



PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900211974

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

Secreción de TGF- β 3 por células madre mesenquimáticas y su aplicación en ingeniería de tejidos

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Rodrigo Somoza Palacios

Profesor Guía: Dr. Manuel Young Anze

Co-Tutor: Dra. Caroline Weinstein Oppenheimer

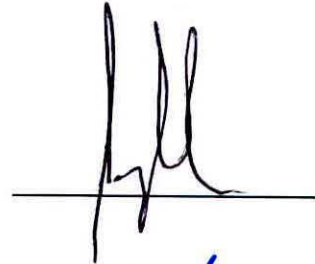
Julio 2012

Valparaíso-Chile

U.T.F.S.M.
BIBLIOTECAS

COMISIÓN EVALUADORA INTEGRADA POR

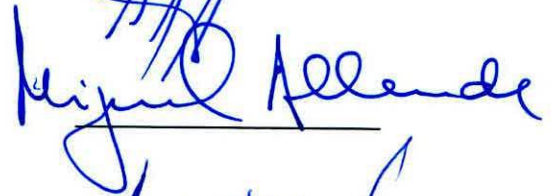
DR.: Sergio Marshall González

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized initials 'SMG', positioned above a horizontal line.

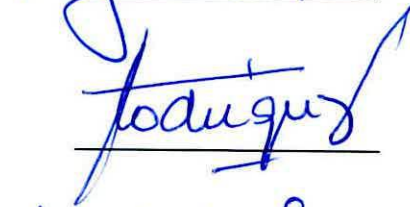
DR.: Sergio Almonacid Merino

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials 'SAM', positioned above a horizontal line.

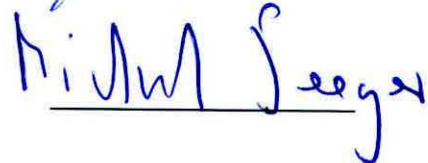
DR.: Miguel Allende Connelly

A handwritten signature in blue ink, reading 'Miguel Allende', positioned above a horizontal line.

DR.: Juan Pablo Rodríguez Vives

A handwritten signature in blue ink, reading 'Rodríguez', positioned above a horizontal line.

DR.: Michael Seeger Pfeiffer

A handwritten signature in blue ink, reading 'Michael Seeger', positioned above a horizontal line.

RESUMEN

Se estima que cada año millones de personas en el mundo quedan con cicatrices en la piel después de algún trauma o enfermedades degenerativas. La ingeniería de tejidos ha permitido el desarrollo de estrategias donde las metodologías de curación tradicionales no permiten una buena recuperación de los tejidos. Estas se basan principalmente en el desarrollo de sustitutos de piel usando matrices y células, que luego de producido el daño, son implantados.

Uno de los modelos celulares más utilizados son las células madre mesenquimáticas (MSC), cuyo potencial terapéutico es muy grande debido a su capacidad de diferenciación multipotente, facilidad de aislamiento desde múltiples tejidos adultos y secreción de factores de crecimiento (FC). Esta actividad trófica de MSC ha emergido como la principal actividad terapéutica de MSC cuando son implantadas. Estas observaciones, en conjunto con otras, han permitido dilucidar el nicho *in vivo* de MSC como pericitos, participando en procesos de homeostasis y reparación de tejidos vascularizados. MSC secretan una gran variedad de citoquinas y factores de crecimiento que median procesos anti-apoptóticos, angiogénicos, inmunoregulatorios y regenerativos, entre otros. Dentro de estos FC, algunos han sido descritos ser importantes en aproximaciones de ingeniería de tejidos, tales como bFGF, VEGF, PDGF, HGF. Sin embargo, hasta lo que sabemos, no se ha descrito la secreción de TGF- β 3 por MSC. TGF- β 3 juega un rol clave en la regeneración y calidad de la reparación tisular sin la generación de cicatriz. Como MSC son consideradas pericitos, orquestando procesos de reparación en tejidos vascularizados, se ha propuesto que estas son activadas mediante señales de daño indeterminadas hacia una célula medicinal, la cual producirá moléculas bioactivas en el sitio de la herida. Las condiciones que producen la activación específica de MSC son importantes de investigar. Estos factores de activación de MSC han sido descritos *in vivo* e *in vitro* como señales de daño provistas por el tejido dañado.

Probablemente estas señales de activación son factores solubles indeterminados, sin embargo las señales producidas por fuerzas mecánicas, mediadas por mecanotransducción, podrían tener un efecto en la activación de un fenotipo medicinal de MSC, tal como tienen un efecto en la diferenciación de MSC.

En este contexto, se plantea la hipótesis que poblaciones seleccionadas de MSC aisladas de tejidos dentales en condiciones de cultivo en tres dimensiones (3D), secretan TGF- β 3 en cantidades mayores que en la condición de cultivo en monocapa. De este modo, el objetivo principal de esta tesis será establecer las condiciones de cultivo que proporcionen las señales necesarias que induzcan a MSC adquirir un fenotipo de célula sobre-secretora de TGF- β 3. Esto permitiría tener una fuente estable de

producción de este factor pro-regenerativo para ser usada junto con tecnologías de sustitutos de piel desarrollados o por desarrollar.

Para lograr este objetivo se aislaron MSC a partir de tejidos dentales, obteniéndose células con una alta capacidad proliferativa y de diferenciación a partir de la papila periapical de la raíz (PRPC). Estas células se cultivaron en tres tipos de matrices (alginato, fibrina y polímero a base de quitosano/gelatina/ácido hialurónico y fibrina)

La fibrina es una matriz bioactiva para las células, esta contiene señales específicas, como la secuencia RGD, que las células reconocen, especialmente mediante integrinas. En contraste, el alginato es una matriz que no contiene este tipo de señalización, por lo tanto no provee de un ambiente químico adecuado para las células para que estas desempeñen funciones avanzadas mediadas por la interacción con la matriz. La comparación de la secreción de TGF- β 3 por células cultivadas en estas tres condiciones, nos permitió identificar que el proceso de encapsulación provocó el cambio en la secreción, más que la diferente composición química de la matriz, mientras que los cultivos en monocapa mostraron casi 10 veces menos secreción de TGF- β 3. Estos resultados muestran que las fuerzas mecánicas, junto con cambios en la dinámica de interacción entre la célula y la matriz, pueden ser señales que activan a MSC hacia un fenotipo medicinal.

El estudio de estas interacciones se espera sea uno de los pilares en el diseño de futuras estrategias en ingeniería de tejidos y terapia celular, que sean más eficientes y efectivas en la reparación/regeneración de tejidos dañados

ABSTRACT

It is estimated that every year, millions of people worldwide are left with skin scars after damage caused by trauma or degenerative diseases. Tissue engineering has enabled the development of strategies where traditional healing methods do not allow proper healing of tissues. These are based mainly on the development of skin substitutes using scaffolds and cells, which after the damage, are implanted. One of the most widely used cell models are mesenchymal stem cells (MSC), which have great therapeutic potential because of their multi-lineage differentiation capacity, ease of isolation from multiple adult tissues and secretion of growth factors. This trophic activity of MSC has emerged as the main therapeutic activity of MSC when implanted. These findings among others, have allowed elucidate a perivascular *in vivo* niche of MSC as pericytes, participating in processes of homeostasis and repair of vascularized tissues. MSC secrete a great variety of cytokines and growth factors that mediate anti-apoptotic, angiogenic, immunoregulatory and anti-scarring processes, along with others. Among these secreted factors, a few have been described important in tissue engineering approaches such as bFGF, VEGF, PDGF, HGF. Nevertheless, as far as we know, it has not been described the secretion of TGF- β 3 by MSC. TGF- β 3 plays a key role in tissue regeneration and better quality repair without scar tissue generation. As MSC are considered pericytes, orchestrating repair process in vascularized tissues, it has been proposed that they are activated by indeterminate injury signal towards a medicinal cell that will produce bioactive molecules in the site of the wound. The conditions that produce the specific activation of MSC are important to investigate. These activation factors of MSC have been described *in vivo* and *in vitro* as injury signals provided by damaged tissue. Probably these activation signals of MSC are indeterminate soluble or ECM derived factors; however, signals produced by mechanical forces, mediated by mechanotransduction, might have an effect on the activation of a medicinal phenotype of MSC, just as they have on MSC differentiation.

Within this context, raises de hypothesis that selected populations of MSC isolated from dental tissues, in tridimensional culture conditions (3D), secrete TGF- β 3 in larger amounts than in the monolayer culture condition. The main objective of this work was to establish the culture conditions providing the necessary signals that can induce MSC to acquire a TGF- β 3 over-secretory phenotype. This would allow for a stable source of production of this pro-regenerative factor, to be used in conjunction with skin substitute technologies developed or developing.

To achieve this goal, MSC were isolated from dental tissues, yielding cells with high proliferative capacity and differentiation from the periapical root papilla (PRPC). These cells were culture in three different types of scaffolds (alginate, fibrin and a gelatin/chitosan/hyaluronic/fibrin based scaffold).

Fibrin is a bioactive scaffold for cells as it contains specific signals molecules, such RGD sequence, that cells recognize, especially by integrins. In contrast, alginate is a scaffold that does not contain this type of signals; therefore it does not provide an adequate chemical environment for cells to exert advance functions mediated by interactions with the matrix. Comparison of the secretion of TGF- β 3 by cells in these three conditions allowed as identifying that the encapsulation process provoked the change in secretion, rather than the different chemical composition of the scaffolds, while monolayer cultures showed almost 10 fold less secretion of TGF- β 3. These result shows that mechanical forces along with dynamics of cell-matrix interaction can be signals that activate MSC cell phenotype to a medicinal cell.

The study of these interactions is expected as one of the pillars in designing future strategies in tissue engineering and cell therapy that are more efficient and effective in the repair/regeneration of damaged tissues.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa, Marisel, por su cariño y apoyo incondicional, sin el cual no hubiera sido posible emprender este proceso. A mis bebés, Nicolás y Sofía, por darme la fuerza y la razón para buscar siempre mi auto-superación.

A Don Manuel por darme la oportunidad de trabajar junto a su grupo de investigación, por darme la guía, el apoyo y la confianza para realizar este trabajo.

A la Dra. Caroline Weinstein por su guía y consejos, por apoyar mis ideas y darme la oportunidad de crecer en mis aptitudes científicas y docentes.

A Yusser por sus buenos consejos, ayuda y apoyo durante todo este proceso.

A Cristian, quien también fue parte importante como guía para el desarrollo de esta tesis.

A Fernando, Elizabeth, Patricio, Angélica, María Isabel y a todos en el Centro de Biotecnología por su ayuda y además hacerme sentir parte de este grupo extraordinario de personas, gracias a todos por los buenos momentos que pasamos en estos 4 años de trabajo.

A Ricardo y Miguel por su gran ayuda y asistencia en la realización de este trabajo.

Agradezco mucho la ayuda del Dr. Maximo Hernandez y a Megasalud por permitirme obtener las piezas dentales que me sirvieron de materia prima para realizar esta tesis.

Quisiera también agradecer a Conicyt por el financiamiento recibido a través de la beca de doctorado, como también al programa Mecesus por el financiamiento para la pasantía que realice en Alemania.

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
INDICE GENERAL	vii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
1. Ingeniería de Tejidos	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. Matrices e inmovilización celular	5
1.1 Tipos de matrices	6
1.1.1 Colágeno	6
1.1.2 Gelatina	9
1.1.3 Quitosano	7
1.1.4 Alginato	7
1.1.5 Fibrina	8
2. Células utilizadas en ingeniería de tejidos	9
3. Factores de crecimiento involucrados en la reparación de heridas	9
4. TGF- β 3	10
4.1 TGF- β 3 como un agente anti-cicatriz	15
5. Tratamiento de heridas con factores de crecimiento	16
6. Células madre	18
6.1 Células madre mesenquimáticas (MSC)	19
6.2 MSC derivadas de tejidos dentales	21
6.3 Aislamiento de MSC desde tejidos dentales	22
6.4 MSC en ingeniería de tejidos y el tratamiento de heridas	23
7. MSC y producción de factores de crecimiento	25
HIPOTESIS	28
OBJETIVOS	28
ESQUEMA EXPERIMENTAL	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. Cultivo celulares	30

1.1 Ligamento periodontal	30
1.2 Folículo periapical de la raíz	31
1.3 Encía	31
2. Separación inmuno-magnética de sub-poblaciones celulares	31
3. Caracterización de los cultivos	33
3.1 Diferenciación al linaje adipogénico	34
3.1.1 Tinción con Oil Red O	34
3.2 Diferenciación al linaje osteogénico	34
3.2.1 Tinción con Alizarín Red	34
3.3 Diferenciación al linaje condrogénico	35
3.3.1 Tinción con Safranina O	35
3.4 Diferenciación neural	35
3.5 Proliferación y viabilidad celular	36
3.5.1 Exclusión de azul de tripan	36
3.5.2 Ensayo colorimétrico WST-1	36
3.5.3 Ensayo live/dead	37
3.6 Citometría de flujo	37
3.7 Inmuno-citofluorescencia	38
4. Cultivo en matrices 3D	38
4.1 En fibrina	38
4.2 En alginato	39
4.3 Cultivo en Sistema de Implante Integrado (SII)	39
5. Obtención de medio condicionado	40
6. Determinación del consumo de glucosa	40
7. Determinación de la producción de lactato	41
8. Activación de TGF-β3	4
9. Determinación de TGFβ3 activo mediante Dot-blot	41
10. ELISA	42
11. Extracción de RNA	43
11.1 Desde monocapa	43
11.2 Extracción de RNA desde fibrina, alginato y polímero	43
11.2 Cuantificación de RNA	44
12. Transcripción reversa	44
13. Diseño y síntesis de partidores	44
14. PCR convencional	44
15. PCR Tiempo Real	45
16. Electroforesis en agarosa	47
17. Análisis estadístico	47
18. Análisis de componentes principales	47
RESULTADOS	49
1. Obtención de cultivos celulares a partir de tejidos dentales	49
2. Separación Inmuno-magnética	50
3. Caracterización de los cultivos obtenidos mediante separación inmuno-magnética	52
3.1 Morfología	52
3.2 Proliferación	54
3.3 Diferenciación a linajes mesenquimáticas	55
4. Determinación de la secreción de TGF-β3 por PRPC-MSC cultivadas en condición de monocapa	59
5. Encapsulación celular	61

5.1 Encapsulación en alginato	62
5.2 Encapsulación en fibrina	63
5.3 Cultivo de PRPC-MSC en SII	64
6. Proliferación de PRPC-MSC cultivadas en condiciones 3D	66
7. Determinación del consumo de glucosa y la producción de lactato de PRPC-MSC cultivadas en las condiciones 3D	67
8. Secreción de TGF-β3 por PRPC-MSC cultivadas en las condiciones 3D	69
9. Expresión génica de TGF-β3 y otros factores de crecimiento	70
10. Análisis de componentes principales	72
DISCUSIÓN	77
1. Tejidos dentales como fuente de células madre mesenquimáticas	77
2. Secreción de TGF-β3 por PRPC-MSC cultivadas en monocapa	80
3. Inducción del fenotipo: células secretoras de TGF-β3	83
3.1 Encapsulación en Alginato	85
3.2 Encapsulación en Fibrina	87
3.3 Cultivo de PRPC-MSC en el SII	89
3.4 Proliferación de PRPC-MSC en matrices	90
3.5 Consumo de glucosa y producción de lactato	91
3.6 Producción de TGF- β 3 por PRPC-MSC en condiciones de cultivo en 3D	93
3.7 Expresión génica de TGF- β 3	97
3.8 Expresión de otros factores de crecimiento	98
3.9 Análisis de componentes principales	100
4. Importancia de TGF-β3 en ingeniería de tejidos	102
CONCLUSIONES	108
ABREVIACIONES	110
BIBLIOGRAFÍA	111
Apéndice I	124
Apéndice II	127
LISTA DE PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES	129

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrategias en ingeniería de tejidos para el tratamiento de una herida.	2
FIGURA 2: Elementos de la ingeniería de tejidos	4
FIGURA 3: Mecanismo de acción de TGF- β	13
FIGURA 4: Estructura de TGF- β	14
FIGURA 5: Tejidos dentales de los cuales se puede aislar MSC	21
FIGURA 6: Principales mecanismos de acción terapéutica de MSC	24
FIGURA 7: Técnica de la separación inmuno-magnética de células	32
FIGURA 8: ELISA sándwich	43
FIGURA 9: Aislamiento de células a partir de diversos tejidos dentales mediante explante	50
FIGURA 10: Separación inmuno-magnética de sub-poblaciones celulares CD105 ⁺ CD271 ⁺	53
FIGURA 11: Morfología de sub-poblaciones positivas y negativas correspondientes al pasaje 0 después del proceso de separación	54
FIGURA 12: Comparación de la capacidad proliferativa entre cultivos de células PRPC y PDLC	55
FIGURA 13: Inducción de la diferenciación adipo-, osteo- y condrogénica de cultivos de PDLC y PRPC CD105 ⁺ CD271 ⁺	57
FIGURA 14: Citometría de flujo de un cultivo de PRPC CD105 ⁺ CD271 ⁺	58
FIGURA 15: Inmuno-citofluorescencia de cultivos de PRPC CD105 ⁺ CD271 ⁺ para evaluar la diferenciación neural	59
FIGURA 16: Inmuno-ensayo Dot-Blot	60
FIGURA 17: Citometría de flujo para determinar presencia de TGF- β 3 intra-celular en células PRPC-MSC cultivadas en monocapa	61
FIGURA 18: Encapsulación de PRPC-MSC en alginato	63
FIGURA 19: Encapsulación de PRPC-MSC en fibrina	65
FIGURA 20: Cultivo de PRPC-MSC en SII	66
FIGURA 21: Proliferación de PRPC-MSC cultivadas en monocapa, fibrina, alginato y SII	67
FIGURA 22: Estado metabólico de PRPC-MSC en las condiciones de cultivo analizadas	68
FIGURA 23: Cuantificación de la secreción de TGF- β 3 por PRPC-MSC en las distintas condiciones de cultivo	70
FIGURA 24: Cuantificación relativa de la expresión de TGF- β 3 por PRPC-MSC mediante RT-PCR en tiempo real en las distintas condiciones de cultivo	71
FIGURA 25: Análisis de correlación de Pearson	73
FIGURA 26: Primer Plano Principal	76
FIGURA 27: Actividad trófica de MSC <i>in vivo</i>	81
FIGURA 28: Modulación del fenotipo final de MSC mediante señales externas	84
FIGURA 29: Representación esquemática de la heterogeneidad estructural de las cápsulas de alginato	86
FIGURA 30: Polimerización de la fibrina	88
FIGURA 31: Modelo de secreción de TGF- β 3 propuesto	103
FIGURA 32: Cicatrices originadas de incisiones 12 meses después de la herida tratadas con TGF- β 3	106

