicionado por la disponibilidad de cordones umbilicales aptos para investigación y por los criterios estrictos de inclusión establecidos. Si bien se procesaron múltiples muestras de manera independiente, un mayor número de donaciones permitiría fortalecer el análisis estadístico, reducir la variabilidad biológica inherente al tejido de origen y mejorar la robustez de las comparaciones entre métodos de aislamiento y condiciones de cultivo.

Asimismo, el estudio se enfocó principalmente en la evaluación morfológica y funcional temprana de las hMSC obtenidas, utilizando criterios indirectos como la adherencia al plástico, la morfología fibroblastoide, la formación de colonias y la capacidad de expansión en cultivo primario. No se incluyó una caracterización fenotípica mediante citometría de flujo, lo que hubiera permitido confirmar de manera más concluyente la expresión de marcadores

positivos (CD73, CD90, CD105) y la ausencia de marcadores hematopoyéticos (CD34, CD45, CD14, CD19 y HLA-DR), de acuerdo con los criterios establecidos por la International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT). La incorporación de esta caracterización en estudios futuros permitiría validar de forma más robusta la identidad mesenquimal de las células aisladas.

De igual manera, no se realizaron ensayos funcionales de diferenciación trilineal (osteogénica, adipogénica y condrogénica), los cuales constituyen uno de los criterios formales para la confirmación funcional de las hMSC. La ausencia de estos ensayos limita la evaluación del potencial multipotente de las células obtenidas; sin embargo, su inclusión en estudios posteriores permitiría ampliar la caracterización biológica de las poblaciones celulares aisladas y evaluar el impacto del método de aislamiento sobre su capacidad de diferenciación.

Otra limitación relevante fue la ausencia de cuantificación celular precisa mediante sistemas automatizados o métodos estandarizados de conteo celular y evaluación de viabilidad (por ejemplo, citometría, contadores automatizados o ensayos metabólicos). En consecuencia, el análisis del rendimiento celular se basó en parámetros relativos, como la relación entre masa de tejido procesado y área de cultivo, así como en observaciones cualitativas del comportamiento en cultivo. Estudios futuros podrían incorporar herramientas cuantitativas para evaluar de manera más objetiva la eficiencia de cada método de aislamiento.

Adicionalmente, el estudio no incluyó la evaluación de parámetros genéticos o de estabilidad cromosómica, como análisis de cariotipo o pruebas de integridad genómica, los cuales resultan relevantes especialmente cuando se considera la expansión prolongada de hMSC con fines terapéuticos. La incorporación de estos análisis permitiría determinar si los diferentes métodos de aislamiento o suplementos de cultivo influyen en la estabilidad genética de las células a lo largo de los pases celulares.

Por último, debido a la naturaleza confidencial de los protocolos institucionales, ciertos parámetros técnicos específicos relacionados con concentraciones exactas, tiempos de incubación y secuencias operativas no pudieron ser detallados exhaustivamente en este documento. No obstante, todos los procedimientos fueron ejecutados conforme a protocolos internos validados, lo que garantiza la reproducibilidad del proceso dentro del contexto institucional. Estudios futuros, diseñados específicamente para publicación o transferencia tecnológica, podrían abordar estos aspectos con mayor nivel de detalle metodológico.

En conjunto, estas limitaciones delimitan el alcance del trabajo y resaltan su valor como estudio de estandarización metodológica, constituyendo una base sólida para investigaciones posteriores orientadas a la caracterización avanzada, validación funcional y aplicación clínica o preclínica de las hMSC derivadas de cordón umbilical. Lejos de representar debilidades,

estas oportunidades de mejora abren la posibilidad de desarrollar estudios complementarios que profundicen y den continuidad a los hallazgos obtenidos.

# CAPÍTULO IV:

## RESULTADOS

### **4. Eficiencia del aislamiento enzimático**

Se evaluó la eficiencia del aislamiento de hMSC derivadas del cordón umbilical mediante dos métodos de digestión enzimática: el Umbilical Cord Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) y colagenasa NB4. La eficiencia fue analizada en función del peso inicial del tejido procesado, considerando el número total de células viables obtenidas, el porcentaje de viabilidad y la relación de células viables por gramo de tejido como indicador de rendimiento enzimático.

En términos generales, ambos métodos permitieron la recuperación de poblaciones celulares con alta viabilidad (>93 %). La relación células/gramo de tejido mostró variabilidad entre muestras procesadas con colagenasa NB4, observándose el valor más alto en la muestra M3 ( $7.23E+05$  células/g), mientras que el kit comercial presentó un rendimiento intermedio ( $4.33E+05$  células/g) (Tabla 1).

El análisis comparativo de la relación células viables por gramo de tejido no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos cuando se consideraron los

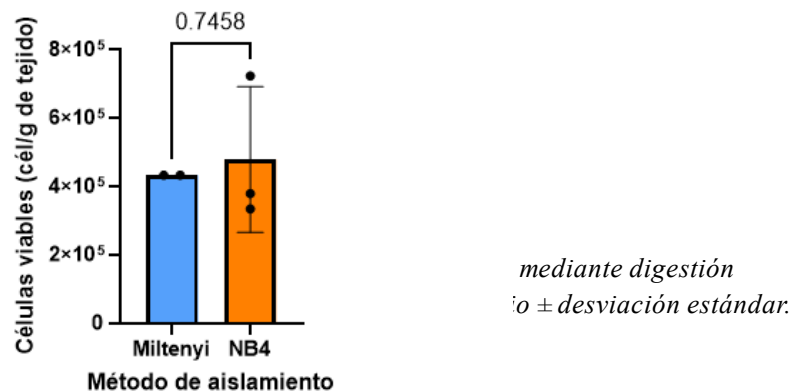
valores promedio ( $p > 0.05$ ), lo que sugiere que ambos protocolos son técnicamente eficientes para la recuperación de hMSC a partir de cordón umbilical (Fig. 1)

**Tabla 1.** Eficiencia enzimática según método de aislamiento en función del peso inicial del tejido

Muestra	Enzima utilizada	Peso inicial (g)	Células Viables	Viabilidad	Relación células/g de tejido
M1	Kit comercial (Miltenyi)	17.5	7.58E+06	93.50%	4.33E+05
M2	Colagenasa NB4	25.83	9.80E+06	95.80%	3.79E+05
M3	Colagenasa NB4	9.68	7.00E+06	93.60%	7.23E+05
M4	Colagenasa NB4	23.93	8.00E+06	93.90%	3.34E+05

La tabla 1 presenta el rendimiento celular obtenido mediante dos métodos de aislamiento de hMSC derivadas del cordón umbilical, expresado en función del peso inicial del tejido procesado. Se incluyen los valores de células viables totales, porcentaje de viabilidad y la relación de células obtenidas por gramo de tejido, utilizada como indicador de eficiencia enzimática.

**Figura 1.** Relación de eficiencia enzimática con kit con Colagenasa NB4. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

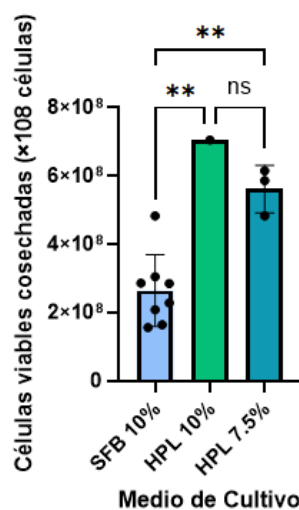


#### 4.1 Rendimiento de cosecha celular en hMSC bajo diferentes condiciones de suplementación

Se evaluó el rendimiento de cosecha de hMSC derivadas de cordón umbilical cultivadas a una densidad de 4000 células/cm<sup>2</sup> en medios suplementados con SFB 10 %, hPL 7.5 % y hPL 10 % (Tabla 2). La condición hPL 7.5 % también evidenció un incremento en la producción celular respecto a SFB, manteniendo altos niveles de viabilidad en todas las condiciones evaluadas. Estos resultados indican que el lisado plaquetario humano favorece la expansión de hMSC sin comprometer la viabilidad celular (Fig. 2).

**Tabla 2.** Características de cosecha celular de hMSC cultivadas en medios suplementados con suero fetal bovino (SFB 10 %) y lisado plaquetario humano (hPL 10% y 7.5 %).

Muestra	Medio de cultivo	Pasaje	Densidad de siembra	Células totales cosechadas	Total de células viables cosechadas
M27	SFB 10 %	P6	4000	4.96E+08	4.83E+08
M27	SFB 10 %	P6	4000	1.59E+08	1.56E+08
M27	SFB 10 %	P6	4000	2.12E+08	2.08E+08
M27	SFB 10 %	P6	4000	1.69E+08	1.64E+08
M08	SFB 10 %	P6	4000	3.08E+08	3.05E+08
M08	SFB 10 %	P6	4000	2.90E+08	2.85E+08
M08	SFB 10 %	P6	4000	2.31E+08	2.28E+08
M08	SFB 10 %	P6	4000	2.89E+08	2.86E+08
M27	hPL 7.5 %	P6	4000	4.96E+08	4.83E+08
M08	hPL 7.5 %	P6	4000	6.32E+08	6.15E+08
M08	hPL 7.5 %	P6	4000	6.02E+08	5.86E+08
M08	hPL 10 %	P5	4000	7.25E+08	7.05E+08



**Figura 2.** Comparación del rendimiento celular de hMSC cultivadas en diferentes condiciones de suplementación con base en la cantidad de células viables cosechadas ( $\times 10^8$  células) en cultivos de hMSC

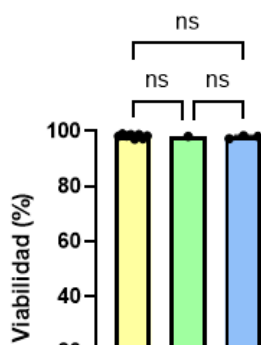
derivadas de cordón umbilical mantenidas en medios suplementados con SFB 10 %, hPL 10 % y hPL 7.5 %. El análisis estadístico mostró un incremento significativo en el rendimiento celular en la condición hPL 10 % en comparación con SFB 10 % ( $p < 0.01$ ). No se observaron diferencias significativas entre hPL 10 % y hPL 7.5 % (ns). En conjunto, los resultados indican que el hPL favorece la expansión celular respecto al suero fetal bovino, manteniendo una alta productividad en ambas concentraciones evaluadas. El análisis se basó en el total de células viables cosechadas en pasajes P5–P6, expresando los resultados como promedio  $\pm$  desviación estándar por condición.

#### 4.2 Viabilidad celular de hMSC bajo diferentes condiciones de suplementación

Se evaluó el porcentaje de viabilidad de hMSC derivadas de cordón umbilical cultivadas en medios suplementados con SFB 10 %, hPL 7.5 % y hPL 10 % (Tabla 3). En todas las condiciones se observaron valores elevados de viabilidad celular, superiores al 97 %. El análisis comparativo no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados (ns), indicando que la sustitución de SFB por lisado plaquetario humano no compromete la integridad ni la supervivencia celular (Fig. 3).

**Tabla 3.** Viabilidad celular de hMSC según medio de cultivo

Muestra	Medio de cultivo	Viabilidad (%)
M27	SFB 10 %	97.30
M27	SFB 10 %	98.30
M27	SFB 10 %	98.30
M27	SFB 10 %	97.10
M08	SFB 10 %	99.00
M08	SFB 10 %	98.20
M08	SFB 10 %	98.80
M08	SFB 10 %	98.80
M27	hPL 7.5 %	97.30
M08	hPL 7.5 %	98.10
M08	hPL 7.5 %	98.40
M08	hPL 10 %	98.10



**Figura 3.** Comparación del porcentaje de viabilidad de hMSC cultivadas en diferentes medios de suplementación. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar. Todas las condiciones mostraron viabilidad superior al 97 %, sin diferencias estadísticamente significativas entre SFB 10 %, hPL 7.5 % y hPL 10 % (ns).