FIGURA SUPLEMENTARIA 1: Resultados preliminares obtenidos mediante el inmuno-ensayo- dot-blot	111
FIGURA SUPLEMENTARIA 2: Cálculo del rendimiento de glucosa en lactato	112
FIGURA SUPLEMENTARIA 3: Proliferación de PRPC-MSC	113

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Factores de crecimiento involucrados activamente en la reparación de heridas en la piel	11
TABLA 2: Partidores utilizados para evaluar la expresión relativa de TGF-β3 mediante RT-PCR en tiempo real	46
TABLA 3: Partidores utilizados para evaluar la expresión de factores de crecimiento importantes en regeneración/reparación de tejidos, mediante RT-PCR convencional	47
TABLA 4: Análisis electroforético de los amplicones generados mediante RT-PCR	47
TABLA 5: Eficiencia del aislamiento de células CD105⁺ CD271⁺ a partir de cultivos celulares heterogéneos aislados desde tejidos dentales	52
TABLA 6: Inducción de la diferenciación adipo-, osteo- y condrogénica de cultivos de PRPC y PDLC CD105⁺ CD271⁺ y CD105⁻ CD271⁻	56
TABLA 7: Expresión de factores de crecimiento en PRPC-MS	72
TABLA 8: Análisis de contrastes entre variables de acuerdo al análisis de componentes principales	74
TABLA 9: Análisis de contribución	75
TABLA 10: Niveles de algunos factores de crecimiento en tejido embrionario y fetal en comparación con tejidos adultos	104
TABLA SUPLEMENTARIA 1. Cálculo del módulo de Thiele determinados a partir de valores reportados máximos	114
TABLA SUPLEMENTARIA 2. Cálculo del módulo de Thiele	115

INTRODUCCIÓN

1. Ingeniería de tejidos

Esta tesis doctoral se inserta en el marco de la ingeniería de tejidos, disciplina que emerge como un campo multidisciplinario en la ingeniería biomédica, y cuyo principal objetivo es lograr la regeneración de nuevo material biológico para reemplazar tejidos y órganos enfermos o dañados. Dentro de esta disciplina, se ha puesto mucho énfasis en la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de heridas producidas por daños físicos y daños asociados a enfermedades. En la actualidad estas estrategias están enfocadas en la búsqueda de una mejor calidad de la reparación del tejido, con este fin se han desarrollado metodologías que involucran trasplante autólogo, alogénico y xenogénico de células en el lugar de la herida o en algunos casos de administración sistémica (Caplan, 2007). Además se han desarrollado implantes de matrices de diversos materiales de origen natural y sintético, usados solos o en combinación con células de diversos orígenes (Figura 1).

Utilizar matrices en combinación con células es la aproximación que ha generado los mejores resultados y es en la cual se basan la mayoría de las estrategias para mejorar la calidad de la reparación del daño tisular. En esta metodología las células son sembradas en la matriz *ex vivo* antes del implante, esperando que con el tiempo las células sinteticen una nueva matriz extracelular (MEC) a medida que la matriz se vaya degradando. Para lograr este objetivo es muy importante que las células estén en un microambiente favorable, en este caso otorgado por la matriz artificial y las señales producidas en el lugar del implante. Es por esto que se han empleado distintos tipos de matrices, que difieren en composición y forma, en combinación con diversos tipos celulares dependiendo de las características de la lesión y el tejido.

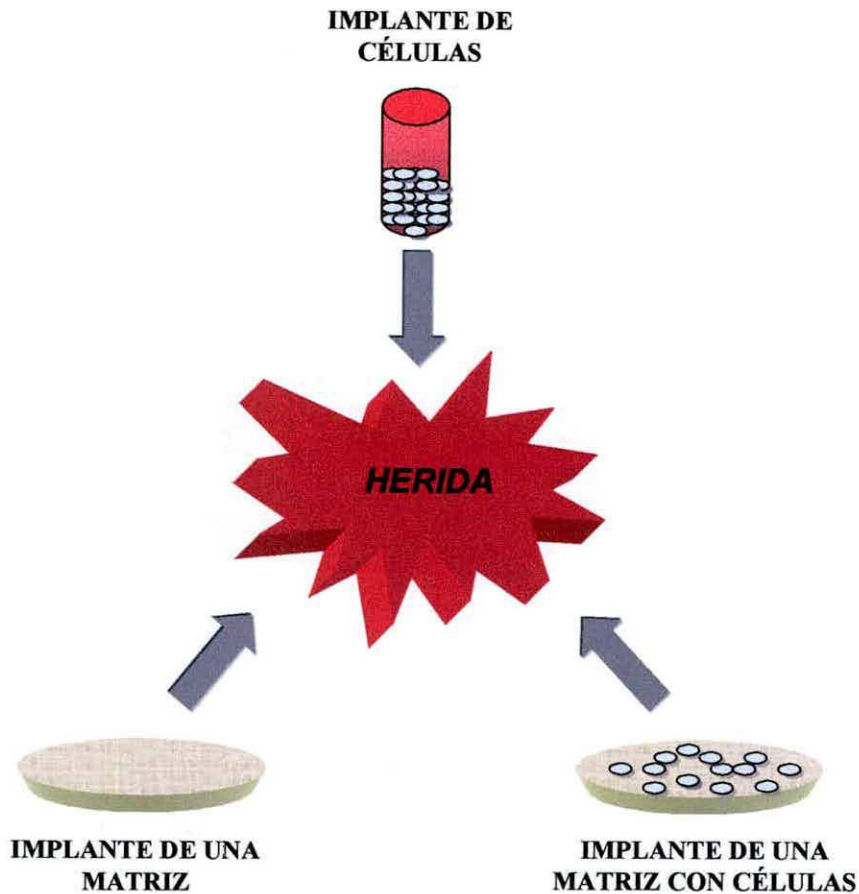


Figura 1. Estrategias en ingeniería de tejidos para el tratamiento de una herida. El daño en el tejido puede repararse implantando células directamente en la herida, implantando una matriz sintetizada a partir de diversos materiales e implantando la matriz con las células cultivadas en ella.

La función de la matriz, sea cual sea su material, es imitar la función de la MEC, es decir, permitir el crecimiento celular y el desarrollo del tejido. La MEC consiste en macromoléculas tejido-específicas que son secretadas por las células para formar una red que funciona como un molde de soporte para darle forma al tejido. Esto permite tener un microambiente organizado donde las células migratorias pueden desplazarse e interactuar entre ellas y con otras células estacionarias del tejido. La interacción célula-matriz también sirve para iniciar y mediar las respuestas que regulan el crecimiento celular, la migración, la diferenciación, la sobrevivencia celular, la organización del tejido y el remodelamiento de la matriz (Peng et al., 2008).

La matriz sintética debe presentar ciertas características, entre las cuales se destacan ser tridimensional (3D), proveer de una barrera con un apropiado flujo de agua y poseer una red porosa interconectada que permita el crecimiento celular y el transporte de nutrientes y desechos celulares. Además, el material de la matriz debe poseer ciertas propiedades de bio-absorción que permitan la correcta adhesión de las células, considerando que estas se adherirán de manera diferente a los distintos materiales de las matrices, de esta manera se activan diferentes vías de señalización que afectarán la proliferación, diferenciación y otras funciones celulares (Caplan, 2007). Por otro lado, la matriz debe ser estéril, no tóxica, producir una mínima actividad inflamatoria y debe incorporarse permitiendo la reparación del tejido de buena calidad cosmética y funcional, además de facilitar la angiogénesis. Finalmente el tratamiento debe tener una relación costo-beneficio que permita la comercialización del producto bajo parámetros productivos actuales (Metcalfé y Ferguson, 2007).

La ingeniería de tejidos de tercera generación considera siempre la incorporación de células al sistema, en particular células madre. Por otro lado se considera el aporte de diversos factores de crecimiento que contribuirán a mejorar la actividad regeneradora, tanto de las células incorporadas en la matriz, como también a las células propias del tejido donde se aplica el implante. Así, la ingeniería de tejidos basada en estos tres componentes biológicos (matriz, células y factores de crecimiento) permitirá la regeneración/reparación de los tejidos de una manera mucho más eficiente (Figura 2).

El marco teórico que se propone en esta tesis dará cuenta de la posibilidad de unificar estos tres elementos de manera óptima y funcional, en particular para la generación de un sistema donde la matriz provea de la señalización adecuada para que células madre mesenquimáticas (MSC) secreten factores de crecimiento. Por esta razón se describirán en primera instancia algunos tipos de matrices utilizadas en ingeniería de tejidos, luego se abordaran los distintos factores de crecimiento cuya funcionalidad es utilizada en ingeniería de tejidos, enfocándose en el factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3) como un agente regenerador de heridas en la piel. Luego se describirán aspectos generales de células utilizadas en ingeniería de tejidos, en especial MSC, que tienen la notable característica de actuar como agentes tróficos, además de poseer un alto potencial de diferenciación. Finalmente se abordará la proyección de emplear estos sistemas en la regeneración de heridas cutáneas, planteando la utilidad que podrían tener los resultados de esta tesis en ingeniería de tejidos.



Figura 2. Elementos de la ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos combina 3 elementos fundamentales: células con capacidad mitótica y de diferenciación, en especial células madre; matrices que imiten la función de la MEC y factores de crecimiento que permitan una correcta funcionalidad celular hacia la regeneración de un tejido en particular.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Matrices e inmovilización celular

La inmovilización de células es una herramienta ampliamente usada en cultivo celular para ser aplicada de diversas maneras, por ejemplo permitir el crecimiento de líneas celulares y cultivos primarios en sistemas de biorreactores. Por otro lado, ha permitido el desarrollo de terapias con células inmovilizadas que podrían ser beneficiosas para el tratamiento de enfermedades como la diabetes, hemofilia, cáncer y la insuficiencia renal (Orive et al., 2003). Esta técnica ha permitido, por ejemplo, el trasplante de células madre (Park et al., 2007; Bensaid et al., 2003) y la administración controlada *in vivo* de agentes terapéuticos como citoquinas y factores de crecimiento (Schmidt et al., 2008).

Un efecto fundamental de la inmovilización es que las células se encuentran en un microambiente similar a su ambiente fisiológico en comparación con los métodos de cultivo tradicionales en 2D (monocapa). Más aún, si la inmovilización de células se realiza en matrices de origen natural como colágeno, alginato y fibrina (Hunt y Grover, 2010), donde se recrea un ambiente que representa en parte la geometría y la química de la MEC en la que las células se encuentran naturalmente en órganos y tejidos (Vogel y Baneyx, 2003). Por esto no es de sorprenderse que los métodos tradicionales de crecimiento en monocapa sean menos eficientes para el cultivo de células con fines productivos o terapéuticos.

La regulación de la función celular y el crecimiento en tejidos tridimensionales (3D) son áreas de interés en el desarrollo de nuevas técnicas en ingeniería de tejidos. En orden de determinar el criterio de diseño de estas aproximaciones es necesario entender cómo funcionan las complejas vías fisiológicas dentro del contexto físico de células y tejidos. Para que las células respondan a su medioambiente se deben sensar señales extracelulares para luego desencadenar la expresión o represión de genes particulares. Estas señales extracelulares pueden promover o restringir la proliferación celular, la migración y la diferenciación, remodelamiento de la matriz extracelular o promover una reorganización de los tejidos. La comprensión de como se regula la señalización externa

permitirá la manipulación de las vías de proliferación y diferenciación de muchos tipos celulares (Eshghi y Schaffer, 2008).

Las mayores fuentes de señalización extracelular provienen de factores de diferenciación y de crecimiento exógenos, naturaleza y organización de la MEC soluble e insoluble, interacciones celulares y estrés ambiental inducido por fuerzas de corte y tensión, disponibilidad de nutrientes y oxígeno, fuerzas mecánicas, entre otras (Barrilleaux et al., 2006).

1.1 Tipos de matrices

Las matrices cumplen un rol fundamental en ingeniería de tejidos. En general se utilizan para imitar las funciones de la MEC, funcionando como soporte y regulando la función celular mediante interacciones específicas. Las matrices basadas en análogos de la MEC se caracterizan por tener una fracción con un volumen de porosidad muy alto. Su composición química consiste principalmente en colágenos tipo I y II y copolímeros de colágeno y glicosaminoglicanos (GAGs). Otro tipo de materiales que se utilizan para construir matrices con acción biológica son: polipéptidos, hidroxiapatitas, hialuronato, quitosano, alginatos, fibrina, entre otros. También se han utilizado materiales sintéticos como por ejemplo: poliglicolida, poliácido y poliláctico colicoida, que generalmente se usan en suturas (Metcalf y Ferguson, 2007). A continuación se describirán algunos materiales de origen natural, que se encuentran entre los más utilizados para la inmovilización celular.

1.1.1 Colágeno

El colágeno es una de las proteínas más abundantes en los tejidos. Es usado comúnmente como matriz celular para ser implantada, pues posee una baja antigenicidad y promueve la proliferación celular. Las matrices de colágeno entrecruzado han sido preferidas debido a una mejor propiedad mecánica y mejor estabilidad (Liu et al., 2008).

1.1.2 Gelatina

La gelatina es una forma hidrolizada del colágeno, formada mediante el rompimiento de su estructura de triple-hélice en una de moléculas de hebras simples. Tiene la ventaja, sobre el colágeno, de no presentar inmunogenicidad, además es completamente reabsorbida *in vivo* (Xia et al., 2004; Dainiak et al., 2010). Un aspecto importante es que retiene la capacidad de señalización, por ejemplo mantiene la

señal de adhesión celular arginina-glicina-acido aspártico (RGD). Esta señal es reconocida por ciertas integrinas expresadas en la superficie de algunas células, mediando procesos biológicos básicos como guiar a las células a lugares apropiados en los tejidos, proveer de anclaje celular y por último controlar la proliferación, diferenciación y apoptosis (Ruoslahti, 1996). Debido a que la gelatina tiene menor resistencia mecánica, generalmente se usa en combinación con otros biomateriales (Enrione et al., 2010).

1.1.3 Quitosano

El quitosano es un derivado parcialmente deacetilado de la quitina, un abundante polímero natural y el mayor constituyente de las conchas de algunos crustáceos. Es un polisacárido lineal consistente de glucosamina y N-acetilglucosamina y es estructuralmente similar a los GAG, un importante elemento estructural de la MEC de muchos tejidos. Este es un biomaterial muy usado en ingeniería de tejidos por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja inmunogenicidad, habilidad de gelificación, alta capacidad absorbente, capacidad bacteriológica-fungistática y ser no tóxico *in vivo* (Xia et al., 2004; Shi et al., 2006). La versatilidad del quitosano en términos de modificación y combinación con otros polímeros ha permitido su uso para el desarrollo de una amplia gama de tejidos como hueso, hígado, tejido neural, tejido vascular, cartílago y piel (Shi et al., 2006). La gelatina y el quitosano han sido combinados para sintetizar matrices caracterizadas por tener una excelente propiedad para ser procesadas en matrices porosas, para su aplicación en trasplante de fibroblastos y queratinocitos y en regeneración dérmica (Mao et al., 2003).

1.1.4 Alginato

El alginato es un polisacárido derivado de ciertas algas, tiene la propiedad única de gelificarse en presencia de iones divalentes como el calcio. El alginato es uno de los biomateriales más utilizados en ingeniería de tejidos. Sin embargo este ha sido de interés comercial desde 1930, cuando se reconocieron sus propiedades como emulsionador, espesador y estabilizador (Wong, 2004). Este biomaterial también se ha usado desde hace muchos años para propósitos biomédicos, particularmente en la fabricación de parches quirúrgicos para tratar los exudados de las heridas. Sin embargo el explosivo incremento en las aplicaciones biomédicas comenzaron cuando este material fue reconocido como una matriz para la encapsulación e inmunoprotección para el trasplante de células (Wong, 2004).

Se han logrado cultivos estables en alginato con varios tipos celulares como condrocitos, células de medula ósea, mioblastos, fibroblastos, células de riñón, células epiteliales, hepatocitos, entre otras. El alginato posee propiedades que lo hacen ser una herramienta muy útil en ingeniería de tejidos. Es biocompatible con las células y el tejido hospedero y sus propiedades físicas pueden ser manipuladas *in vitro* con cierta facilidad. Cuando ha sido trasplantado junto con células, se ha visto que las protege del ataque del sistema inmune, mientras permite el correcto intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos con el exterior. Además tiene buenas propiedades mecánicas y elásticas (Ghidoni et al., 2008).

1.1.5 Fibrina

La fibrina ha sido utilizada extensamente como matriz para células de diversos orígenes, sola o en combinación con otros materiales para regenerar tejido adiposo, hueso, tejido cardíaco, cartílago, hígado, tejido nervioso, tejido ocular, piel, tendones y ligamentos (Eyrich et al., 2006). Las ventajas de la fibrina es que gracias a su rol natural en la homeostasis y en la reparación y regeneración de los tejidos, posee propiedades biológicas que proporcionan grandes ventajas al ser usada en ingeniería de tejidos. Algunas de estas propiedades son: efecto antibacteriano, óptimas propiedades de bio-absorción, interacciones específicas con ciertas poblaciones celulares y permite la migración, proliferación y diferenciación celular (Eyrich et al., 2006; Currie et al., 2003).