### 4.3 Tasa de duplicación poblacional de hMSC según medio de cultivo

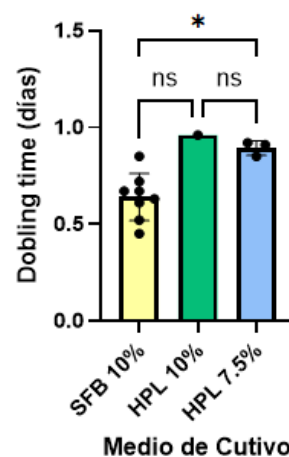
La tasa de duplicación poblacional (doubling/día) de hMSC derivadas de cordón umbilical fue evaluada en cultivos suplementados con SFB 10 %, hPL 7.5 % y hPL 10 %, calculándose a partir de la relación logarítmica entre el número de células sembradas y cosechadas (Tabla 4). Las células cultivadas en medios suplementados con lisado plaquetario humano presentaron una mayor tasa de duplicación en comparación con aquellas mantenidas en SFB 10 %. En particular, los cultivos con hPL alcanzaron un promedio aproximado de 0.91 duplicaciones por día, mientras que en SFB la tasa promedio fue cercana a 0.64 duplicaciones por día, evidenciando una mayor capacidad proliferativa bajo condiciones con hPL.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre SFB 10 % y hPL 10 % (\* $p < 0.05$ ), mientras que las demás comparaciones no evidenciaron significancia estadística, lo que sugiere que el lisado plaquetario humano favorece la expansión celular sin afectar la estabilidad del cultivo (Fig. 4).

**Tabla 4.** Tiempo de duplicación (*doubling*) de hMSC según medio de cultivo

Muestra	Medio de cultivo	Tiempo de duplicación
M27	SFB 10 %	0.85
M27	SFB 10 %	0.52
M27	SFB 10 %	0.61
M27	SFB 10 %	0.45
M08	SFB 10 %	0.72

M08	SFB 10 %	0.67
M08	SFB 10 %	0.63
M08	SFB 10 %	0.67
M27	hPL 7.5 %	0.85
M08	hPL 7.5 %	0.92
M08	hPL 7.5 %	0.91
M08	hPL 10 %	0.96



**Figura 4.** Comparación de la tasa de duplicación poblacional (doubling/día) de hMSC cultivadas en diferentes medios de suplementación. Las hMSC cultivadas en medios suplementados con hPL 10 % y hPL 7.5 % mostraron una mayor tasa de duplicación en comparación con SFB 10 %. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre SFB 10% y hPL 10% ( $*p < 0.05$ ), mientras que las demás comparaciones no mostraron significancia estadística (ns). En conjunto, los resultados indican que el lisado plaquetario humano favorece la capacidad proliferativa de las hMSC sin comprometer la estabilidad del cultivo. La tasa de duplicación fue calculada a partir de la relación logarítmica entre el número de células sembradas y cosechadas. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar.

#### 4.4 Rendimiento celular (Yield) de hMSC según medio de cultivo

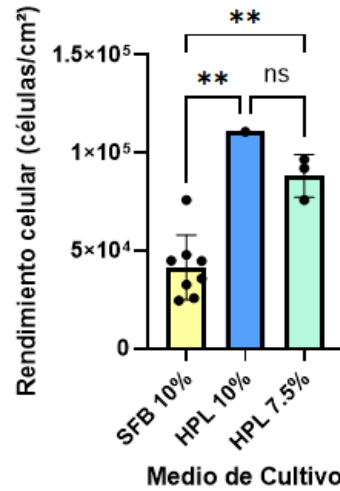
El rendimiento celular, expresado como células obtenidas por  $\text{cm}^2$  de superficie de cultivo, fue evaluado en hMSC cultivadas en medios suplementados con SFB 10 %, hPL 7.5 % y hPL 10 % (Tabla 5) Los cultivos suplementados con lisado plaquetario humano presentaron un rendimiento significativamente mayor en comparación con SFB 10 %.

Este hallazgo es consistente con la mayor tasa de duplicación poblacional observada en condiciones con hPL ( $\approx 0.91$  duplicaciones/día) frente a SFB ( $\approx 0.64$  duplicaciones/día), lo que se traduce en una mayor eficiencia de expansión y mayor número total de células cosechadas por unidad de área. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas

entre SFB 10 % y ambas concentraciones de hPL (\*\* $p < 0.01$ ), mientras que no se observaron diferencias significativas entre hPL 10 % y hPL 7.5 % (Fig. 5).

**Tabla 5.** Rendimiento celular (*Yield*) de hMSC según medio de cultivo

Muestra	Medio de cultivo	Yield
M27	SFB 10 %	75943
M27	SFB 10 %	24528
M27	SFB 10 %	32704
M27	SFB 10 %	25786
M08	SFB 10 %	47956
M08	SFB 10 %	44811
M08	SFB 10 %	35849
M08	SFB 10 %	44969
M27	hPL 7.5 %	75943
M08	hPL 7.5 %	96698
M08	hPL 7.5 %	92138
M08	hPL 10 %	110849



**Figura 5.** Comparación del rendimiento celular (Yield) de hMSC según medio de cultivo, rendimiento celular expresado como células/cm<sup>2</sup> en cultivos suplementados con SFB 10 %, hPL 7.5 % y hPL 10 %, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre SFB 10 % y ambas condiciones con hPL (\*\* $p < 0.01$ ), mientras que entre hPL 10 % y hPL 7.5 % no se evidenciaron diferencias significativas (ns). En conjunto, los resultados confirman que el lisado plaquetario humano mejora significativamente la eficiencia productiva de hMSC en términos de expansión celular. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar.