La fibrina es de manejo relativamente sencillo *in vitro* y sus características físicas pueden ser moldeadas para cumplir con los requerimientos particulares de cada objetivo. Puede modificarse el tamaño de poro, ser usado como sistema de suministro de factores de crecimiento y modificarse sus propiedades de bio-absorción, entre otras ventajas (Currie et al., 2003).

Los geles de fibrina formados por proteínas plasmáticas purificadas adquieren estructuras y propiedades mecánicas que son muy similares a la matriz *in vivo*, esto hace que la fibrina no sea una matriz pasiva (como por ejemplo lo es el alginato), sino que mantiene muchas de las funcionalidades que tiene *in vivo*, por ejemplo une específicamente muchos factores de crecimiento y componentes del coágulo como fibronectina y ácido hialurónico. Por otro lado, la molécula de fibrina tiene dos pares de sitios RGD que pueden interactuar con las integrinas. Esta actividad biológica la hace ser una matriz atractiva para la diferenciación de células madre e ingeniería de tejidos (Janmey et al., 2009).

2. Células utilizadas en ingeniería de tejidos

Las células que se implanten junto con la matriz son obviamente un factor fundamental en esta estrategia, pues finalmente son éstas las que ejercerán una actividad biológica específica, permitiendo la recuperación del tejido dañado. El tipo celular y su acción biológica van a depender mucho del tipo de lesión y del tipo de tejido donde las células son implantadas (Boyce, 2001). El comportamiento que tienen las células en la matriz y en el lugar del implante es muy difícil de predecir con exactitud, especialmente si las células provienen de cultivos primarios, los que intrínsecamente tienen un comportamiento *in vitro* e *in vivo* post-implante muy variable, como consecuencia de su intrínseca heterogeneidad, especialmente cuando las células tienen un estado indiferenciado o inmaduro como ocurre en el caso de queratinocitos y células madre.

Aunque se han utilizado una diversidad de células en el diseño de piel artificial, junto con distintos tipos de matrices, no se ha logrado desarrollar substitutos de piel que imiten la complejidad de la misma (Liu et al., 2008). Es por esto que en los últimos años se han incorporado en los sistemas de matrices diversas células madre (descritas más adelante), buscando con esto mejorar ciertos aspectos de funcionalidad (Herdrich et al., 2008; Forbes et al., 2002; Jorgensen et al., 2004). Teóricamente, mediante la incorporación de células madre se podrían generar *de novo* todos los componentes de la piel normal. Sin embargo esto está lejos de lograrse en la práctica, por lo que el uso de células madre proporciona otras ventajas que se mencionarán más adelante, como por ejemplo aprovechar su capacidad proliferativa y en algunos casos su capacidad trófica (Caplan y Dennis, 2006).

3. Factores de crecimiento involucrados en la reparación de heridas

Durante el proceso de reparación se liberan una variedad de factores de crecimiento en el lugar de la herida, secretados por plaquetas y células. Estos factores de crecimiento, junto con otras citoquinas y quimioquinas, son cruciales para la coordinación de los diversos tipos celulares durante el proceso de reparación. Durante este proceso hay una estricta regulación de estos factores y también del microambiente de la herida que favorece su actividad. En heridas de carácter leve, el proceso de reparación es controlado por la acción de estos factores de manera espacio-temporal específica. Esto se contrasta con lo que ocurre en heridas de carácter grave o crónicas (Grazul-Bilska et al., 2003). Por ejemplo, en quemaduras de segundo y tercer grado, el proceso de inflamación es exagerado y prevalece

en el tiempo. Como consecuencia se produce un ambiente proteolítico generado por las células inflamatorias infiltradas en el lugar de la herida y consecuentemente hay una sobre-regulación de citoquinas pro-inflamatorias que inhiben la progresión normal de la reparación. Este ambiente produce la degradación y secuestro de varios factores de crecimiento y citoquinas en el lugar de la herida, inhibiendo su acción (Barrientos et al., 2008).

Debido a esta desregulación de la función de los factores de crecimiento en algunos tipos de heridas es que se ha estudiado la posibilidad de aplicar directamente ciertos factores de crecimiento dependiendo del tipo de daño (Tabla 1). La familia de factores de crecimiento TGF- β es de especial importancia en la reparación de heridas. Se ha vinculado a TGF- β 3 como un factor involucrado activamente en la reparación sin formación de cicatriz.

4. TGF- β 3

La familia de TGF- β está compuesta por casi 50 miembros en todo el reino animal, incluyendo las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs). Las proteínas de esta familia tienen una función crítica durante el desarrollo embrionario y además regulan un amplio espectro de respuestas en el organismo adulto. Sus actividades pleiotrópicas incluyen inhibición o estimulación de la proliferación celular, control de la síntesis y degradación de la MEC, control de las interacciones mesenquimáticas y epiteliales durante la embriogénesis (Beanes et al., 2004). También están involucradas en las respuestas celulares a los daños, en la angiogénesis, hematopoyesis, quimiotaxis y modulación de las funciones inmunes. Todas estas funciones son controladas por los miembros de la familia TGF- β de manera contexto-específica (Javelaud y Mauviel, 2004; Flanders et al., 2003).

Las isoformas mamíferas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, están codificadas por tres genes distintos, estructuralmente son casi idénticas (9 cisteínas conservadas, 76-80% de homología aminoacídica). Son sintetizadas por una gran variedad de células incluyendo a las plaquetas, macrófagos, fibroblastos y células tumorales (Javelaud y Mauviel, 2004). Las tres isoformas, aunque muy similares en estructura, pueden tener distintas funciones, que pueden ser hasta opuestas, dependiendo del contexto en el cual se encuentren. Estos factores de crecimiento están involucrados en procesos fisiológicos esenciales tales como el desarrollo embrionario, diferenciación, reparación de tejidos y control del crecimiento celular

(Flanders et al., 2003). TGF- β 3, como las otras isoformas, es claramente un mediador endógeno importante de procesos de crecimiento, mantención y reparación en el desarrollo embrionario, en neonatos y adultos. Los efectos farmacológicos observados *in vitro* e *in vivo* de TGF- β 3 exógeno han mostrado que podría tener aplicaciones clínicas en diferentes áreas, como en la reparación de heridas y quimioprotección (Mittl et al., 1996).

Tabla 1: Factores de crecimiento involucrados activamente en la reparación de heridas en la piel.

Factor	Células que los secretan	Blanco celular	Función	En ensayos clínicos para
EGF	Macrófagos, Monocitos, Plaquetas	Células epiteliales	Proliferación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales. Migración de queratinocitos	Ulceras venosas
FGF	Macrófagos, Monocitos, células endoteliales, Plaquetas	Células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos	Proliferación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales. Quimiotaxis y producción de MEC	Ulceras diabéticas, venosas y por presión
GMCSF	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales	Células hematopoyéticas, inflamatorias, neutrófilos, fibroblastos	Quimiotaxis de células endoteliales e inflamatorias. Proliferación de fibroblastos, activación de neutrófilos	Ulceras venosas y arteriales
HGH	Glándula pituitaria	Hepatocitos, hueso, fibroblastos	Producción de IGF-1	Ulceras venosas
IL-1	Linfocitos, macrófagos, queratinocitos	Monocitos, neutrófilos, fibroblastos, queratinocitos	Quimiotaxis de neutrófilos, monocitos y macrófagos	Ulceras por presión
PDGF	Plaquetas, macrófagos, células de músculo liso, neutrófilos	Fibroblastos, células de músculo liso	Proliferación de fibroblastos y células de músculo liso. Estimulación de la quimiotaxis, producción de MEC y contracción	Ulceras diabéticas y por presión
TGF-β	Plaquetas, hueso, otras células	fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, linfocitos, monocitos	Producción de MEC, quimiotaxis, inhibición de la proliferación de queratinocitos y células endoteliales	Ulceras venosas y por presión

En general, los TGF- β son sintetizados como pre-pro-péptidos que son secretados desde las células en una forma primaria inactiva, también llamado TGF- β latente (Figura 3). Esta forma inactiva o latente consiste en un dímero de TGF- β asociado con el pro-péptido N-terminal del precursor de TGF- β

(péptido de latencia o LAP) y la proteína de unión a TGF- β latente (LTBP). Este complejo TGF- β /LAP/LTBP, también llamado complejo latente mayor (LLC), está asociado con la matriz extracelular listo para una liberación del TGF- β activo (Figura 3). La activación se produce mediante el corte del péptido de latencia de manera muy regulada *in vivo*. Los agentes que producen la activación son los microambientes ácidos, plasmina, proteasas tipo plasminasas y la interacción con la integrina $\alpha\beta6$ (Eslami et al., 2009; Flanders et al., 2003).

La estructura de estas proteínas ha sido determinada mediante una combinación de resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos x (Figura 4). Los aminoácidos 45 y 47 interactúan con la $\alpha2$ -macroglobulina, una proteína abundante en el suero que se une a las formas latentes de TGF- β . Los aminoácidos 67 y 68 determinan la afinidad de las isoformas por la proteína ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en las células vasculares endoteliales. Los aminoácidos 92-98 regulan la unión de TGF- β al receptor tipo II de TGF- β (T β RII) (Flanders et al., 2003; Mittl et al., 1996, Figura 4).

La señalización de TGF- β funciona a través de un sistema de proteínas de unión y un receptor de membrana, que puede incluir receptores tipo I y II (T β RI y T β RII, respectivamente), receptores tipo III (T β RIII o endoglina o CD105), β -glicano (también es un T β RIII), proteína de anclaje a GPI y BAMBI (receptor tipo I truncado natural; Flanders et al., 2003). La endoglina y el β -glicano pueden presentar el TGF- β al receptor tipo II que se compleja con el receptor tipo I y lo fosforila. Los receptores T β RI y T β RII son quinasas serina/treonina transmembranales, donde T β RI fosforila moléculas intracelulares. La señalización intracelular involucra a la familia de proteínas Smad, donde Smad-1 y Smad-2 son directamente fosforiladas por T β RI para luego formar un complejo con Smad-4. Este complejo entra directamente al núcleo donde interactúa con otros factores de transcripción para regular la transcripción. En contraste, Smad-7 inhibe la fosforilación de Smad-2 y Smad-3 en una retroalimentación negativa para prevenir la sobre estimulación de la célula mediante TGF- β (Flanders et al., 2003; Wallace y Hardy, 2005; Figura 3).

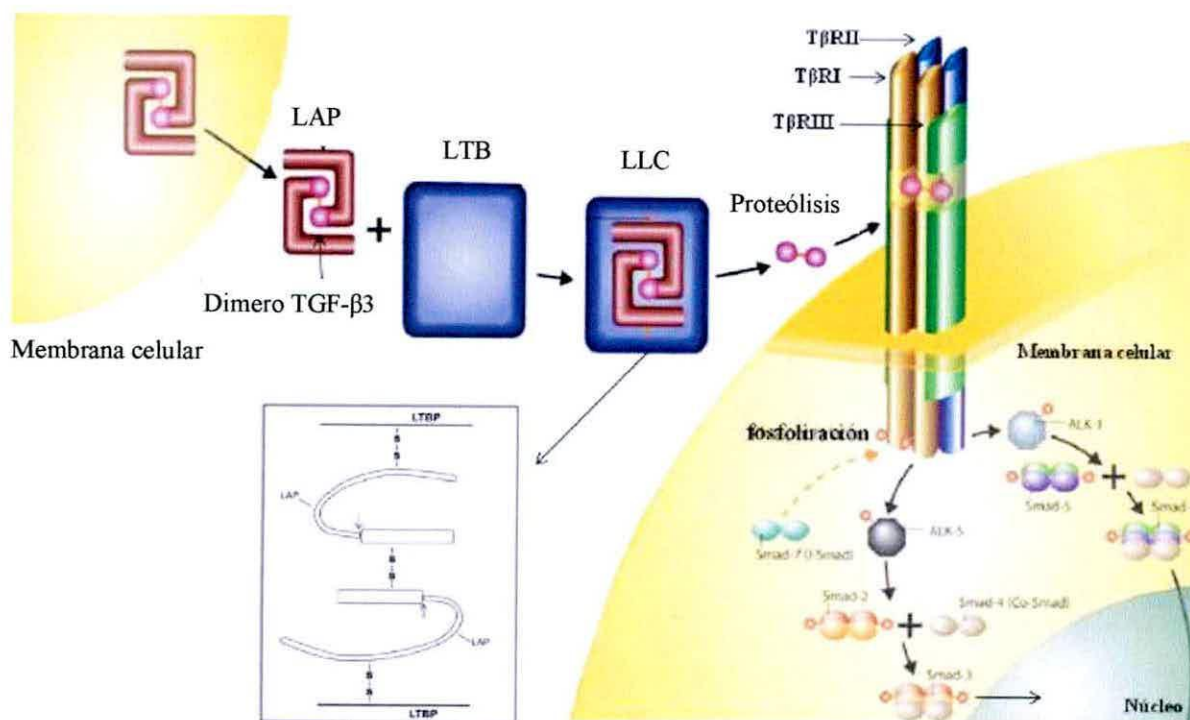


Figura 3. Mecanismo de acción de TGF-β. Dentro de la célula, el TGF-β sufre proteólisis desde el C-terminal de su proteína precursora, pero permanece unido no-covalentemente al péptido de latencia (LAP), formando un complejo pequeño de latencia. Este complejo es exportado desde la célula donde se une a la proteína de unión a TGF-β latente (LTBP) mediante enlaces de cisteína para formar el complejo de latencia mayor (LLC). En esta forma circula extracelularmente. La proteólisis del LLC libera al TGF-β lo que permite que se una al dominio extracelular del receptor de TGF-β. Este receptor puede estar conformado de hasta 3 polipéptidos dimericos: TβRI, TβRII y TβRIII. No se sabe si TGF-β se une solo a TβRII, lo que facilitaría la fosforilación de TβRI, o más bien se une a TβRI y TβRII para afectar la fosforilación de TβRI. Se sabe que TβRII modula la vía de señalización de TGF-β. La fosforilación de TβRI activa el dominio intracelular serina/treonina kinasa que causa la fosforilación de R-Smads 2/3. Este complejo se asocia con Co-Smad-4 para translocarse al núcleo. El Smad-7 inhibe la activación de los R-Smads (Smad-1-2-3-5 y -8) mediante diferentes mecanismos. En las células endoteliales, la unión de TGF-β a su receptor fosforila y activa receptores quinasa tipo activinas ALK-1 y ALK-5. La señalización de TGF-β mediante ALK-5 y la subsecuente fosforilación de R-Smad 2/3 lleva a la inhibición de la proliferación y migración de las células endoteliales, por otro lado la señalización vía ALK-1 y R-Smad 1/5 induce la proliferación y migración. Figura adaptada desde Flanders et al., 2003; Wallace y Hardy, 2005.

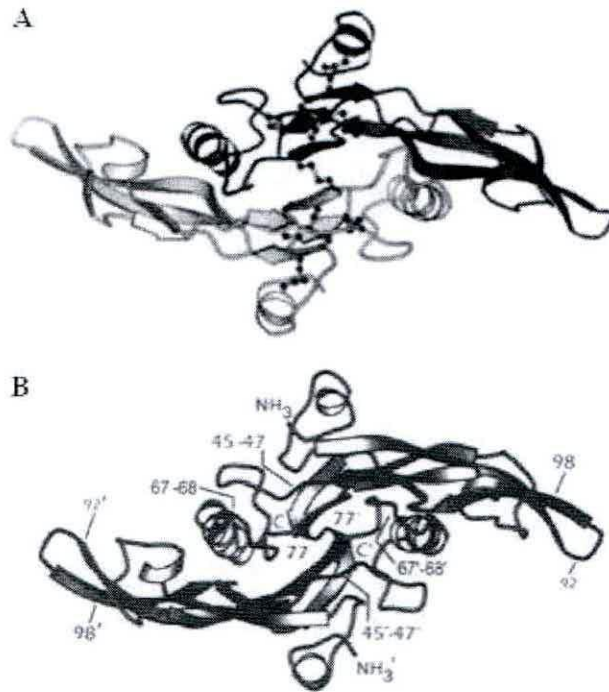


Figura 4. Estructura de TGF- β . (A) Estructura 3D de TGF- β 3, se muestran los monómeros (cadenas grises y negras) unidos por los puentes disulfuro (puntos). (B) Estructura 3D de TGF- β , se destacan los aminoácidos importantes en la unión de la proteína a su receptor (Flanders et al., 2003; Mittl et al., 1996).

Los T β RIII no tienen actividad quinasa, estos tendrían más bien un rol de modulación del acceso a los ligandos por parte de los receptores tipo I y II y se consideran más bien proteínas transmembranales de unión a TGF- β , que están involucradas de manera importante en la regulación de la acción biológica de las distintas isoformas (Wong et al., 2000). La endoglina o CD105 es una glicoproteína que se expresa de manera importante en células endoteliales, se ha visto que co-inmunoprecipita con T β RI y/o T β RII, lo que sugiere que forma un complejo con estos receptores (Wong et al., 2000; Wallace y Hardy, 2005). El β -glicano tiene gran homología con la endoglina, sin embargo es capaz de unirse a las tres isoformas, mientras que la endoglina sólo une a TGF- β 1 y TGF- β 3 (Wong et al., 2000).

4.1 TGF- β 3 como un agente anti-cicatriz

De las tres isoformas de TGF- β que han sido identificadas en especies de mamíferos hasta hoy, TGF- β 1 es la que ha sido más estudiada y la que primero se descubrió. Se ha visto que tanto TGF- β 1 y TGF- β 2 están involucradas principalmente en la respuesta inflamatoria y por lo tanto promueven la reparación rápida que termina en la formación de cicatrices, mientras que TGF- β 3 provoca una respuesta curativa sin generación de cicatriz, similar a lo que ocurre en tejidos fetales y embrionarios (Beanes et al., 2004). Es por esta razón que se han realizado algunos estudios en modelos animales donde se ha demostrado que TGF- β 3 está directamente involucrado en la reparación de las heridas sin formación de cicatriz (Hao et al., 2008). Algunos antecedentes que sugieren que TGF- β 3 es un agente anti-cicatriz son:

- Está presente en altos niveles en piel en desarrollo y en heridas de embriones que se reparan sin cicatriz
- Está presente en bajos niveles durante la reparación de heridas en adultos
- Es tardíamente inducido en el proceso de reparación de heridas en adultos cuando los niveles de TGF- β 1 empiezan a decaer
- La neutralización de TGF- β 3 en heridas de organismos adultos hacen que la cicatriz sea de menor calidad.
- La adición de TGF- β 3 en heridas de organismos adultos reduce o elimina la formación de cicatriz
- La delección del gen de TGF- β 3 causa que las heridas en embriones se reparen dejando cicatriz.

En la reparación de heridas de piel tratadas con TGF- β 3 se produce una estimulación de la invasión celular de fibroblastos hacia el coágulo de fibrina lo que tiene al menos dos efectos beneficiosos. Primero, las células pioneras abren las vías facilitando la invasión celular posterior; segundo, los fibroblastos depositan matriz extracelular de manera tal que restituyen la arquitectura normal de la dermis, mientras que las heridas no tratadas muestran un alineamiento de los fibroblastos predominantemente en la interface entre el coágulo de fibrina y los márgenes de la herida resultando en haces paralelos organizados de colágeno anormal de tejido cicatricial (Ferguson y O'Kane, 2004).

A diferencia de TGF- β 1, TGF- β 3 no circula en la sangre, no es liberado por degranulación de mastocitos en el lugar de la herida y probablemente está estrictamente regulado mediante la maquinaria sintética de los queratinocitos y fibroblastos de la piel. Como se indicó anteriormente, la sincronización de la aplicación de este factor es crucial y se podría hipotetizar que TGF- β 3 es uno de los reguladores maestros de la regeneración de las heridas (Ferguson y O'Kane, 2004).

5. Tratamiento de heridas con factores de crecimiento

Como ya se ha mencionado, el uso de factores de crecimiento específicos, para el tratamiento de heridas crónicas y otros defectos de la piel, es una aproximación de la ingeniería de tejidos que ha tomado mucha fuerza. Esto es principalmente por el hecho que mediante el uso de estos factores se podría de alguna manera regular el proceso de reparación, que muchas veces se encuentra desregulado produciendo heridas que no sanan, como es el caso de algunos tipos de úlceras y formación de cicatrices. Otro posible beneficio de esta aproximación es que se ha visto que una exposición temprana de la células involucradas en la reparación de una herida a factores de crecimiento particulares pueden programarlas para producir resultados a largo plazo muy diferentes (Ferguson y O'Kane, 2004). Esto podría aprovecharse principalmente en evitar que se forme una cicatriz, por ejemplo aplicando TGF- β 3, para permitir una programación de las células involucradas en la reparación para no producir cicatriz.

En la actualidad solo hay un medicamento aprobado por la Food and Drug Administration (FDA), el Beclapermin, cuyo principio activo es PDGF-BB recombinante. Su indicación es para el tratamiento de úlceras de pie diabético mediante su aplicación tópica. Sin embargo, hay muchos estudios clínicos en desarrollo que buscan utilizar otros factores crecimiento, como VEGF y TGF- β 3. Juvista es un medicamento, cuyo principio activo es TGF- β 3 y que recientemente finalizó estudios clínicos en fase 3. Aunque en estudios clínicos fase dos había mostrado resultados beneficiosos (Ferguson et al., 2009), en la siguiente fase no se lograron los resultados esperados (<http://www.renovo.com/en/products/juvista>). En este momento los autores del estudio están analizando los resultados para buscar las razones de por qué no se cumplieron las variables de eficacia primaria y secundaria.

Las razones que otros autores argumentan del por qué la aplicación tópica de factores de crecimiento no ha dado los resultados esperados son por ejemplo, la degradación de las proteínas producida por el ambiente proteolítico de las heridas, especialmente las crónicas. Este problema se ha tratado de sobrellevar mediante terapia génica y otros sistemas de suministro, como por ejemplo polímeros con factores anclados a su superficie que permiten una liberación sostenida. Sin embargo estos sistemas no han tenido el éxito esperado (Davidson, 2008).

Los factores de crecimiento recombinantes son herramientas básicas en ingeniería de tejidos, sin embargo estos pueden ser extremadamente costosos y aun más importante, tener una actividad biológica insuficiente *in vivo* (Robson et al., 1998). Las condiciones *in vivo* son mucho más complejas y muchas variables afectan notoriamente la actividad de estas proteínas, tales como proteólisis, vida media no suficiente para ejercer su actividad, nula interacción con la MEC, patrones de glicosilación no adecuados y falta de acción sincrónica con otros factores de crecimiento (Lee et al., 2011).

El tiempo en el cual se aplica el tratamiento en la herida es muy importante. Se ha visto que los mejores resultados se obtienen dentro de las primeras 48 hrs de ocurrido el daño (Ferguson y O’Kane, 2004). Sin embargo, la maduración completa de la cicatriz en el hombre demora hasta 6 meses, lo que posibilitaría que tratamientos tardíos tengan todavía un efecto positivo sobre la formación de la cicatriz. Ciertos procesos que ocurren en la herida son críticamente importantes de detener lo más pronto posible, como es el caso de la producción de TGF- β 1, el que es liberado casi inmediatamente ocurrido el daño, desencadenando la respuesta inflamatoria y por consiguiente los procesos río abajo que llevarían a la formación de cicatriz. Por otro lado la rápida administración de factores de crecimiento como TGF- β 3 tendría efectos positivos en el desarrollo final de la curación de una herida y la formación de cicatriz.

Es por estas razones que el desarrollo de tecnologías que permitan incorporar una forma de liberar factores de crecimiento como TGF- β 3 en las heridas es de vital importancia para sobrepasar los problemas que tienen los actuales substitutos de piel. Como se mencionó anteriormente, también se está poniendo énfasis en el uso de células madre en ingeniería de tejidos. La propuesta abordada en el desarrollo de esta tesis tiene relación con estos dos aspectos, es decir utilizar células madre como productoras de factores de crecimiento, específicamente TGF- β 3, para incorporarlas eventualmente en

un sistema de sustituto de piel. Esto permitiría tener una fuente de liberación prolongada del factor de crecimiento desde el lugar de la herida, aprovechando las características particulares de este tipo de células. Además, en este sistema se lograría una liberación prolongada del factor de crecimiento, bajo el control de la célula, donde dependiendo de las condiciones intrínsecas del tejido puede ser activada para liberar el factor o suprimir su producción.

6. Células madre

Las células madre (también llamadas células troncales) son células no especializadas que poseen una habilidad significativa para autorrenovarse y además, dar origen a células diferenciadas especializadas cuando reciben las señales adecuadas. Esto es posible gracias a que poseen la capacidad de dividirse asimétricamente, de tal forma que una de las células hijas mantendrá la característica de célula indiferenciada y la otra célula hija estará comprometida para diferenciarse a algún linaje celular más especializado (Knoblich, 2008).

Las células madre se pueden clasificar según su origen. Así se pueden distinguir dos grandes grupos, aquellas que están presentes en tejidos embrionarios y aquellas presentes en los tejidos no embrionarios, en adelante, células madre adultas (CMA). Estas últimas pueden ser pluripotentes, multipotentes, oligopotentes o unipotentes. Existen tantos tipos de CMA como tejidos distintos, así se han encontrado CMA en la médula ósea, sangre periférica, cerebro, tejidos dentales, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitelio de la piel, sistema digestivo, tejido adiposo, córnea, retina, hígado, hueso, páncreas y folículo piloso, entre otros (Murielle et al., 2008; Jo et al., 2007; Wagers y Weissmann, 2004).

Es importante destacar que todos los sistemas de CMA existen para asegurar que cuando las células dentro de un tejido expiran naturalmente, puedan ser reemplazadas expeditamente para proveer de un balance fisiológico en el organismo. Toda célula en el cuerpo tiene una vida que varía entre algunos minutos a muchos años dependiendo de la célula. La expiración de ciertas células permite que el tejido se rejuvenezca a sí mismo y provee al tejido de los mecanismos para cambiar lentamente sus propiedades en función de la edad y de su uso. Por lo tanto, las CMA son la fuente de las partes de reemplazo de unidades vencidas, pero también sirven como fuentes de reserva celular para tejidos

dañados o comprometidos que requieran una reparación o regeneración más extensiva (Caplan y Dennis, 2006).

A no ser que estén respondiendo a señales producidas por algún trauma, las CMA se dividen con baja frecuencia *in vivo* para mantener la homeostasis dentro de los tejidos en los cuales residen. Por esta razón las CMA residen en nichos específicos donde son expuestas a distintas señales microambientales para mantener su estado indiferenciado. Después de un daño al tejido donde residen, se producen señales específicas que promueven que las CMA adopten un programa de diferenciación hacia algún tipo celular específico del tejido.

Por mucho tiempo se pensó que las CMA sólo podían dar origen a células pertenecientes al tejido donde se encuentran. Sin embargo, se ha descrito que, tanto *in vivo* como *in vitro*, que las CMA pueden diferenciarse a células de otros tejidos totalmente distintos del cual se aislaron (Wagers y Weissmann, 2004). A este fenómeno se le ha denominado plasticidad celular, concepto que sugiere que la determinación de linaje de una CMA no está definido rígidamente sino que puede ser flexible (Wagers y Weissmann, 2004; Somoza et al., 2008). En consecuencia, el potencial terapéutico de las CMA se ampliaría, y su uso en terapia celular e ingeniería de tejidos para el tratamiento de distintas enfermedades y daños a los tejidos sería más factible debido a las pocas o nulas restricciones bioéticas relacionadas con su obtención.

6.1 Células madre mesenquimáticas (MSC)

Las MSC son un tipo de CMA que se aíslan principalmente a partir de la médula ósea y tejido adiposo, sin embargo se han aislado de otros tejidos como el cordón umbilical, músculo esquelético, piel, sangre periférica, membrana sinovial, placenta y dientes (Minguell et al., 2001; Tuan et al., 2002; Huang et al., 2009; Jo et al., 2007; Herdrich y Liechty, 2008). Estas células pueden ser expandidas *ex vivo* e inducidas, tanto *in vivo* como *in vitro*, a diferenciarse hacia todos los fenotipos maduros del linaje mesenquimático: adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos, tenocitos y estroma de soporte hematopoyético (Dominici et al., 2006; Minguell et al., 2001).

En las últimas décadas se ha generado un gran interés en estas células debido a que poseen ciertas características que las hacen ser una herramienta apropiada para utilizarse en distintos tipos de terapias

celulares para diversas enfermedades, como también en la ingeniería de tejidos (revisado en Somoza y Rubio, 2012). Estas características son:

- Fácil obtención desde el propio paciente
- Rápida expansión en cultivo
- No son teratogénicas
- Son parte del sistema de reparación natural de diversos tejidos
- Se pueden diferenciar tanto *in vitro* como *in vivo* a diversos linajes celulares, incluidos los mesenquimáticos y otros como el neural (transdiferenciación)
- Son poco inmunogénicas
- Son inmunomoduladoras
- Son mediadores tróficos, es decir son capaces de secretar distintos factores de crecimiento y citoquinas para permitir la modulación de la fisiología del tejido donde residen y en el cual están ejerciendo una acción reparadora (Caplan, 2009; Somoza et al., 2008, 2010; Tuan et al., 2002).

Una de las funciones más importantes y substanciales de las MSC es secretar cantidades importantes de moléculas bioactivas en respuesta a su ambiente local o su estado de actividad. Los factores que secretan ejercen diversas funciones que van en beneficio de la reparación de los tejidos frente a daños y otras acciones moduladoras. Por ejemplo, los factores secretados inhiben la apoptosis y limitan el campo del daño, inhiben la fibrosis, estimulan la angiogénesis, estimulan la mitosis de progenitores específicos e intrínsecos del tejido y modulan la respuesta inmune, entre otras funciones (Meirelles et al., 2009; Caplan, 2009).

La gran cantidad de tejidos desde los cuales se han aislado MSC ha llevado teorizar que estas células tienen un origen más bien vascular, es decir, residirían en todos los tejidos asociadas a los vasos sanguíneos como pericitos. Esto permitiría que estuvieran disponibles inmediatamente después de algún daño al tejido para ejercer su acción reparadora (Caplan y Dennis, 2006; da Silva Meirelles, 2006; Crisan et al., 2008).

Recientemente se han descrito células tipo MSC en tejidos dentales (Huang et al., 2009; Spath et al., 2009; Jo et al., 2007). Aunque recientemente se están estudiando las propiedades terapéuticas de estas MSC, se ha demostrado que son capaces de diferenciarse a diversos tejidos y que expresan los marcadores característicos de MSC. Esto hace que estas MSC tengan cierta ventaja sobre sus contrapartes de la medula ósea, principalmente a su fácil obtención desde piezas dentales después de su extracción y su gran capacidad proliferativa y de diferenciación (Jo et al., 2007).

6.2 MSC derivadas de tejidos dentales

Para el objetivo de este trabajo se planteó utilizar MSC derivadas de tejidos dentales. Una pieza dental contiene 4 sitios de donde se pueden aislar MSC, estos son: el ligamento periodontal, desde el folículo periapical de la raíz, desde la pulpa y desde el tejido gingival (Jo et al., 2007; Figura 5).

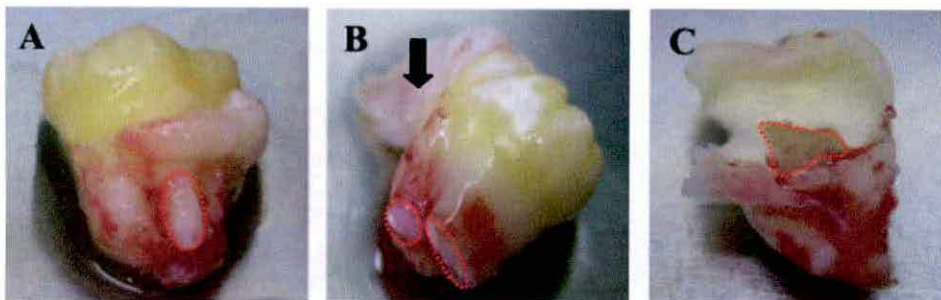


Figura 5. Tejidos dentales de los cuales se pueden aislar MSC. Ligamento periodontal (A); Folículo apical de la raíz y encía (flecha) (B); Pulpa (C)

La mayoría de las personas tendrán que extraerse los terceros molares (o muelas del juicio) en algún momento de sus vidas, esto permitiría tener una fuente de MSC mucho más accesible que la medula ósea. Las células que componen estos tejidos están sujetas a altas fuerzas de tensión, esto supone un mejor comportamiento al cultivarlas en matrices y en sistemas de biorreactores, donde las fuerzas de tensión sobre las células son mayores que en el caso de cultivos en 2D (monocapa) (Huang et al., 2009; Pinkerton et al., 2008). Otra ventaja de utilizar células aisladas de tejidos dentales es la alta tasa de recambio, principalmente el tejido periodontal (Xu et al., 2009). Por lo tanto, se podría esperar que MSC presentes en estos tejidos pudieran tener una mayor velocidad de crecimiento que MSC proveniente de otras fuentes. Otro aspecto importante, es que se ha descrito que los tejidos de la

cavidad oral tienen la característica única de repararse con la mínima o casi nula generación de cicatriz (Metcalfé y Ferguson, 2007; Cates, 2008, Eslami et al., 2009). Eslami et al., demostraron que esta característica está mediada por la integrina $\alpha v\beta 6$ y su interacción con TGF- $\beta 3$, el cual se encuentra en mayores cantidades en la mucosa oral en comparación con la piel. Este antecedente, junto a los mencionados anteriormente, hacen de las MSC aisladas desde tejidos dentales buenas candidatas para ser usadas en ingeniería de tejidos, con la finalidad de aprovechar su eventual actividad trófica regeneradora.

6.3 Aislamiento de MSC desde tejidos dentales

Las MSC expresan distintos marcadores de superficie, algunos de los más utilizados para su caracterización son CD10, CD13, CD29, CD44, CD51, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, STRO-1, CD271, SSEA-4 y α -SMA, entre otros. A la vez que son negativas para CD14, CD34 y CD45 (Jarocho et al., 2008; Buhning et al., 2007; Kolf et al., 2007). El aislamiento de MSC desde la médula ósea puede realizarse mediante la expansión de células adherentes, sin embargo esto no es aplicable al aislamiento de MSC desde tejidos dentales, pues en estos hay diversos tipos celulares que tienen la capacidad de adherirse a la placa de cultivo. Por esto es necesaria la selección de poblaciones específicas de células basada en la presencia o ausencia de marcadores de superficie específicos de MSC (Herdrich y Liechty, 2008). Ciertas sub-poblaciones han probado tener propiedades ventajosas en comparación con la población total. Por ejemplo, células aisladas desde cultivos de MSC en función de la expresión de los marcadores CD271 y CD105 tienen 4 veces mayor capacidad clonogénica (CFU-F) que la población heterogénea de la cual provenían, junto con mejores capacidades de diferenciación hacia algunos linajes. Además estos dos marcadores se expresan en MSC aisladas de varios tejidos y han sido utilizados sistemáticamente para caracterizar los cultivos de MSC (Jarocho et al., 2008; Buhning et al., 2007; Quirici et al., 2002).

CD271 se conoce también como el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso (LNGFR), a pesar que es una proteína putativa del sistema nervioso, se ha demostrado que MSC lo expresan basalmente sin estar comprometidas necesariamente hacia el linaje neural. Esto no es algo fuera de lo común, pues también se ha visto que estas células expresan otros marcadores del linaje neural en estado indiferenciado como es el caso de Nestina, GFAP, NF-M y GalC (Somoza et al., 2008).