# **CAPÍTULO V: DISCUSIÓN**

## 5. Eficiencia de aislamiento: colagenasa NB4 vs kit comercial Miltenyi

Esta investigación evidencia que ambos métodos evaluados permitieron el aislamiento exitoso de hMSC a partir de cordón umbilical, obteniéndose rendimientos promedio del orden de  $10^5$  células viables por gramo de tejido procesado y una viabilidad promedio superior al 93 %. Estos resultados indican que tanto la digestión manual con colagenasa NB4 como el sistema comercial basado en disociación mecánica y enzimática automatizada fueron técnicamente eficaces para la recuperación celular.

La digestión enzimática con colagenasa es uno de los métodos más ampliamente descritos para la liberación de células mesenquimales a partir de la gelatina de Wharton, debido a su alta concentración de colágeno en la matriz extracelular (El Omar et al., 2014). Diversos protocolos publicados reportan rendimientos variables que generalmente se sitúan entre  $10^5$  y  $10^6$  células por gramo de tejido, dependiendo de factores como el grado de fragmentación del cordón, el tiempo de incubación y las condiciones de procesamiento (Davies et al., 2017; Zheng et al., 2022). En este contexto, los valores promedio obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro de los rangos descritos para procedimientos enzimáticos efectivos.

El uso de sistemas comerciales como gentleMACS™ tiene como objetivo estandarizar el proceso de disociación tisular mediante la combinación de digestión enzimática y disrupción mecánica controlada, reduciendo potencialmente la variabilidad asociada a la manipulación manual (Davies et al., 2017). Sin embargo, en los resultados observados no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre el kit comercial y el protocolo manual con colagenasa NB4 ( $p = 0.74$ ), lo que sugiere que un método convencional correctamente optimizado puede alcanzar niveles comparables de eficiencia de aislamiento.

La variabilidad interindividual observada puede atribuirse a factores biológicos inherentes al tejido donado, tales como la densidad celular inicial y la composición de la matriz extracelular, los cuales han sido descritos como determinantes del rendimiento en protocolos de aislamiento de gelatina de Wharton (El Omar et al., 2014). Asimismo, la fragmentación previa del tejido aplicada en ambos métodos probablemente contribuyó de manera relevante a la exposición uniforme de la matriz a la acción enzimática, favoreciendo la liberación celular.

Desde el punto de vista funcional, las células obtenidas mostraron morfología fibroblastoide y capacidad de adherencia plástica, características compatibles con los criterios mínimos establecidos para definir células mesenquimales multipotentes (Dominici et al., 2006). La alta viabilidad promedio sugiere que los procedimientos de digestión e inactivación enzimática no comprometieron la integridad celular ni su capacidad proliferativa inicial, aspecto fundamental para su posterior expansión *in vitro* (Ullah et al., 2015).

En conjunto, los hallazgos del estudio indican que tanto el protocolo manual con colagenasa NB4 como el sistema comercial automatizado constituyen alternativas técnicamente válidas para el aislamiento de hMSC de cordón umbilical. La selección entre ambos podría depender más de criterios operativos, de estandarización y de costos institucionales que de diferencias sustanciales en el rendimiento celular promedio obtenido.

### **5.1 Rendimiento de cosecha celular en hMSC bajo diferentes condiciones de suplementación: SFB vs. hPL**

Se evidenció un incremento significativo en la cantidad promedio de células viables cosechadas cuando las hMSC derivadas de cordón umbilical fueron cultivadas en medios suplementados con lisado plaquetario humano (hPL), en comparación con suero fetal bovino (SFB 10 %). El cultivo con SFB 10 % presentó un promedio aproximado de  $2.64 \times 10^8$  células viables, mientras que hPL 7.5 % alcanzó valores cercanos a  $5.61 \times 10^8$  células y hPL 10 % mostró el mayor rendimiento con  $7.05 \times 10^8$  células viables.

El análisis estadístico confirmó diferencias significativas entre SFB 10 % y ambas concentraciones de hPL (\*\*p < 0.01), mientras que no se observaron diferencias significativas entre hPL 7.5 % y hPL 10 %. Estos resultados indican que la suplementación con hPL mejora de manera significativa la expansión celular en comparación con el suero fetal bovino, independientemente de que se utilice al 7.5 % o al 10 %.

Estos hallazgos son consistentes con lo descrito en la literatura, donde se ha demostrado que el hPL contiene concentraciones elevadas de factores de crecimiento derivados de plaquetas, como PDGF, TGF- $\beta$ , EGF y FGF, los cuales estimulan la proliferación de células mesenquimales de forma más eficiente que el SFB (Schallmoser & Strunk, 2009; Burnouf et al., 2016). Estudios previos también han reportado que el uso de hPL puede incrementar significativamente la tasa de expansión celular en comparación con medios suplementados con suero fetal bovino (Fekete et al., 2012; Bieback, 2013), lo cual concuerda con el aumento superior al doble observado en este estudio al utilizar hPL 7.5 %.

Durante el seguimiento morfológico, las células cultivadas en hPL presentaron una morfología fibroblastoide más compacta y un tamaño ligeramente menor en comparación con aquellas mantenidas en SFB. Este comportamiento podría favorecer una mayor densidad celular antes de alcanzar confluencia, contribuyendo al incremento del rendimiento total. La literatura ha descrito que el cultivo con hPL se asocia con un fenotipo proliferativo más activo y una morfología más homogénea en comparación con FBS (Bieback, 2013).