Como se describió anteriormente, CD105 es una proteína transmembranal asociada con los receptores de TGF- β , denominada también endoglina o T β RIII. Su expresión en MSC puede estar directamente relacionada con la capacidad de estas células de diferenciarse a células capaces de secretar MEC como son los osteoblastos y condrocitos. El hecho que MSC expresen CD105 sugiere que parte de su actividad biológica podría estar regulada por la acción de las isoformas de TGF- β . En efecto, TGF- β 1 y TGF- β 3 son señales que producen la diferenciación de MSC a condrocitos y ambas isoformas se unen a T β RIII (Wong et al., 2000).

En general se sabe que TGF- β , como otros factores de crecimiento, ejerce una acción autocrina sobre las células que lo secretan, estimulando su propia síntesis (Barrientos et al., 2008). Es por esto que la selección de MSC basada en la expresión de este marcador podría permitir teóricamente obtener células con la capacidad de producir TGF- β 3. Por otra parte la selección de células CD271⁺, permite recuperar aquellas que manifiestan una mayor capacidad proliferativa. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta investigación se seleccionaron sub-poblaciones de MSC aisladas de tejidos dentales basándose en la expresión de estos dos marcadores.

6.4 MSC en ingeniería de tejidos y el tratamiento de heridas

Debido a las características de las MSC, hay numerosos estudios donde se han utilizado en ingeniería de tejidos para la reparación de hueso, cartílago, tendón, músculo y piel, con resultados positivos en modelos animales (Caplan 2007; Tuan et al., 2002). El uso de MSC en el tratamiento de heridas ha demostrado tener buenos resultados, como la capacidad de acelerar la reparación en modelos animales y en humanos. El mecanismo mediante el cual la administración terapéutica de MSC puede mejorar la reparación de una herida no ha sido determinado con precisión, sin embargo se piensa que ellas actúan mediante múltiples mecanismos (Figura 6), incluyendo la diferenciación celular, efectos paracrinos mediante la producción de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, producción y mantenimiento de MEC, modulación del sistema inmune y contracción de la herida (Herdrich y Liechty, 2008). Mediante estos mecanismos también pueden aumentar el reclutamiento de células al lugar del daño, estimular la angiogénesis y mejorar la supervivencia y la función de células endógenas en la herida (Meirelles et al., 2009).

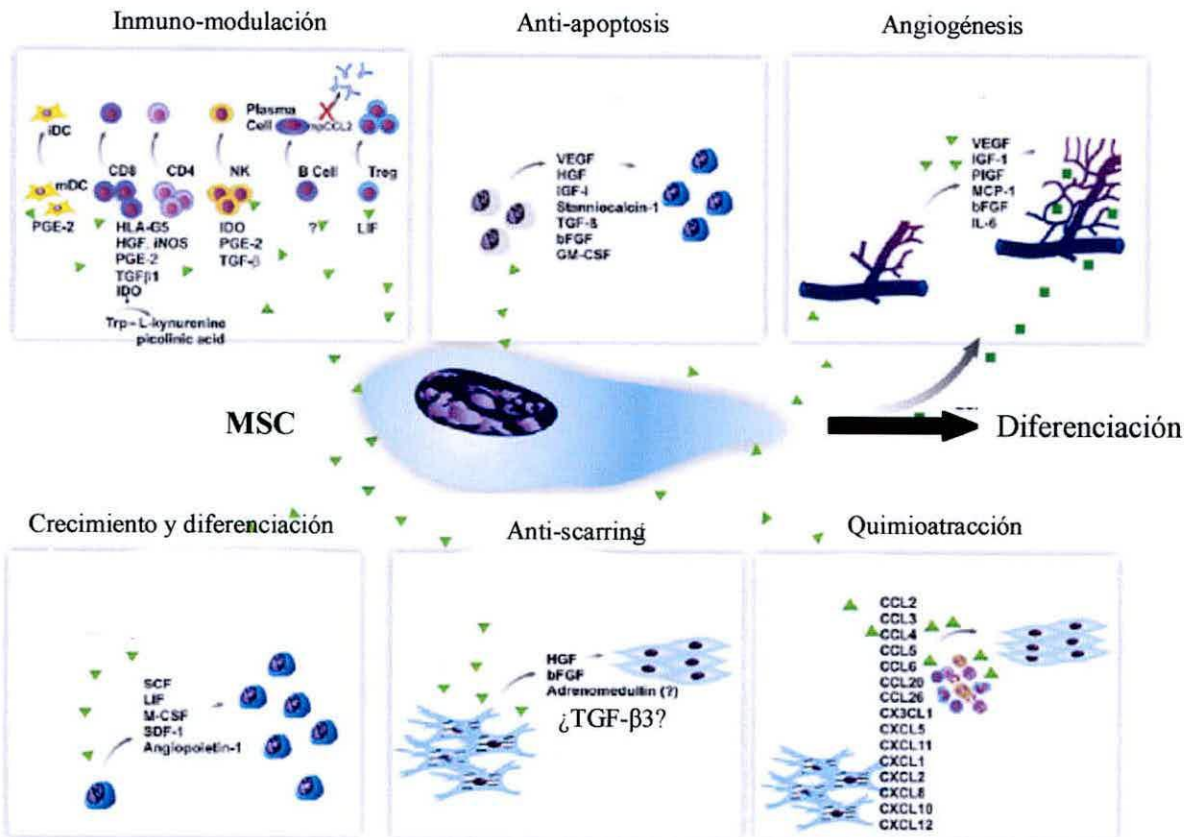


Figura 6. Principales mecanismos de acción terapéutica de MSC. Se cree que la principal actividad biológica de MSC es mediante la secreción de diversos tipos de citoquinas y factores de crecimiento. El tipo de factores secretados dependerá de la condición microambiental donde se encuentren las células (Figura adaptada de Meirelles et al., 2009).

Se ha visto por ejemplo, que MSC derivadas de medula ósea producen efectos positivos en la reparación de heridas en ratones normales y diabéticos permitiendo una mejor re-epitelización, infiltración celular y la angiogénesis. Por otro lado las heridas tratadas con MSC exhiben una mayor regeneración de estructuras diferenciadas formadas por queratinocitos endógenos, lo que sugiere que factores paracrinos secretados por MSC en la herida juegan un rol fundamental en la reparación y/o regeneración del tejido (Wu et al., 2007).

7. MSC y producción de factores de crecimiento

En un principio, el interés por las MSC surgió principalmente por su capacidad de diferenciarse no solo a los distintos linajes mesenquimáticos, sino que además por su capacidad de diferenciarse a muchos otros tipos celulares de distintos tejidos, es decir su plasticidad. Sumándose también al hecho que su aislamiento desde tejidos como la médula ósea y el tejido adiposo es relativamente sencillo y que además se ha observado que tienen propiedades inmuno-moduladoras y son poco inmunogénicas. Sin embargo recientemente se ha demostrado que la eficacia de las MSC en terapia celular también está relacionada con la producción de diversos factores de crecimiento que juegan un rol en la coordinación y regulación de los procesos celulares implicados en la remodelación del tejido dañado (Liu et al., 2006), produciendo efectos protectores y estimulando la población residente de células madre en un tejido en particular.

Todas las células secretan varios agentes bioactivos que reflejan su estado funcional y la influencia del microambiente en donde están. Claramente a medida que las MSC progresan hacia un fenotipo, la cantidad y tipos de factores bioactivos secretados cambian a medida que las células entran a nuevos estados de linaje. El patrón y cantidad de tales factores secretados finalmente gobiernan el estado funcional y fisiológico de las mismas células que los secretan como también a las células que se encuentran cercanas (Caplan y Dennis, 2006).

El amplio potencial secretor y la falta de localización substancial de MSC sugieren que cuando son infundidas sistémicamente ejercen un efecto terapéutico mediante la liberación de citoquinas que actúan localmente, y quizás a distancia en los tejidos. Más que servir como células madre para regenerar los tejidos, como se propuso originalmente, en algunos casos ellas sirven como fábricas celulares que secretan mediadores para estimular la reparación de los tejidos o modular el ambiente local para lograr otros efectos beneficiosos (Caplan y Correa, 2011).

Se ha observado que el tejido fuente de MSC puede ser importante en determinar la actividad biológica. Las MSC han sido aisladas a partir de muchos tejidos y la expresión génica parece reflejar al tejido desde el cual las células fueron aisladas. Estos datos sugieren una heterogeneidad biológica relevante dentro de las MSC en diferentes tejidos, posiblemente incluyendo distintos perfiles de

expresión de citoquinas, así diferentes fuentes de tejido pueden estar especialmente bien posicionados para aplicaciones clínicas específicas. En este sentido, es importante destacar que utilizar MSC aisladas desde tejidos dentales podría ser favorable para obtener células capaces de secretar factores como TGF- β 3 para la reparación de heridas de mejor calidad, como se ha visto que ocurre en algunos tejidos dentales (Metcalf y Ferguson, 2007, Eslami et al., 2009). Se ha visto que la terapia celular de ciertas enfermedades y daños a los tejidos utilizando MSC de diversas fuentes ha tenido resultados promisorios, especialmente en lo que se refiere a regeneración de tejidos, efectos anti-cicatriz y angiogénesis y que estos efectos están relacionados más bien con un efecto trófico, más que por un efecto de reemplazo celular (Caplan y Correa, 2011; Meirelles et al., 2009; Horwitz y Prather, 2009).

El aislamiento y las condiciones de expansión del cultivo como la densidad de sembrado, el medio de cultivo, la suplementación de suero y la extensión de la expansión *ex vivo*, pueden impactar significativamente la expresión génica, incluyendo la expresión de citoquinas. Más aún, cultivos en 3D en contraste al cultivo convencional en monocapa puede generar MSC con perfiles de expresión de citoquinas únicos. Estas observaciones sugieren que los protocolos de procesamiento y cultivo *in vitro* pueden ser modificados para aumentar o reprimir la expresión de genes específicos en orden de optimizar el perfil de citoquinas para una indicación clínica en particular (Horwitz y Prather, 2009).

Se ha comprobado que MSC cultivadas *in vitro* secretan varias citoquinas (incluyendo factores de crecimiento) como VEGF, bFGF, IL-6, PlGF (factor de crecimiento de placenta), EGF, LIF, varias interleuquinas, entre muchas otras citoquinas (Kinnaird et al., 2004; Park et al., 2007). Sin embargo los niveles de secreción en algunos casos son relativamente bajos para poder tener un uso terapéutico o en ingeniería de tejido, pero presentan la ventaja que en ciertas condiciones, esta secreción se mantiene estable durante el tiempo (Kagiyada et al., 2008). Dada la importancia que tendrían los factores secretados por MSC, es de especial interés aplicar la capacidad trófica de estas células con fines terapéuticos, sumándole a sus propiedades como células madre.

En esta investigación se propone que la capacidad de una MSC de secretar estos componentes bioactivos se podría manejar *in vitro*, al igual como se estimula la diferenciación a distintos linajes celulares, produciendo una activación de MSC a un fenotipo sobre-secretor de algún factor de crecimiento en particular, en este caso de TGF- β 3. Esto se puede manejar mediante señales específicas

que estimulen la generación del nuevo fenotipo. Esta aproximación tendría ciertas ventajas con respecto a generar una célula sobre-secretora mediante ingeniería genética, primero porque manipular genéticamente este tipo de células es posible, pero los rendimientos son muy bajos y su naturaleza de cultivo primario las hace muy difíciles de trabajar. Además los niveles de secreción que se pueden obtener manejando de manera “epigenética” la adquisición de este fenotipo u otro pueden estar muy cercanos a lo que se lograría mediante modificación genética (Hao et al., 2008; Somoza et al., 2010; Acevedo et al., 2010). Por otra parte el uso de células genéticamente modificadas para ser implantadas en el paciente tiene todavía muchos aspectos relacionados con su inocuidad que no han sido determinados inequívocamente por lo que su uso no está clínicamente aceptado.

HIPÓTESIS

Poblaciones seleccionadas de células madre mesenquimáticas secretan mayor cantidad de TGF- β 3 cuando son cultivadas dentro de una matriz tridimensional (3D) comparado con el crecimiento en condiciones convencionales de cultivo en monocapa.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar las condiciones de crecimiento que permitan que células madre seleccionadas incrementen la secreción de TGF- β 3 con respecto al cultivo convencional en monocapa

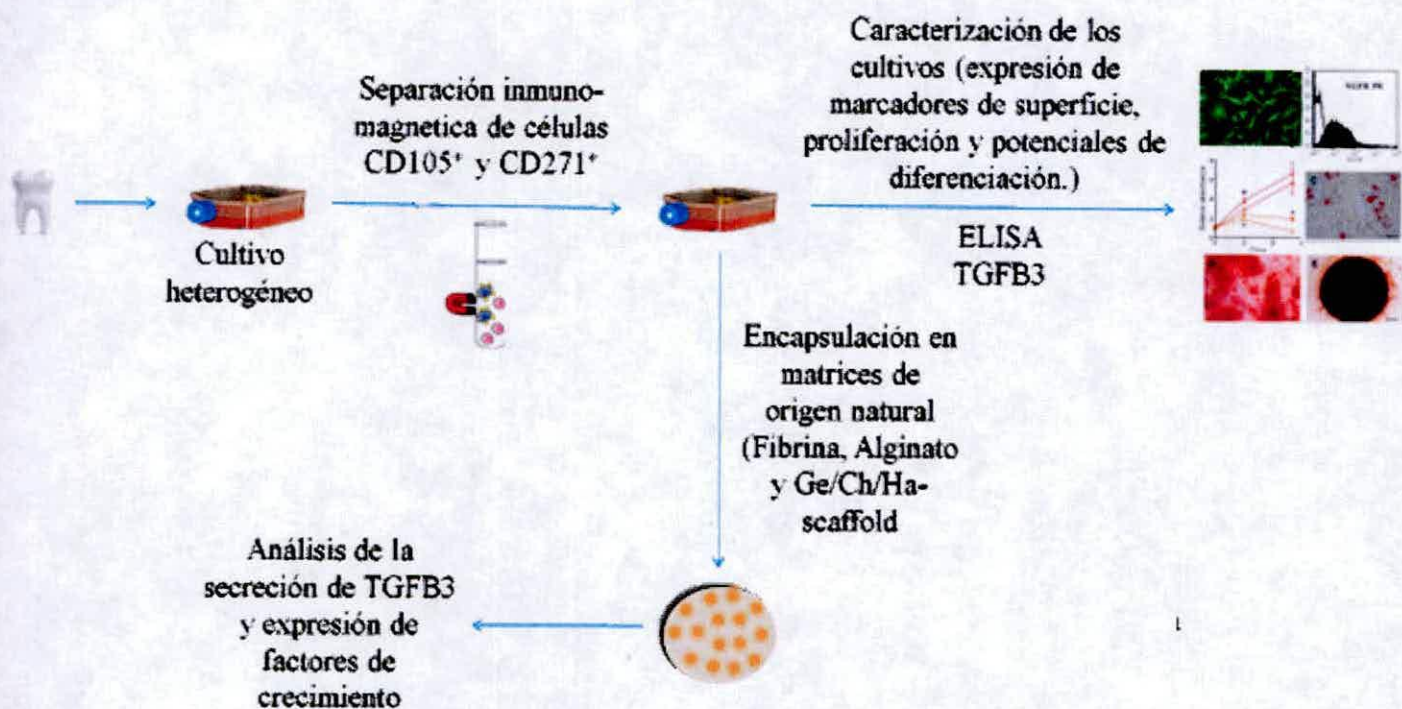
Objetivos específicos

Obtener, aislar y seleccionar MSC con capacidad proliferativa y de diferenciación desde cultivos de células de tejidos dentales.

Determinar secreción de TGF- β 3 por MSC cultivadas en monocapa

Establecer las condiciones de cultivo en tres dimensiones (3D) que permitan que MSC de origen dental seleccionadas, sobre-secreten TGF- β 3.

ESQUEMA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

(Objetivo 1)

1. Cultivos celulares

Las células para cultivos celulares se aislaron desde tejidos dentales humanos a partir de dientes que han sido extraídos por razones de ortodoncia y que eran material de desecho, previa firma de consentimiento informado por el paciente.

1.1 Ligamento periodontal: las células aisladas de este tejido se denominan células del ligamento periodontal (PDL). El ligamento periodontal se obtiene desde el tercio medio de la superficie de la raíz (Figura 5A). La pieza dental se recibe inmediatamente después de haber sido extraída en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 (Hyclone Thermo Scientific, EEUU) suplementado con antibiótico (estreptomicina/penicilina) 100 ug/ y 100 U/ml respectivamente (Gibco, EEUU). En un gabinete de Bioseguridad (Forma Class II A2, Thermo Corporation, EEUU), se procesa el tejido raspando mediante el uso de un bisturí la sección de la pieza dental donde se encuentra el mismo, se lava tres veces con PBS con antibiótico y luego el tejido se corta en pedazos de aproximadamente 1-2 mm y se siembra en placas de cultivo de 10 cm² en medio de cultivo DMEM (Hyclone Thermo Scientific, EEUU) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Biological Industries, Israel) y antibiótico (Medio completo). La placa se mantiene en un incubador (Thermo Forma Direct Heat CO₂ Incubator, Thermo Scientific, EEUU) a 37°C, 5% CO₂ en ambiente humidificado. El tejido (explante) en el medio de cultivo completo se mantiene en el incubador por varios días hasta que se observen al microscopio las células creciendo fuera del explante. Una vez que el cultivo se encuentra a un 80% de confluencia las células se despegan de la placa de cultivo con tripsina 0,25% (p/v), EDTA 2,65 mM (Gibco, Invitrogen, EEUU) (tripsinización) y se cuentan en cámara de Neubauer mediante la técnica de exclusión celular con azul de tripán (Gibco, Invitrogen, EEUU). El cultivo se expande hasta obtener un número adecuado de células (aproximadamente 1×10^7 células) para realizar los experimentos posteriores.

1.2. Folículo periapical de la raíz: Las células aisladas de este tejido se denominan células del folículo periapical de la raíz (PRPC). El procedimiento para aislarlas es el mismo que se describió para PDLC, sin embargo el explante proviene del tejido que cubre la base de la raíz en desarrollo (Figura 5B).

1.3. Encía: las células aisladas desde este tejido se denominan células gingivales, el procedimiento es idéntico al descrito anteriormente, el tejido se obtiene de la sección de la encía que queda adherida a la pieza dental después de la extracción (Figura 5B flecha).

2. Separación inmuno-magnética de sub-poblaciones celulares

Para obtener las sub-poblaciones celulares de interés se utilizó la técnica de separación inmuno-magnética. En esta técnica se aprovecha la interacción de antígenos de superficie específicos que expresan las células, con microesferas súper-paramagnéticas de poliestireno de 4,5 μm de diámetro, recubiertas con anticuerpos primarios o secundarios. Estas microesferas corresponden a la tecnología Dynabeads de Invitrogen (EEUU). Se utilizó un kit de Dynabeads que permite que después de la separación, las células puedan ser aisladas de las microesferas magnéticas (CELLlection Pan Mouse IgG Kit, Invitrogen). Estas microesferas están cubiertas con un anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón unido a las microesferas mediante un segmento de DNA. Esta configuración permite utilizar cualquier anticuerpo primario contra el antígeno de interés que haya sido sintetizado en ratón y además permite la separación de las células desde la microesfera mediante una DNAsa que corta la unión de DNA, permitiendo así que las células puedan ser cultivadas después de la separación (Figura 7). Las microesferas magnéticas en este sistema no pueden ser reutilizadas.

Para el estudio se separaron 2 sub-poblaciones celulares basándose en la expresión de los marcadores de superficie CD271 y CD105, que se expresan en MSC y que según la literatura presentaría ventajas comparativas con respecto a los cultivos heterogéneos, en relación a su capacidad proliferativa y de diferenciación (Jarocha et al., 2008). A su vez y según la hipótesis planteada, se espera que tengan una mayor capacidad de secreción de factores de crecimiento como TGF- β 3. Finalmente se seleccionó la sub-población que expresaba ambos marcadores (doble marcaje).

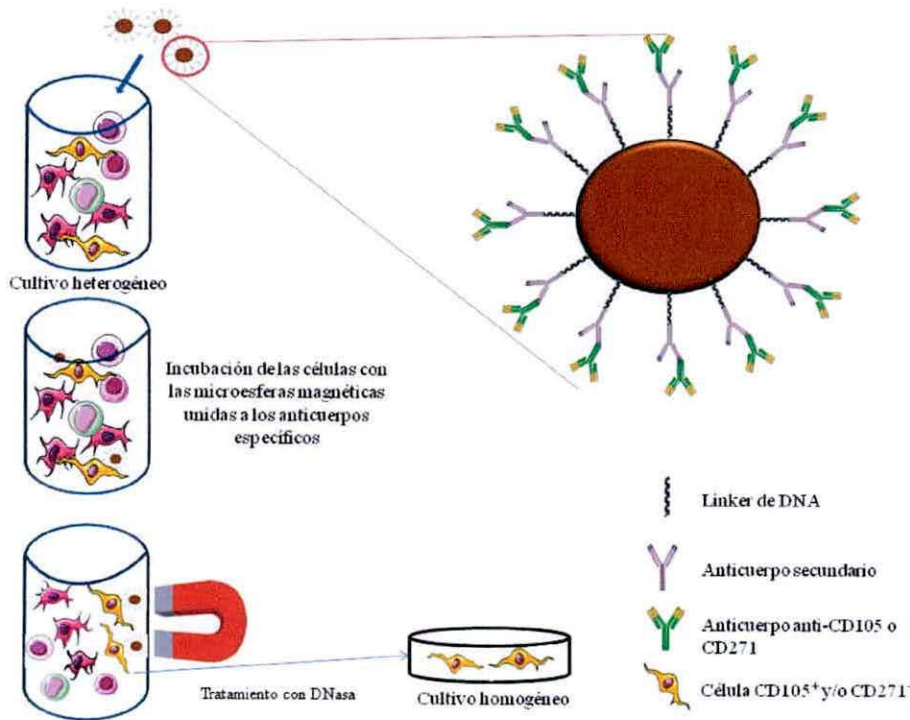


Figura 7. Técnica de la separación inmuno-magnética de células. El sistema corresponde a la tecnología DynaBeads de Invitrogen. Las microesferas paramagnéticas tienen unidos a su superficie anticuerpos anti-IgG de ratón mediante un enlazador (linker) de DNA. Se puede utilizar cualquier anticuerpo monoclonal sintetizado en ratón. Las microesferas se incuban con el anticuerpo primario a utilizar, luego se mezclan con la población celular de la cual se quiere separar la sub-población de interés, en este caso células CD105⁺/CD271⁺. Mediante un imán se separan las sub-poblaciones, luego se realiza un tratamiento con DNasa para separar las células de las microesferas.

El procedimiento se realiza siguiendo el protocolo y las recomendaciones del fabricante. El cultivo heterogéneo de células obtenidas mediante cultivo de explante de los tres tejidos dentales se tripsinizan y se lavan con PBS, luego se centrifugan a 400 x g durante 5 min a temperatura ambiente y se resuspenden a una densidad 1×10^7 células/ml en PBS + 0,1% BSA (Sigma, EEUU) y 0,6% citrato de sodio (Merck, EEUU) a 4°C. En paralelo a la preparación de las células se preparan las microesferas paramagnéticas, para lo cual se lavan 25 μ l de solución con microesferas (equivalente a 1×10^7 microesferas) con PBS + 0,1% BSA, pH 7,4. Para esto se coloca el tubo en el imán permitiendo así la

separación de las microesferas de la solución, finalmente se resuspenden en 25 μ l de buffer 1. Una vez finalizado el proceso de lavado se mezclan las microesferas con 0,5 μ g de anticuerpo primario anti-CD105 (Invitrogen, EEUU) y anti-271 (Abcam, EEUU) la solución se incuba 1 h a 4°C con rotación y mezclado. Luego se coloca el tubo en el imán durante 1 min, se descarta el sobrenadante y se lava 2 veces con 2 ml de con PBS + 0,1% BSA, pH 7,4. Finalizado el proceso de recubrimiento de las microesferas con los anticuerpos primarios de interés se agregan 25 μ l de éstas a 1×10^7 células. La solución de las células con las microesferas se incuba durante 1 h a 4°C con rotación y volteo. Finalizada la incubación se coloca el tubo en el imán durante 2 min. Luego se retira el sobrenadante (que corresponde a la sub-población negativa). El sobrenadante se resuspende en medio completo y se siembra en frasco de cultivo de 25 cm^2 (Nunc, Termofisher, Denmark). Las células que permanecen unidas al imán se lavan 3 veces resuspendiendo en con PBS + 0,1% BSA, pH 7,4. Finalmente las células unidas a las microesferas se resuspenden en 200 μ l de RPMI 1640 (Hyclone Thermo Scientific, EEUU) + 1% SFB, CaCl_2 1mM y MgCl_2 4 mM, pH 7,0-7,4 a 37°C. Para separar a las células de las microesferas se agregan 4 μ l del “realising buffer” que contiene la DNasa (Invitrogen, EEUU), se incuba durante 15 min mezclando y en rotación, luego se coloca el tubo en el imán durante 2 min y sobrenadante se retira y se procede a sembrar las células ya liberadas en frascos de cultivo de 25 cm^2 . Ambas sub-poblaciones, la negativa y la positiva para los marcadores elegidos, se cultivan hasta confluencia. Estos cultivos se expanden hasta frascos de cultivo de 75 cm^2 para tener un número suficiente de células para realizar los experimentos posteriores y para criopreservación.

3. Caracterización de los cultivos

Los cultivos de MSC se caracterizan por tener células adherentes con morfología fibroblastoide, tener la capacidad de diferenciarse a por lo menos tres linajes mesenquimáticos como son el linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico y expresar un panel característico de marcadores de superficie. Como parte de la caracterización, también se evaluó cualitativamente la diferenciación neural, para determinar si los cultivos obtenidos tienen la plasticidad celular descrita para MSC de otros tejidos (revisado en Somoza y Rubio, 2012).

3.1. Diferenciación al linaje adipogénico.

Las MSC se siembran a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm² en medio de cultivo completo. Luego de 24 h, el medio de cultivo se cambia por el medio de diferenciación adipogénico que contiene dexametasona 1 μ M (Santa Cruz Biotechnology, EEUU), isobutil-metil-xantina (IBMX) 100 μ g/ml (Santa Cruz Biotechnology, EEUU), Insulina 0,2 U/ml (Humalog, Indianapolis, EEUU), Indometacina 100 μ M (Santa Cruz Biotechnology, EEUU). Luego de 10 días, cambiando el medio 2 veces a la semana, se chequea la aparición de gotas de grasa intracelulares observando en el microscopio óptico invertido. Se realiza en ese momento la tinción con Oil Red O que se considera diagnóstica de la diferenciación adipogénica.

3.1.2 Tinción con Oil Red O

Se prepara una solución Oil Red O (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) saturado en isopropanol 60% (v/v). Para ello, se entibia a 37 °C, luego se agrega Oil Red O hasta generar una solución saturada y se filtra con un filtro de 0,2 μ m (Merck Millipore, EEUU). Las células se lavan 2 veces con 0,25 ml/cm² de PBS. Se agregan 0,25 ml/cm² de Oil Red O saturado en isopropanol y se incuba 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se lava 2 veces con 0,25 ml/cm² PBS y se observan las gotas de grasa teñidas de color rojo en el microscopio óptico invertido con contraste de fase.

3.2 Diferenciación al linaje osteogénico.

Las MSC se siembran a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm² en medio de cultivo completo. Luego de 24 h, el medio de cultivo se cambia por el medio de diferenciación osteogénico que contiene dexametasona 0,1 μ M, ascorbato-2-fosfato 50 μ g/ml (Santa Cruz Biotechnology, EEUU), β -glicero-fosfato 10 mM (Santa Cruz Biotechnology, EEUU). El medio se cambia cada 2 días agregando ascorbato-2-fosfato día por medio. Al día 21 de iniciada la diferenciación, las células se tiñen con Alizarín Red para detectar la mineralización de la matriz extracelular.

3.2.1 Tinción con Alizarín Red

Las células se lavan 2 veces con 0,25 ml/cm² de PBS luego se fijan con etanol 70% durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavan nuevamente con 0,25 ml/cm² de PBS, luego se incuban con 0,25 ml/cm² de una solución Alizarín Red (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) en NaH₂PO₄ 40 mM durante

10 min a temperatura ambiente. Después de lavar 5 veces con agua bidestilada ($0,5 \text{ ml/cm}^2$) se incuban con $0,25 \text{ ml/cm}^2$ de PBS durante 15 min a temperatura ambiente y finalmente se observa el precipitado rojo de hidroxapatita en el microscopio óptico invertido con contraste de fase.

3.3 Diferenciación al linaje condrogénico

Las células se siembran en microgota (5×10^3 células/ μl) para lograr la densidad y conformación tridimensional necesarias para inducir la formación de una micromasa. Transcurridas 2 h se reemplaza el medio de cultivo completo por medio de diferenciación condrogénico que contiene dexametasona $0,1 \mu\text{M}$, ascorbato-2-fosfato $50 \mu\text{g/ml}$, insulina $0,5 \text{ U/ml}$ y TGF- $\beta 3$ 10 ng/ml (Gibco, Invitrogen, EEUU). Luego de 7 días, cambiando el medio de diferenciación 2 veces a la semana y agregando ascorbato-2-fosfato día por medio, las células se tiñen con Safranina O para analizar la mantención de la micromasa y la síntesis de proteoglicanos.

3.3.1 Tinción con Safranina O

Se prepara una solución Safranina O (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) al 0,1% (p/v) en etanol. Las células se lavan 2 veces con $0,25 \text{ ml/cm}^2$ PBS y se fijan con $0,15 \text{ ml/cm}^2$ de etanol al 70% (v/v) durante 10 min, luego se agrega $0,15 \text{ ml/cm}^2$ de Safranina O y se incuba 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se lava 1 vez con $0,25 \text{ ml/cm}^2$ de agua destilada, 5 veces con $0,15 \text{ ml/cm}^2$ de etanol 70% (v/v) y 1 vez con $0,15 \text{ ml/cm}^2$ de etanol absoluto. Finalmente se observa la micromasa y proteoglicanos teñidos de color rojo al microscopio óptico invertido con contraste de fase.

3.4 Diferenciación neural

Los cultivos de MSC pre-confluentes son tripsinizados y resuspendidos en medio de cultivo. Las células se siembran en placas bacteriológicas no adherentes de 60 mm, con medio de diferenciación compuesto de DMEM/F12 (Gibco, EEUU) suplementado con B27, N2 (ambos de Gibco, EEUU), el medio es suplementado cada 2 o 3 días con EGF y FGF (R&D Systems, Inc. EEUU) a una concentración de 10 ng/mL , para permitir la agregación celular y la formación de neuroesferas. Luego del período de agregación celular, las neuroesferas son transferidas a placas de cultivo adherentes con cubre objetos previamente tratados con Poli-L-Lisina para continuar con el proceso de diferenciación. Después del protocolo neural se evalúa mediante inmuno-citofluorescencia la expresión de dos

marcadores del linaje neural, GFAP (marcador temprano de astrocito) y GAP43 (marcador de neuronal).

3.5 Proliferación y viabilidad celular

3.5.1 Exclusión de Azul de Tripán

Para realizar el conteo celular después de cada tripsinización se utiliza la técnica de exclusión celular mediante azul de tripan, esta técnica se basa en que el azul de tripan puede penetrar la membrana de las células que han perdido sus integridad y por lo tanto están muertas y no así la membrana de las células que están vivas, distinguiéndose al microscopio las células muertas de las vivas. Para realizar el recuento celular se utiliza una cámara de Neubauer tiñendo las células con azul tripán 0,4% (p/v) (Gibco, Grand Island, NY, EEUU). Para ello las células se diluyen 1:1 con azul tripán y se cuentan al microscopio óptico (x10) en 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer. La densidad celular se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

Densidad celular: [células/ml] = Promedio n° células contadas/4 x 10^4 x 2

El número total de células se calcula multiplicando la densidad celular por el volumen total en el cual se resuspendieron.

3.5.2 Ensayo colorimétrico WST-1

Para analizar la viabilidad celular y proliferación se utilizará el ensayo colorimétrico WST-1 (Roche, Alemania). Este ensayo se basa en medir la actividad metabólica de las células en cultivo midiendo la actividad mitocondrial. WST-1 es una sal de tetrazolium, la cual solo puede ser metabolizada por células viables para dar origen a un compuesto soluble y coloreado llamado formazan, que puede ser rápidamente cuantificado leyendo en espectrofotómetro la absorbancia a 570 nm. La cantidad de formazan formado está directamente relacionado con la cantidad de células metabólicamente activas en el cultivo, permitiendo determinar su viabilidad y capacidad proliferativa, tanto en cultivos en monocapa como en cultivos en 3D.

Para realizar el procedimiento, se siembran las células a una densidad inicial de 4×10^3 células/cm² y a las 24 h se agrega medio DMEM sin SFB + 20% (v/v) WST-1 y se incuban durante 4 h a 37 °C.

Posteriormente se determina la absorbancia a 450 nm (referencia 595 nm) en un lector de microplacas. Los valores de A_{450} se normalizan con respecto al blanco y al valor inicial (día 0).

3.5.3 Ensayo live/dead

Para observar la localización y la viabilidad de las células inmovilizadas en alginato y fibrina se utilizara un ensayo viabilidad/citotoxicidad que permite distinguir células vivas y muertas por diferencias de color al ser observadas en microscopio de fluorescencia. El método se basa en que las células vivas se distinguen por una actividad esterasa ubicua, determinada por la conversión enzimática de la calceína AM permeable a las células, a una calceína fluorescente. Esta forma de la calceína se retiene dentro de la célula viva produciendo un intenso color verde fluorescente. Por otro lado el monómero de etidio (EthD-1) entra en las células con las membranas dañadas, al unirse a los ácidos nucleicos aumenta en 40 veces su fluorescencia produciendo un color rojo fluorescente en las células muertas.

Las cápsulas de alginato y fibrina se incuban 1 h con la solución de calceína AM y EthD-1 (Invitrogen, EEUU). Luego se realiza un corte transversal de la cápsula usando un bisturí y se observa en un microscopio invertido de fluorescencia.

3.6 Citometría de flujo

Un total de 1×10^6 células se fijan en etanol. Fracciones celulares de 3×10^5 se resuspenden en PBS con SFB y se incuban con el anticuerpo primario correspondiente durante 30 min. (CD34 (Beckmann Coulter), CD44 (Caltag), CD45 (Beckmann Coulter), CD73 (BD Pharmingen), CD90 (BD Pharmingen) y CD105 (Caltag)) conjugados con fluorescein isothiocyanate-(FITC) o phycoerytrin-(PE). Posteriormente se lavan dos veces con PBS mediante centrifugación. Luego las células son resuspendidas en 600 μ l de PBS/formaldehído 1%. El análisis de las sub-poblaciones se llevó a cabo en citómetro de flujo Coulter® Epics® XL™, Beckmann Coulter utilizando el programa Coulter® Epics® XL™ adquiriendo 5.000 células por muestra. Se registran tanto los porcentajes de células positivas para cada marcador así como la intensidad media de fluorescencia (MFI).