Desde una perspectiva operativa y de escalamiento, el uso de hPL al 7.5 % representa una opción particularmente atractiva en términos de costo–beneficio. Dado que no se observaron diferencias estadísticas en el rendimiento celular entre 7.5 % y 10 %, la concentración menor permite la preparación de un mayor volumen de medio por unidad de suplemento, optimizando recursos sin comprometer la eficiencia proliferativa. Esta característica resulta relevante para entornos productivos o empresariales enfocados en la expansión celular a mayor escala, donde la sostenibilidad del proceso y la reducción de costos por lote son factores estratégicos.

Adicionalmente, el hPL constituye una alternativa xeno-free, disminuyendo los riesgos asociados al uso de productos de origen animal, como la variabilidad entre lotes y la posible presencia de contaminantes zoonóticos (Burnouf et al., 2016). Esto refuerza su pertinencia en protocolos orientados a aplicaciones clínicas y terapéuticas.

En conjunto, los resultados respaldan la superioridad proliferativa del hPL frente al SFB en el cultivo de hMSC derivadas de cordón umbilical, demostrando un aumento significativo en el rendimiento celular y posicionando la concentración de 7.5 % como una alternativa eficiente y estratégicamente favorable.

### **5.3 Viabilidad celular de hMSC bajo diferentes condiciones de suplementación**

Se observó que las hMSC cultivadas en medios suplementados con SFB 10 %, hPL 7.5 % y hPL 10 % mantuvieron una viabilidad promedio superior al 97 % en todas las condiciones evaluadas. El análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que la sustitución de SFB por hPL no compromete la integridad celular ni la supervivencia durante la expansión *in vitro*.

Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura, donde se ha descrito que el lisado plaquetario humano mantiene niveles de viabilidad comparables a los obtenidos con suero fetal bovino durante el cultivo de células mesenquimales (Schallmoser & Strunk, 2009; Bieback, 2013). Asimismo, se ha señalado que el hPL no solo favorece la proliferación, sino que también preserva la estabilidad celular y la viabilidad a lo largo de cultivos prolongados (Burnouf et al., 2016).

El hecho de no haberse identificado diferencias significativas entre las concentraciones de hPL evaluadas (7.5 % y 10 %) sugiere que concentraciones intermedias son suficientes para mantener condiciones óptimas de supervivencia celular. Esto resulta relevante desde una perspectiva de optimización de recursos, ya que permite reducir el consumo de suplemento sin afectar la calidad biológica del cultivo.

En conjunto, los hallazgos del presente estudio indican que el hPL constituye una alternativa segura y eficaz al SFB, permitiendo incrementar el rendimiento celular, como se evidenció previamente, sin comprometer la viabilidad de las hMSC derivadas de cordón umbilical.

### **5.4 Tasa de duplicación poblacional de hMSC según medio de cultivo**

Se evaluó la tasa de duplicación poblacional diaria de hMSC cultivadas en medios suplementados con SFB 10 %, hPL 7.5 % y hPL 10 %, calculada a partir de la relación logarítmica entre el número de células cosechadas y el número de células inicialmente sembradas, normalizada por el número de días en cultivo. Esta metodología permitió determinar cuántas veces la población celular se duplicó por día bajo cada condición experimental.

Los resultados evidenciaron que las células cultivadas en hPL presentaron una mayor duplicación poblacional por día en comparación con aquellas cultivadas en SFB. En particular, la condición hPL 7.5 % mostró valores significativamente superiores a SFB 10 % (\* $p < 0.05$ ), indicando que bajo suplementación con lisado plaquetario humano la población celular se duplicó más veces por unidad de tiempo. En términos prácticos, valores cercanos a 0.9 duplicaciones por día indican que casi la totalidad de la población celular generó una nueva célula en un período aproximado de 24 horas, mientras que valores alrededor de 0.6 en SFB reflejan una cinética proliferativa más lenta.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre SFB 10 % y hPL 10 %, ni entre ambas concentraciones de hPL; sin embargo, debe considerarse que la condición hPL 10 % contó con un único dato experimental, lo que limita la potencia estadística para detectar diferencias en esta comparación.

Estos hallazgos demuestran que el hPL no solo incrementa el rendimiento celular final, sino que, además, favorece una mayor tasa de duplicación poblacional diaria. Este comportamiento explica coherentemente el aumento significativo en el número total de células cosechadas bajo condiciones con hPL, ya que una mayor frecuencia de duplicación por día se traduce directamente en una expansión exponencial más eficiente.

La literatura ha descrito consistentemente que el hPL estimula la proliferación de MSC mediante la acción combinada de factores de crecimiento derivados de plaquetas, favoreciendo una expansión celular más robusta en comparación con el SFB (Fekete et al., 2012; Bieback, 2013; Burnouf et al., 2016). Los resultados de este estudio concuerdan con estos reportes, evidenciando que el hPL promueve una mayor tasa de duplicación poblacional sin comprometer la viabilidad celular previamente demostrada.

En conjunto, los datos sugieren que la suplementación con hPL optimiza tanto la cinética proliferativa como el rendimiento global del cultivo de hMSC derivadas de cordón umbilical, consolidándose como una alternativa eficiente frente al uso de suero fetal bovino.

### **5.5 Rendimiento celular (Yield) de hMSC según medio de cultivo**

Se evidenció que el rendimiento celular, expresado como células/cm<sup>2</sup>, fue significativamente mayor en los cultivos suplementados con lisado plaquetario humano en comparación con SFB 10 %. El análisis estadístico confirmó diferencias altamente significativas entre SFB y ambas concentraciones de hPL (\*\*p < 0.01), mientras que no se observaron diferencias significativas entre hPL 7.5 % y hPL 10 %.

Este incremento en el rendimiento celular es coherente con la mayor tasa de duplicación poblacional diaria observada bajo suplementación con hPL. Dado que las células en hPL se duplicaron más veces por día en comparación con SFB, la expansión exponencial acumulativa fue mayor, lo que se tradujo en un número final superior de células por unidad de superficie. Por tanto, el aumento del *yield* no responde a un fenómeno aislado, sino a una cinética proliferativa más eficiente bajo condiciones con lisado plaquetario humano.