Para determinar TGF- β 3 intracelular las células se permeabilizan utilizando etanol frío al 70%, este se incubaba con las células en solución durante 10 min. Luego se centrifuga 10 min a 2.000 x g, se elimina

el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 ml de PBS con 2% SFB mantenido a 4°C. La suspensión celular se alícuota en $0,3 \times 10^6$ células/tubo y se centrifuga durante 10 min a 2.000 x g. Luego se agrega el anticuerpo primario anti-TGF- β 3 (R&D Systems, EEUU) en PBS 2% SFB. El anticuerpo y la solución celular se incuban a 4°C durante 1 h. Posteriormente se centrifuga y se agrega el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen, EEUU). Este se incubaba 1 h a 4°C en oscuridad. Finalmente se centrifuga y resuspende en PBS 2% SFB y la solución se pasa por el citómetro.

3.7 Inmuno-citofluorescencia

Las células se siembran en placas con cubreobjetos, posteriormente las células adheridas a los cubreobjetos se fijan con metanol frío durante 10 min. Luego se lavan dos veces con PBS. Posteriormente se agrega PBS 1% Tritón X-100 y se dejan a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se agrega una solución bloqueadora (compuesta de PBS 1% Tritón X-100 suplementada con 2% de SFB), se incubaba a temperatura ambiente por otros 30 minutos. Luego las células se incuban con anticuerpo primario anti-CD105 (1:200) (Invitrogen, EEUU), anti-CD271 (1:500) (Abcam, EEUU), anti-Cx43 (1:500) (Sigma, EEUU) o anti-NeuN (1:300) (Chemicon, EEUU) en la solución bloqueadora, en una cámara húmeda por 3 horas a temperatura ambiente o bien a 4° C toda la noche. Finalizada la incubación se lava 3 veces con solución bloqueadora y se incubaba 30 min con anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 F(AB`)) en oscuridad. Luego se lava 3 veces con solución de bloqueo y se incubaba 10 min con yoduro de propidio, finalmente se lava con solución de bloqueo y se monta los portaobjetos utilizando medio de montaje (Dako, Dinamarca) para ser observado al microscopio de fluorescencia invertido Eclipse TE2000-U (Nikon, Japón).

(Objetivo 2)

4 Cultivo en matrices 3D

4.1 En fibrina

El coágulo de fibrina se prepara con soluciones que contienen fibrinógeno, fibronectina, trombina, factor XIII, plasminógeno y aprotinina. El fibrinógeno es convertido en monómeros de fibrina que son luego entrecruzados por el factor XIII activado, el cual cataliza la formación de enlaces lisil-glutamina covalentes (Bensaid et al., 2002). Para inmovilizar las células en el coágulo de fibrina, éstas se

suspenden en 25 μ L de solución salina (300 mosm) con trombina 7 mg/ml (Sigma, EEUU) y se mezclan con igual volumen de una solución de fibrinógeno 54 mg/ml de proteína coagulable (Sigma, EEUU) (Acevedo et al., 2009). La mezcla de la trombina con las células y el fibrinógeno se realiza sobre cada pocillo de una placa de 24 pocillos (1,9 cm²). Se espera 5 minutos a que se forme el coágulo y luego se agrega el medio de cultivo completo.

4.2 En alginato

Se utiliza una solución de alginato al 1,2% que contiene las células a inmovilizar en una densidad de $0,4 \times 10^6$ células/ml. Esta solución se hace pasar por una jeringa de 22G lentamente, luego las gotas se reciben en una solución de cloruro de calcio 100 mM con agitación constante. En agitación se incuban las cápsulas en el cloruro de calcio durante 10 min. Se espera un minuto hasta que las capsulas decanten y luego se retira el cloruro de calcio, finalmente se lavan las capsulas tres veces con cloruro de sodio 9 %. Luego se depositan las cápsulas en placas de 24 pocillos y se le agrega el medio completo de cultivo.

4.3 Cultivo en Sistema de Implante Integrado SII

El sistema de implante integrado (SII) es una matriz polimérica a base de quitosano/gelatina/ácido hialurónico. Para su síntesis se siguió el procedimiento descrito por Liu et al, 2004. Una solución de gelatina grado USP (1% p/v) (Merck, Alemania) se mezcla con una solución de quitosano (2% p/v) (Sigma, Alemania) en una solución de ácido acético (1% v/v) y ácido hialurónico (0,01% p/v) (Sigma, Alemania) a una razón de 7:2:1 a 50°C en una placa petri. Luego la mezcla se enfría, se congela y se liofiliza. Luego de generada la matriz polimérica esta se entrecruza usando ácido sulfónico 2-morfolina-etano (MES) 50 mM, carbodiimida 1-etil-(3,3-dimetil-aminopropilo) (EDC) 20 Mm y N-hidroxisuccinimida (NHS) 8 mM. Luego de este proceso la matriz se lava con etanol y se somete a liofilización, obteniéndose así una matriz seca y estable (Liu et al, 2004). Luego la matriz de Gelatina/Quitosano/Ácido Hialurónico se corta en pedazos de 1x1 cm y posteriormente se desinfecta con etanol al 75% durante 24 h. La matriz desinfectada se seca usando papel filtro estéril y se suspende en medio de cultivo completo durante 24 h. Posteriormente los trozos de matriz se secan en papel filtro estéril y se depositan en placas de 24 pocillos, luego las células se siembran en la matriz utilizando

gelificación *in situ* (Young et al., 2006), para esto 4×10^2 células/ μl de trombina en solución salina se mezclan con 25 μl de fibrinógeno (20 mg/ml de proteína coagulable), directamente sobre la matriz. Después de 5 min se agrega el medio de cultivo completo.

5. Obtención de medio condicionado

Con el objetivo de determinar las concentraciones de TGF- β 3 secretado por las células, el consumo de glucosa y la producción de lactato, se recolectan muestras de medio a distintos tiempos post-siembra. Luego el medio se centrifuga a 2.500 x g para descartar células o restos celulares. Todos los medios condicionados se almacenan en un freezer a -80°C para los análisis posteriores.

Los experimentos en las distintas condiciones, cultivo en monocapa, en fibrina, alginato y SII, se realizaron al menos por triplicado en experimentos independientes (utilizando células obtenidas desde tejidos dentales de distintos pacientes). El medio condicionado se recolectó a 24, 48 y 72 h. La concentración celular se mantuvo constante en todas las condiciones (2×10^5 células/pocillo). El ensayo de viabilidad celular utilizando WST-1 se efectuó en el mismo momento en que se recolectó el medio condicionado. Además en otro pocillo sometido a las mismas condiciones se retira el medio y se procede a la extracción de RNA desde las células en cultivo. Los medios condicionados recolectados se utilizaron para el ensayo ELISA (previa activación de TGF- β 3) y para determinar el consumo de glucosa y la producción de lactato.

5.1 Determinación del consumo de glucosa

Los medios condicionados en las distintas condiciones estudiadas se retiran de la placa de cultivo, se filtran utilizando filtros de jeringa de 0,22 μm (Millipore, EEUU). Luego a 50 μl de medio condicionado se le agrega 1000 μl del reactivo Glucose liquicolor (Human, Alemania), que se basa en la determinación de la glucosa después de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y se determina la absorbancia a 500 nm de la muestra y el reactivo estándar provisto por el fabricante. La concentración de glucosa se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C = \frac{5,55 \times \Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{estándar}}} \quad [\text{mmol/l}]$$

5.2 Determinación de la producción de lactato

Los medios condicionados en las distintas condiciones estudiadas se retiran de la placa de cultivo, se filtran utilizando filtros de jeringa de 0,22 μm (Millipore, EEUU). Luego a 10 μl de medio condicionado se le agrega 1000 μl del reactivo Lactate Dry-Fast (Sentinel Diagnostics, Italia). Luego se incuba a 37°C durante 10 min y se determina absorbancia a 550 nm de la muestra y el estándar provisto por el fabricante. La concentración de lactato se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C = \frac{\Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{estándar}}} \times [\text{estándar}] \times 0,1110 \quad [\text{mmol/l}]$$

5.3 Activación de TGF- β 3

TGF- β 3 es secretado por las células tanto en su forma inactiva como activa (Lyons, 1988). El ensayo de ELISA utilizado está diseñado para detectar la forma activa de la proteína, así alícuotas de los medios condicionados de todas las condiciones de cultivo fueron sometidas al protocolo de activación. Para esto se agregan 25 μl de HCl 1 N a 125 μl de medio condicionado. Esta mezcla se incuba por 10 min a temperatura ambiente. Luego se agregan 25 μl de una solución de NaOH 1,2 N y Hepes 0,5 M. Finalmente se agregan 800 μl de BSA 1%.

5.4 Determinación de TGF- β 3 activo mediante Dot-blot

El inmuno ensayo Dot-blot se realizó sobre membranas de nitrocelulosa (Millipore, EEUU). Las membranas se activan 10 min en metanol a temperatura ambiente y luego se depositan 10 μl de medio condicionado (previamente sometido al proceso de activación). Luego se bloquea la membrana con BSA durante 2 h y se incuba con anticuerpo anti-TGF- β 3 (R&D Systems, EEUU) toda la noche a 4°C.

Posteriormente se lava con PBS y se incuba con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, EEUU). Luego se revela utilizando un sustrato de peroxidada para membranas (KPL, EEUU). Se utiliza un estándar comercial como control positivo (Recombinant Human TGF- β 3, Gibco, EEUU).

6. ELISA

Para la detección y cuantificación de TGF- β 3 se utilizó un kit comercial Human TGF- β 3 DuoSet ELISA kit según protocolo del fabricante. Este kit contiene los elementos básicos que se requieren para el desarrollo de ELISA sándwich para medir TGF- β 3. Los pocillos de placas P96 se recubren con un anticuerpo monoclonal anti-TGF- β 3. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno (medios condicionados obtenidos de las distintas condiciones de cultivo), que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-TGF- β 3 marcado con biotina, la detección se realiza agregando streptavidina conjugada con peroxidasa y luego la solución sustrato (H_2O_2 y tetrametilbenzidina), finalmente se determina la concentración del antígeno midiendo absorbancia a 450 nm, extrapolando en una curva de calibración. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (Figura 8).

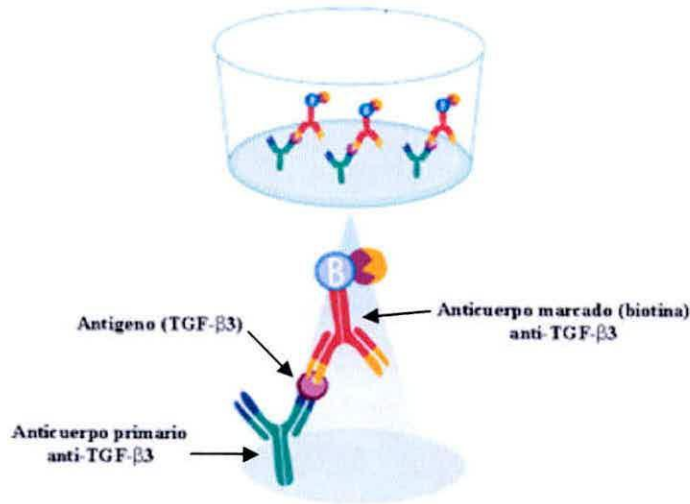


Figura 8. ELISA sandwich. El pocillo se recubre con el primer anticuerpo anti-TGF- β 3, luego se agrega la muestra donde se quiere evaluar la concentración del antígeno, el cual queda inmobilizado. Luego se agrega un segundo anticuerpo anti-TGF- β 3 el cual viene marcado con biotina, posteriormente se adiciona streptovidina-HRP para la detección y cuantificación midiendo absorbancia a 450 nm.

7. Extracción de RNA

7.1 Desde cultivo en monocapa

Después de retirar el medio de cultivo, las células se lavan una vez con PBS y se agrega 0,1 ml/cm² de reactivo Trizol (Invitrogen, EEUU). Luego el lisado se traspasa a un tubo eppendorf libre de RNasa y se incuba 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregan 0,3 ml de cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania) por cada ml de Trizol utilizado, se agita enérgicamente durante 15 s y se deja reposar durante 3 min a temperatura ambiente. Luego se centrifuga durante 15 min a 12.000 x g a 4 °C. La fase acuosa se traspasa a un tubo eppendorf nuevo al que se agregan 0,5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol utilizado. El RNA se deja precipitando en isopropanol durante 48 h a -20 °C. Una vez precipitado el RNA, la muestra se centrifuga durante 10 min a 12.000 x g a 4 °C. El precipitado de RNA se lava con 1 ml de etanol 75% (v/v) preparado en agua libre de RNasa (Hyclone Thermo Scientific, EEUU) y se centrifuga durante 10 min a 12.000 x g a 4 °C. Finalmente se elimina el sobrenadante, dejando evaporar lo que quedó de etanol, se resuspende el RNA en agua libre de RNasa

y se incubó durante 10 min a 65 °C para lograr una mejor disolución del RNA. Finalmente el RNA se guarda a -80 °C para ser utilizado posteriormente.

7.2 Desde fibrina, alginato y SII

La extracción de RNA a partir de matrices ricas en polisacáridos, como las utilizadas en este estudio, representa un problema para la obtención de RNA de calidad, pues estos materiales interfieren con las técnicas de extracción convencionales como Trizol. Por este motivo se adaptó un protocolo descrito anteriormente por Wang y Stegemann, 2010.

Las muestras (células encapsuladas en Fibrina, Alginato y SII) se congelan a -80°C, una vez congeladas se muelen hasta obtener un polvo fino y luego se transfieren a tubo de microcentrífuga libre de RNasa con 600 µl de tampón de extracción previamente temperado a 65°C, compuesto de Cloruro de Benzalconio 2%, polivinilpirrolidona 2% (PVP 40 (Kollidon K-30, Pharma Ingredients, Alemania), NaCl 1.4 M (Merck, Alemania), Tris-HCl 100 mM (Merck, Alemania), EDTA 20 mM (Sigma, EEUU) y beta-mercaptoetanol 1%, preparado en agua libre de RNasa). La solución se agita vigorosamente durante 5 min a temperatura ambiente, luego se agrega un volumen de cloroformo y se centrifuga por 5 min a 15.000 x g a temperatura ambiente. Después de la centrifugación la fase acuosa superior se extrae con un volumen de cloroformo. Luego se mezcla con un volumen de isopropanol y se centrifuga por 15 min a 15.000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante se descarta y el pellet se lava en 1ml de etanol al 75% y se centrifuga nuevamente a 15.000 x g. Luego el pellet es disuelto en 30-50 µl de agua libre de RNasa.

7.3 Cuantificación de RNA

Para la cuantificación del RNA se utiliza el equipo NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, EEUU) para lo cual 1 µl de la muestra de RNA se deposita en el lector y se mide absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm para determinar concentración y pureza del RNA extraído.

8.0 Transcripción reversa

Un µg de RNA total se incubó 10 min a 70 °C con 1 µg de oligodT (Promega, EEUU) en un volumen final de 12 µl en agua libre de RNasa. A continuación se agregó 8 µl de una mezcla que contiene 1 µl

de dNTPs 10 mM (Fermentas Life Sciences, EEUU), tampón de la enzima transcriptasa reversa (RT) M-MLV 1x (Tris-HCl 50 mM [pH 8,3], KCl 7 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM), 1 µl de RT M-MLV 200 U/µl (Promega. Madison, EEUU), inhibidor de RNasa 1x (Fermentas Life Sciences, EEUU) y agua libre de RNasa, de tal manera que la reacción de transcripción reversa ocurre en un volumen final de 20 µl. El cDNA se sintetizó incubando 50 min a 42°C en termociclador. Finalmente la enzima se inactiva incubando 15 min a 70 °C. El cDNA se almacena a -20 °C hasta su análisis.

9.0 Diseño y síntesis de partidores

Los partidores específicos para detectar la expresión de TGF-β3, EGF, FGF-2, VEGF, PDGF y GAPDH fueron diseñados usando el programa AmplifX versión 1.3.7 y sintetizados en Invitrogen. Los liofilizados se resuspendieron a una concentración stock de 100 uM en agua libre de DNasa. Las secuencias de los partidores se muestran en las Tablas 2 y 3.

10. PCR convencional

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 ul, conteniendo 12,5 µl de Master Mix, el cual contiene la DNA polimerasa, los dNTP's, MgCl₂ (Fermentas, EEUU), 1,25 µl de partidor sentido y anti-sentido 10 uM, 8 µl de agua libre de DNasa y 2 µl de cDNA preparado en el paso anterior. La amplificación se realizó en un termociclador Amplitronix 6 (Nyx Tech, EEUU). Las condiciones de amplificación para cada partidor se presentan en la Tabla 3.

11. PCR tiempo Real

Las reacciones de amplificación se realizan en un volumen final de 10 µl que contiene 100 ng de cDNA, mezcla de PCR LightCycler-DNA Máster SYBR Green (Roche, Alemania) (Taq DNA polimerasa + tampón de reacción + dATP + dUTP + dCTP + dGTP + SYBR Green I) + MgCl₂ entre 3-4 mM, partidor sentido 0,5 uM y partidor antisentido 0,5 uM y se realiza la amplificación en un termociclador LightCycler (Roche, Alemania). Las secuencias de los partidores utilizados, el tamaño esperado de los amplicones y sus temperaturas de denaturación se muestran en la Tabla 2. Las concentraciones de enzima, tampón de reacción y dNTPs corresponden a las recomendadas para el kit LightCycler-DNA Máster SYBR Green I de Roche.

La existencia de un solo amplicón se demuestra mediante el análisis de denaturación (Tabla 2) para esto se realiza un ciclo después de la amplificación que consiste en aumentar la temperatura a 95°C a 20°C/s para la denaturación total de la doble hebra, luego bajando la temperatura hasta 65°C a una velocidad de 20°C/s para la renaturación y finalmente elevando la temperatura hasta 95°C a una velocidad de 0,1 °C/s, registrando la pérdida de fluorescencia cada 0,1 °C. Encontrar sólo una temperatura de denaturación comprueba la existencia de un solo producto de amplificación.