Es importante destacar que la viabilidad celular se mantuvo elevada y comparable entre todas las condiciones evaluadas, lo que indica que el incremento en la expansión celular con hPL no ocurrió a expensas de la integridad o estabilidad celular. Esta combinación de alta viabilidad y mayor duplicación diaria refuerza la robustez biológica del suplemento humano.

Desde el punto de vista mecanístico, el hPL contiene concentraciones elevadas de factores de crecimiento derivados de plaquetas, como PDGF, TGF- $\beta$ , FGF y EGF, los cuales promueven proliferación y supervivencia celular (Burnouf et al., 2016). Diversos estudios han demostrado que el hPL favorece una expansión más eficiente de células mesenquimales

en comparación con SFB (Fekete et al., 2012; Bieback, 2013), hallazgo que concuerda con los resultados observados en el presente estudio.

El hecho de no encontrarse diferencias significativas entre hPL 7.5 % y hPL 10 % sugiere que concentraciones intermedias son suficientes para maximizar la eficiencia de expansión celular. Desde una perspectiva operativa y de escalamiento, esto tiene implicaciones importantes, ya que permite optimizar el uso del suplemento y producir mayores volúmenes de medio de cultivo por unidad de hPL, sin comprometer el rendimiento celular. Esta consideración resulta especialmente relevante en contextos productivos o empresariales enfocados en expansión celular a mayor escala.

Adicionalmente, desde el punto de vista clínico y regulatorio, el uso de hPL representa una alternativa más adecuada frente al suero fetal bovino. El SFB es un suplemento xenogénico y puede asociarse a riesgos potenciales de transmisión de agentes zoonóticos, reacciones inmunológicas y variabilidad entre lotes (Bieback, 2013; Burnouf et al., 2016). En contraste, el lisado plaquetario humano es de origen humano (allogénico), lo que favorece una mayor compatibilidad biológica y facilita la transición hacia protocolos libres de componentes animales (xeno-free), requisito fundamental en procesos bajo estándares GMP para aplicaciones en medicina regenerativa (Schallmoser & Strunk, 2009).

En conjunto, los resultados confirman que el hPL no solo mantiene la viabilidad celular, sino que incrementa significativamente la tasa de duplicación poblacional y el rendimiento final por unidad de superficie, consolidándose como una alternativa funcional, eficiente y clínicamente relevante para la expansión de hMSC derivadas de cordón umbilical.

# **CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 6.1 Conclusiones

Este estudio permitió estandarizar y comparar métodos de aislamiento y condiciones de cultivo para la obtención y expansión *in vitro* de células madre mesenquimales humanas derivadas de cordón umbilical, cumpliendo con el objetivo general planteado.

En relación con los métodos de aislamiento, tanto la digestión enzimática con colagenasa NB4 como el Umbilical Cord Dissociation Kit, human de Miltenyi Biotec permitieron la obtención exitosa de hMSC con morfología fibroblastoide, comportamiento adherente y crecimiento en monocapa característicos del fenotipo mesenquimal. No obstante, el kit comercial mostró mayor estandarización del procedimiento y una recuperación celular más homogénea, lo que representa una ventaja en términos de reproducibilidad y control técnico. Por su parte, la digestión enzimática convencional demostró ser un método viable y funcional, aunque potencialmente más dependiente de la variabilidad operativa.

En cuanto a las condiciones de cultivo, todas las condiciones evaluadas mantuvieron porcentajes de viabilidad superiores al 97 %, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo que demuestra que la sustitución del suero fetal bovino (SFB 10 %) por lisado plaquetario humano (hPL 7.5 % y 10 %) no compromete la supervivencia celular durante la expansión *in vitro*.

Respecto a la duplicación poblacional diaria, se observó una diferencia significativa entre SFB 10 % y hPL 7.5 %, evidenciándose una mayor tasa de duplicación bajo la condición suplementada con hPL 7.5 %. No se identificaron diferencias significativas entre SFB 10 % y hPL 10 %, ni entre ambas concentraciones de hPL; sin embargo, la condición hPL 7.5 % mostró el comportamiento proliferativo más consistente y eficiente. En contraste con SFB, tanto el rendimiento celular total como el *yield* (células/cm<sup>2</sup>) fueron significativamente mayores en las condiciones suplementadas con hPL ( $p < 0.01$ ), lo que demuestra que el hPL mejora la eficiencia global de expansión celular, permitiendo obtener un mayor número de células viables por unidad de superficie.

La integración de los resultados indica que el incremento en rendimiento observado con hPL está asociado a una mayor tasa de duplicación poblacional diaria y a una expansión acumulativa más eficiente, sin comprometer la viabilidad ni las características morfológicas celulares. Entre las concentraciones evaluadas, el hPL al 7.5 % se posiciona como la condición con mejor desempeño global, al no mostrar diferencias significativas respecto al 10 %, pero permitiendo una optimización en el uso del suplemento.

Desde una perspectiva traslacional y regulatoria, el uso de lisado plaquetario humano representa una alternativa más adecuada para aplicaciones clínicas, al tratarse de un suplemento de origen humano que reduce los riesgos asociados al uso de componentes xenogénicos como el suero fetal bovino y facilita la implementación de protocolos alineados con estándares de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP).

Finalmente, es importante señalar que el número de réplicas experimentales fue limitado tanto en algunas condiciones de cultivo, particularmente en hPL 10 %, como en la comparación entre los métodos de aislamiento evaluados. Esta situación puede influir en la robustez estadística de ciertas comparaciones y en la extrapolación de los resultados. Por ello,

futuros estudios con un mayor número de muestras biológicas y replicaciones técnicas permitirán fortalecer la evidencia y consolidar las diferencias observadas entre la digestión enzimática con colagenasa NB4 y el Umbilical Cord Dissociation Kit, así como entre las distintas concentraciones de suplementos evaluadas. No obstante, con los datos obtenidos en este estudio se logró demostrar de manera consistente la viabilidad de ambos métodos de aislamiento y la superioridad funcional del lisado plaquetario humano, particularmente en la concentración del 7.5 %, como estrategia eficiente y clínicamente pertinente para la expansión de hMSC derivadas de cordón umbilical.

## **6.2 Recomendaciones**

### **1. Ampliación del registro y sistematización de datos de aislamiento celular**

Se recomienda establecer una base de datos estructurada que incluya información detallada sobre los procesos de aislamiento de hMSC, particularmente aquellos realizados mediante el uso del kit de separación celular de Miltenyi Biotec. La recopilación sistemática de variables como rendimiento inicial, viabilidad post-aislamiento, tiempo hasta primera expansión y variabilidad entre donantes permitirá identificar patrones de eficiencia y optimizar el protocolo de obtención celular.

### **2. Caracterización inmunofenotípica completa mediante citometría de flujo**

Se recomienda incorporar de forma rutinaria la fenotipificación de las hMSC mediante citometría de flujo, evaluando marcadores positivos (CD73, CD90, CD105) y negativos (CD34, CD45, HLA-DR), conforme a los criterios internacionales establecidos para MSC. Asimismo, se sugiere incluir análisis de tamaño celular (FSC), complejidad interna (SSC) y homogeneidad poblacional, con el fin de correlacionar parámetros morfológicos con rendimiento y capacidad proliferativa.

### **3. Evaluación comparativa ampliada de concentraciones de hPL**

Dado que no se observaron diferencias significativas entre hPL 7.5 % y 10 % en *yield*, se recomienda evaluar concentraciones adicionales (5 %, 6 %, 8 %) para determinar la concentración mínima efectiva que mantenga altos niveles de expansión celular. Esto permitiría optimizar costos de producción y estandarizar protocolos bajo criterios de eficiencia económica y técnica.

### **4. Análisis longitudinal del rendimiento celular (*Yield*)**

Se sugiere realizar estudios longitudinales que evalúen el *yield* en múltiples pasajes celulares, permitiendo determinar si el efecto proliferativo del hPL se mantiene estable en cultivos prolongados o si existen cambios asociados a senescencia celular. Este análisis fortalecería la validación del suplemento en contextos de producción celular a gran escala.

## **5. Evaluación funcional ampliada**

Se recomienda incluir estudios de:

- Capacidad de diferenciación trilineal (condrogénesis, adipogénesis y osteogénesis).
- Análisis del ciclo celular por citometría.
- Expresión de genes asociados a proliferación y senescencia.
- Estudios de estabilidad genética en pasajes tardíos.

Esto permitirá confirmar que el aumento en rendimiento no compromete la calidad biológica del producto celular.

## **6. Análisis comparativo bajo criterios regulatorios y GMP**

Se recomienda realizar un análisis integral comparando el uso de SFB y hPL bajo criterios regulatorios, considerando:

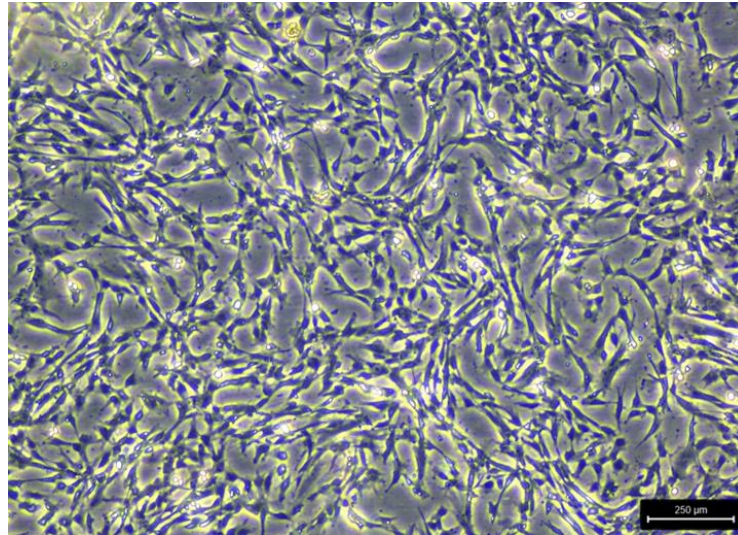
- Riesgo de transmisión zoonótica asociado al SFB.
- Variabilidad lote a lote.
- Trazabilidad del suplemento.
- Compatibilidad con producción bajo estándares GMP.

Este análisis permitirá respaldar decisiones estratégicas para la transición hacia protocolos completamente xeno-free, fortaleciendo la proyección clínica de la empresa.

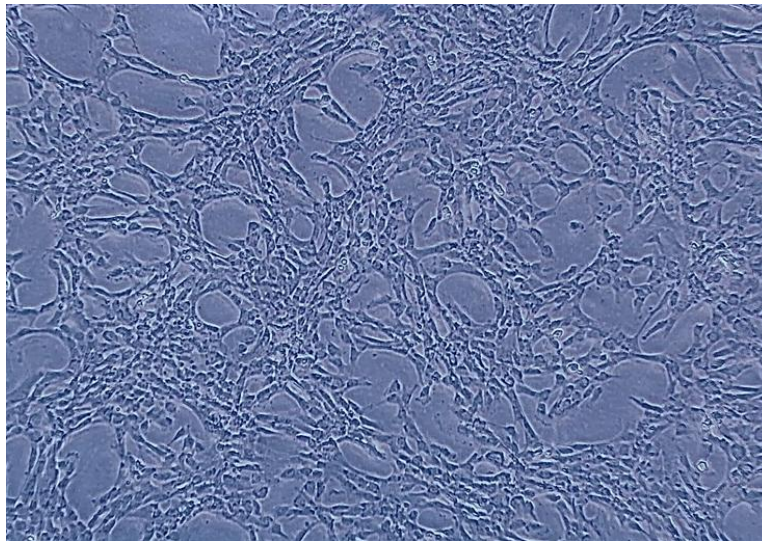
## **7. Expansión del tamaño muestral y variabilidad biológica**

Se recomienda aumentar el número de donantes incluidos en futuros estudios, con el fin de evaluar la consistencia del rendimiento celular y reducir posibles sesgos asociados a variabilidad interindividual.

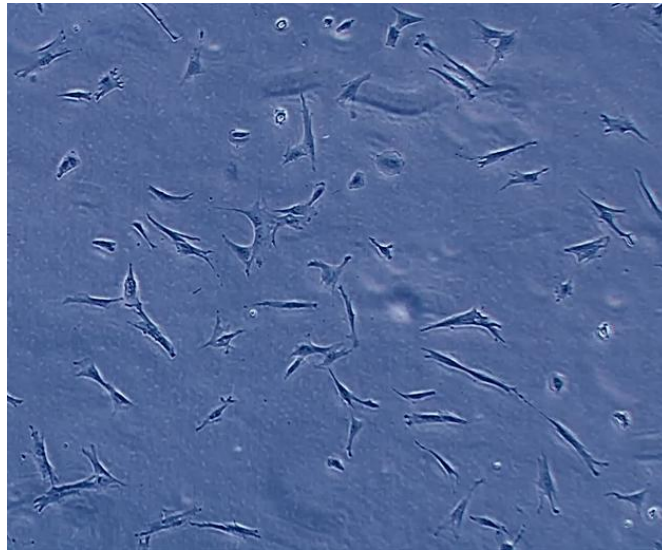
# **ANEXO**



**Figura 6. Morfología de hMSC cultivadas en medio suplementado con hPL 7.5 %** Microfotografía representativa de hMSC derivadas de cordón umbilical en pasaje 5 (P5), cultivadas a una densidad de 7,000 células/cm<sup>2</sup> en medio suplementado con lisado plaquetario humano al 7.5 %. Las células presentan morfología fibroblastoide característica, con patrón fusiforme y crecimiento adherente en disposición paralela y en remolinos. Se observa una confluencia elevada y distribución homogénea sin evidencia de alteraciones morfológicas. Barra de escala: 250 µm



**Figura 7. Morfología comparativa de hMSC cultivadas en hPL 10 %** Microfotografía representativa de hMSC derivadas de cordón umbilical cultivadas en medio suplementado con lisado plaquetario humano al 10 %. Las células muestran morfología fibroblastoide característica, con patrón fusiforme elongado, crecimiento adherente y elevada confluencia. Se observa disposición celular organizada en estructuras paralelas y en remolinos, indicativa de alta actividad proliferativa y expansión homogénea del cultivo.



**Figura 8. Morfología comparativa de hMSC cultivadas en SFB 10 %.** Microfotografía representativa de hMSC cultivadas en medio suplementado con suero fetal bovino al 10 %. Se observa morfología fibroblastoide conservada; sin embargo, la densidad celular es menor y las células presentan mayor separación intercelular, compatible con una tasa proliferativa inferior en comparación con hPL 10 %.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., & Caplan, A. I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative Medicine*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M. B. C., & Schallmoser, K. (2016). Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 76, 371–387. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.065>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
- Salehinejad, P., Alitheen, N. B., Mandegary, A., Nematollahi-Mahani, S. N., Janzamin, E., & Omid, Y. (2020). Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord tissue. *Cell and Tissue Banking*, 21, 49–61. <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09805-0>
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells — current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2), e00191. <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- Células madre/estromales mesenquimales. Su potencial terapéutico en medicina. (2020). *Medicina (Buenos Aires)*, 80(Supl. IX), 696–707. [https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0025-76802020000900696](https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802020000900696)
- Sanchez-Guijo, F., et al. (2024). A GMP-compliant manufacturing method for Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 15, Article 82. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11069138/>
- Bieback, K., & Brinkmann, I. (2010). Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World Journal of Stem Cells*, 2(4), 81–92. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3032644/>
- Sensebé, L., Bourin, P., & Tarte, K. (2011). Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Human Gene Therapy*, 22(1), 19–26. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3035367/>
- El Omar, R., et al. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 20(5), 523–544.
- Davies, J. E., et al. (2017). Isolation and expansion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. *Methods in Molecular Biology*, 1553, 29–41.
- Zheng, S., et al. (2022). Efficient isolation approach for Wharton’s jelly mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 31, 9636897221106785.

- Schallmoser, K., & Strunk, D. (2009). Preparation of pooled human platelet lysate (pHPL) as an efficient supplement for animal serum-free human stem cell cultures. *Journal of Visualized Experiments*, 32, 1523. doi:10.3791/1523
- Fekete, N., Gadelorge, M., Fürst, D., et al. (2012). Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 52(6), 1216–1227. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03427.x
- Bieback, K. (2013). Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 40(5), 326–335. doi:10.1159/000354061
- Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016;76:371–387. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.065
- Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(5):326–335.
- Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016; 76:371–387.
- Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, et al. Platelet lysate from pooled platelet concentrates for the isolation and expansion of human MSC. *Transfusion*. 2012;52(6):1216–1227.
- Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(5):326–335.
- Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016; 76:371–387.
- Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, et al. Platelet lysate from pooled platelet concentrates for the isolation and expansion of human MSC. *Transfusion*. 2012;52(6):1216–1227.
- Schallmoser K, Strunk D. Preparation of pooled human platelet lysate as an efficient supplement for animal serum-free human stem cell cultures. *J Vis Exp*. 2009;(32):1523.