El tamaño esperado para cada amplicón se comprueba electroforéticamente. Para ello, se preparan geles de agarosa al 2% conteniendo reactivo Gel-Red (Biotium, EEUU), el cual se intercala en la doble hebra de DNA de los amplicones y permite visualizarlos en el transiluminador. Luego se cargan las muestras junto con un estándar de tamaño molecular de 100 pb (GeneRuler™ DNA Ladder 0,5 ug/ul: Fermentas Life Sciences. Hanover, MD, EEUU). Finalmente los geles se registraran fotográficamente.

Tabla 2. Partidores y características de los amplicones utilizados para evaluar la expresión relativa de TGF-β3 mediante RT-PCR en tiempo real.

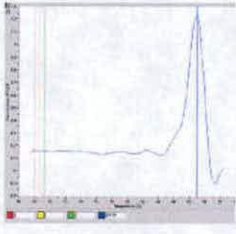
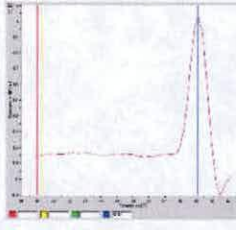
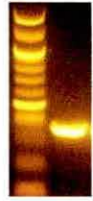
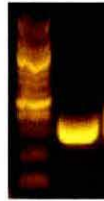

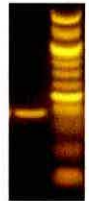
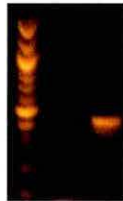
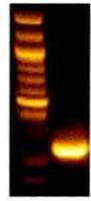
Partidor	Secuencia	Amplicón		
		Tm (°C)	Tamaño (pb)	Análisis de denaturación
TGF-β3	(se) 5'-GATCACCATCGGAAATGAACG-3' (as) 5'-CTTAGAAGCATTTCGCGGTGGA-3'	88±0,8	390	
GAPDH	(se) 5'-CAAATCAAGTGGGGCGATGCTG-3' (as) 5'-TGTGGTCATGAGTCCTCCACGAT-3'	88±0,5	283	

Tabla 3. Partidores utilizados para evaluar la expresión de factores de crecimiento importantes en regeneración/reparación de tejidos, mediante RT-PCR convencional.

Partidores	Secuencia	Denaturación		Apareamiento		Extensión		Nº de ciclos
		T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	
EGF	(se): 5'-TGGCCAGTGGGAATAACGATTGAC-3'	95	5	57	10	72	21	45
	(as): 5'-CACCAAGCAGTTCCAAGCCTCTTT-3'							
FGF-2	(se): 5'-GTGCTAACCGTTACCTGGCTATGA -3'	95	5	55	10	72	13	45
	(as): 5'-TATAGCTTTCTGCCAGGTCCTGT -3'							
VEGF	(se): 5'-TTGCTTGCCATTCCCCACTTGA-3'	95	5	61	10	72	28	45
	(as): 5'-GAACAGCCCAGAAGTTGGACGAAA-3'							
PDGF	(se): 5'-TGAGATGCTGAGTGACCACTCGAT-3'	95	5	60	10	72	28	45
	(as): 5'-CACTGTCTCACACTTGCATGCCA-3'							
GAPDH	(se): 5'-TGTGGTCATGAGTCCTCCACGAT-3'	95	5	57	10	72	17	45
	(as): 5'-CAAAATCAAGTGGGGCGATGCTG-3'							

Tabla 4. Análisis electroforético de los amplicones generados mediante RT-PCR

	TGF-β3	EGF	FGF2	VEGF	PDGF	GAPDH
Electroforesis						
Amplicón (pb)	390	308	206	390	460	283

12. Electroforesis en Agarosa

Se preparó geles de agarosa 1,5-2%, antes que se produjera la gelificación se agregó reactivo GelRed (Biotium, EEUU). Las muestras se cargan junto al estándar de tamaño molecular de 100 pb (GeneRuler™ DNA Ladder 0,5 ug/ul: Fermentas Life Sciences EEUU). Los geles se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta UV500C (YCL Tech, EEUU).

13. Análisis Estadístico

Los resultados son presentados como el promedio \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. La significancia estadística fue analizada mediante prueba t student pareada y un valor p menor a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

14. Análisis de componentes principales

Para generar el modelo estadístico se realizó un análisis de componente principal (ACP). Previo al análisis ACP se realizó un análisis de correlación simple mostrando asociaciones significativas ($p < 0,05$). ACP fue realizado mediante el software SIMCA-P v.11 (UMETRICS). Las variables utilizadas fueron: tiempo, biomasa, concentración de TGF- β 3, concentración de glucosa, concentración de lactato, crecimiento (μ), producción de TGF- β 3 ($Q_{\text{TGF-}\beta 3}$), consumo de glucosa (Q_{glu}), producción de lactato (Q_{lac}), expresión de EGF, PDGF y TGF- β 3. Las observaciones fueron las distintas medidas en el tiempo (0, 24, 48 y 72 h) en monocapa y en matrices.

RESULTADOS

(Objetivo 1)

1. Obtención de cultivos celulares a partir de tejidos dentales

Las piezas dentales obtenidas, previa firma del consentimiento informado, corresponden a pacientes jóvenes cuyas edades van desde los 15-25 años. En los estudios preliminares para optimizar las técnicas de procesamiento de los tejidos, manipulación para mantener la esterilidad y del aislamiento celular, se utilizaron aproximadamente 10 piezas dentales. Para aislar las células que se utilizarían para este estudio se utilizaron piezas dentales que estuvieran en buenas condiciones (sin presencia de caries o enfermedad periodontal) y que además tuvieran todavía raíz en desarrollo, permitiendo así poder obtener el tejido correspondiente a la papila periapical (Figura 5B).

En una primera aproximación se evaluó el aislamiento de células a partir de 4 tipos de tejidos dentales, como son el tejido periodontal (PDL), papila periapical de la raíz (PRP), pulpa (PC) y tejido gingival (GC). Se usó la técnica de explante para el aislamiento de las células (Jo et al., 2007). Esta técnica consiste en cortar los tejidos en pequeños pedazos y sembrarlos en medio completo, permitiendo así que con el tiempo las células migren fuera del explante (Figura 9). Después de pruebas preliminares se descartó el aislamiento de células a partir de la pulpa debido a que no se logró obtener un número adecuado de células por la técnica del explante, pues las pocas células que migraban a la placa de cultivo no proliferaban (Figura 9C), sumado al hecho que es un tejido que no se encuentra muy accesible, excepto cuando el diente era fracturado al momento de la extracción.

El lapso de tiempo que las células se demoraban en migrar fuera del explante osciló entre 5-10 días, siendo las más rápidas en hacerlo las PRPC (Figura 9D), seguidas por las GC (Figura 9B) y finalmente las PDLC (Figura 9A). Al momento en que se observaban las primeras células fuera del explante el tiempo hasta obtener un cultivo confluyente de células osciló entre 5 y 8 días, siendo las PRPC las que proliferaban más rápido y las PDLC las que eran más lentas en llegar a confluencia.

Una vez que los cultivos se encontraban con colonias sub-confluentes se tripsinizaron y se sembraron para la posterior expansión. Los cultivos se utilizaron luego en la siguiente etapa para la separación

inmuno-magnética entre pasajes 2-4. Algunos cultivos se criopreservaron para ser usados posteriormente.

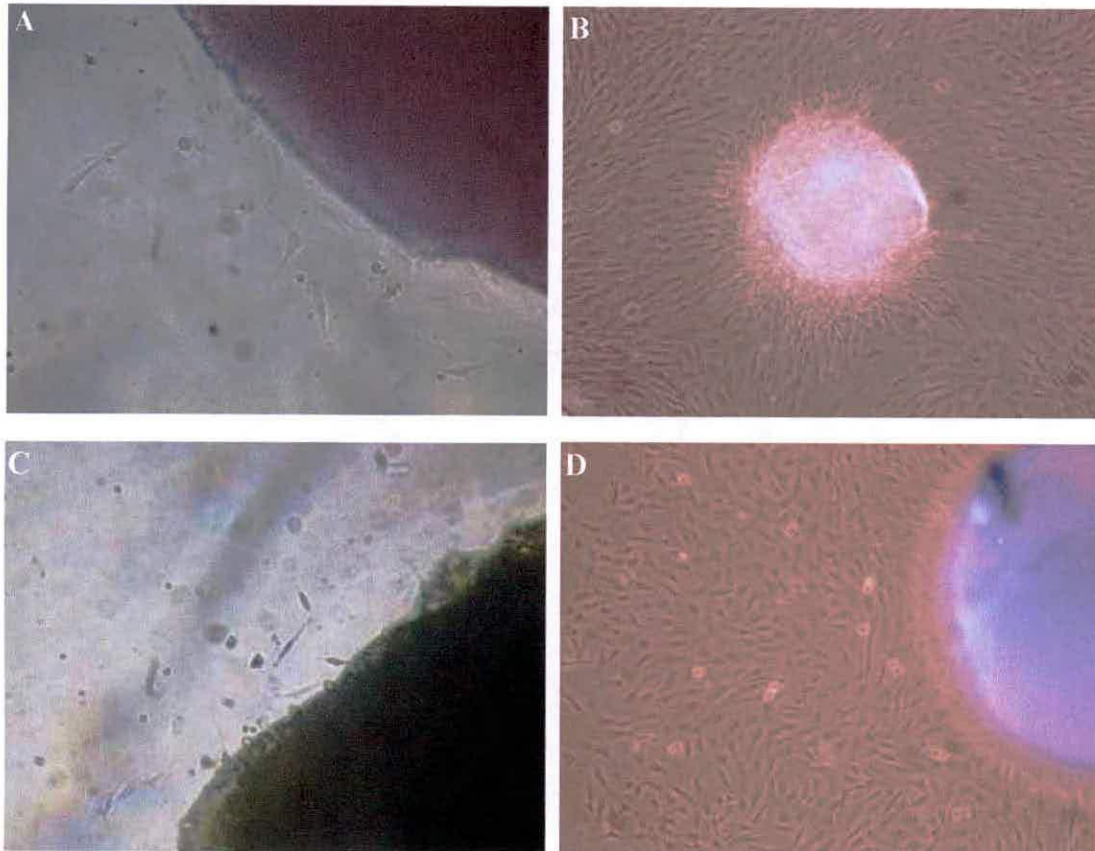


Figura 9. Aislamiento de células a partir de diversos tejidos dentales mediante explante. Células migrando desde el explante obtenido a partir de tejido periodontal después de 7 días de cultivo (**A**). Cultivo celular confluyente obtenido de explante de tejido gingival después de 10 días de cultivo (**B**). Células migrando desde explante de tejido pulpar después de 7 días de cultivo (**C**). Cultivo confluyente de células de la papila periapical de la raíz (**D**).

2. Separación Inmuno-magnética

PRP, PDL y tejido gingival son tejidos dentales de los cuales se han aislado y caracterizado MSC previamente (Jo et al., 2007; Mitrano et al., 2010; Yalvac et al., 2010), en la mayoría de los trabajos publicados se reporta el aislamiento de MSC sin pasar por una etapa previa de purificación, es decir se describen MSC como parte del cultivo heterogéneo. Sin embargo hay antecedentes que la

selección de ciertas sub-poblaciones basándose en la expresión de marcadores de superficie específicos permite una homogenización de los cultivos, además de seleccionar sub-poblaciones celulares con ciertas características ventajosas para lograr objetivos particulares, como por ejemplo, aislar sub-poblaciones con una mayor capacidad proliferativa y de diferenciación (Aslan et al., 2006; Battula et al., 2009; Jarocha et al., 2008a). Así, en este estudio se eligió aislar sub-poblaciones celulares, mediante la técnica de separación inmuno-magnética, que expresaran los marcadores de superficie CD271 y CD105. Ambos marcadores se expresan en MSC aisladas de medula ósea y de otros tejidos. Se ha descrito que MSC que expresan CD271 tienen una mayor capacidad proliferativa (Jarocha et al., 2008a). Por otra parte, CD105 es uno de los marcadores tradicionales de MSC, también se ha descrito que células expresando este marcador tienen propiedades de diferenciación y proliferación favorables (Jarocha et al., 2008a; Roura et al., 2006).

Para la separación inmuno-magnética se utilizaron microesferas paramagnéticas que tienen unido un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón mediante un enlazador de DNA (Figura 7). La ventaja de este sistema es que al final del proceso las células pueden separarse de las microesferas mediante tratamiento con DNasa. Hay otros sistemas de separación como la tecnología MACS[®] que se basa en el uso de microesferas muy pequeñas que son muchas veces fagocitadas por las células, lo que puede generar cambios fenotípicos indeseados, especialmente en MSC que pueden responder de diferentes maneras a estímulos del microambiente.

Cultivos de aproximadamente 1×10^7 células provenientes de los tres tejidos dentales mencionados se usaron para el proceso de separación inmuno-magnética. Del total de la población, la proporción de células CD105⁺/CD271⁺ variaba con respecto al tipo celular (Tabla 5). Del cultivo de GC es donde se obtuvieron el mayor número de células CD105⁺/CD271⁺. Sin embargo estas fueron más tarde excluidas del estudio debido a que no se diferenciaban al linaje adipogénico y no siempre los cultivos se diferenciaron al linaje condrogénico (datos no mostrados). La separación inmuno-magnética se realizó por lo menos tres veces para cada tipo de cultivo, en todos los casos también se cultivaron las células que eran negativas para los marcadores con el objetivo de comparar capacidad proliferativa y de diferenciación.

Tabla 5. Eficiencia del aislamiento de células CD105⁺/CD271⁺ a partir de cultivos celulares heterogéneos aislados desde tejidos dentales

Células	Células CD105 ⁺ /CD271 ⁺ (% de la cantidad inicial de células)
PRPC	1,2 ± 0.9%
PDLC	0,36 ± 0.06%
GC	10 ± 1.5%

El proceso de separación inmuno-magnética en general no afectó la viabilidad de las células (tanto para la población positiva como para la negativa). En la Figura 10A y 10B se muestran células que pasaron por el proceso de separación y que se fotografiaron antes del tratamiento con DNasa. Se puede apreciar células negativas para los marcadores y células positivas (las microesferas se observan adheridas a las células positivas). Como se realizó una separación basada en la expresión de dos marcadores la sub-población aislada será heterogénea respecto a células que expresan uno de los dos marcadores o ambos. Para verificar que las células aisladas correspondieran a células CD105⁺/CD271⁺ se realizó una inmuno-citofluorescencia para determinar que las células aisladas expresaban los marcadores (Figura 10C, D).

3. Caracterización de los cultivos obtenidos mediante separación inmuno-magnética

3.1 Morfología

Morfológicamente los cultivos de células CD105⁺/CD271⁺ y CD105⁻/CD271⁻ no presentaban diferencias evidentes al momento de ser cultivadas después de la separación inmuno-magnética (Figura 11).

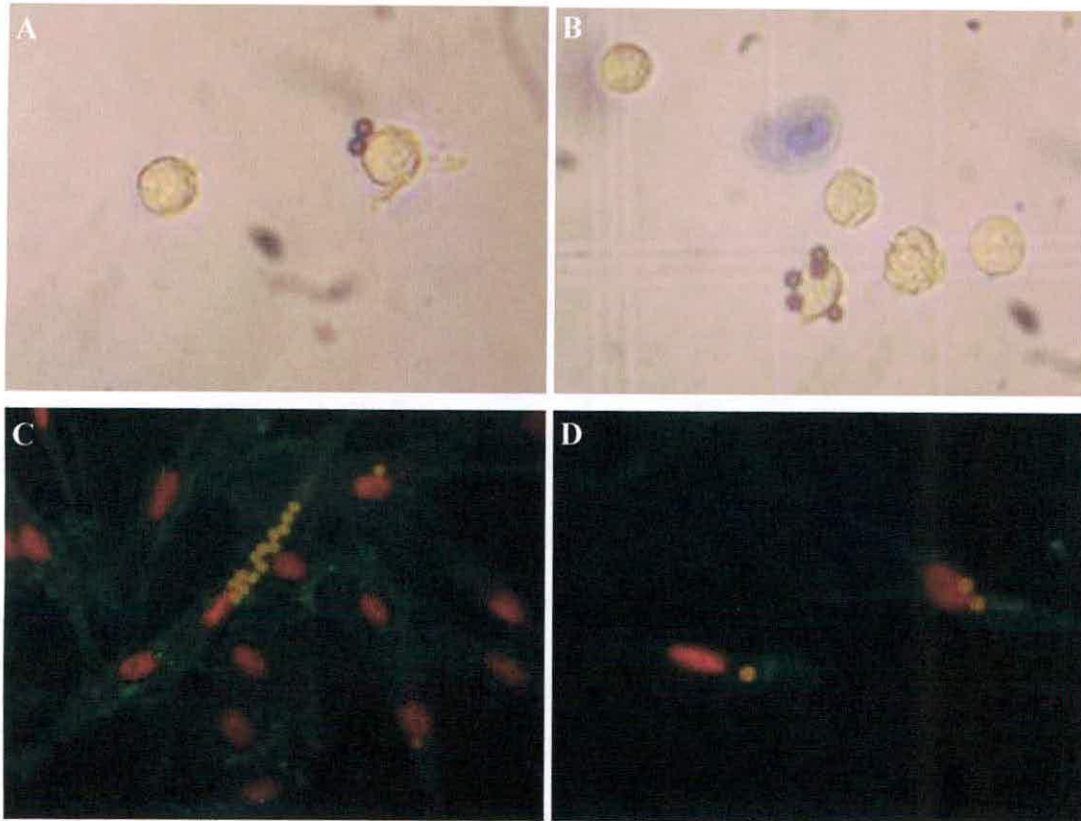


Figura 10. Separación inmuno-magnética de sub-poblaciones celulares $CD105^+/CD271^+$. Células PRPC incubadas con las microesferas magnéticas y fotografiadas antes de realizar el tratamiento con DNasa. Se observan células negativas y positivas para los marcadores (A). Células PDLC (B). Inmuno-citofluorescencia de células PDLC utilizando anticuerpo anti-CD105 (C) y anti-CD271 (D) Para la inmunofluorescencia se utilizó anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488.

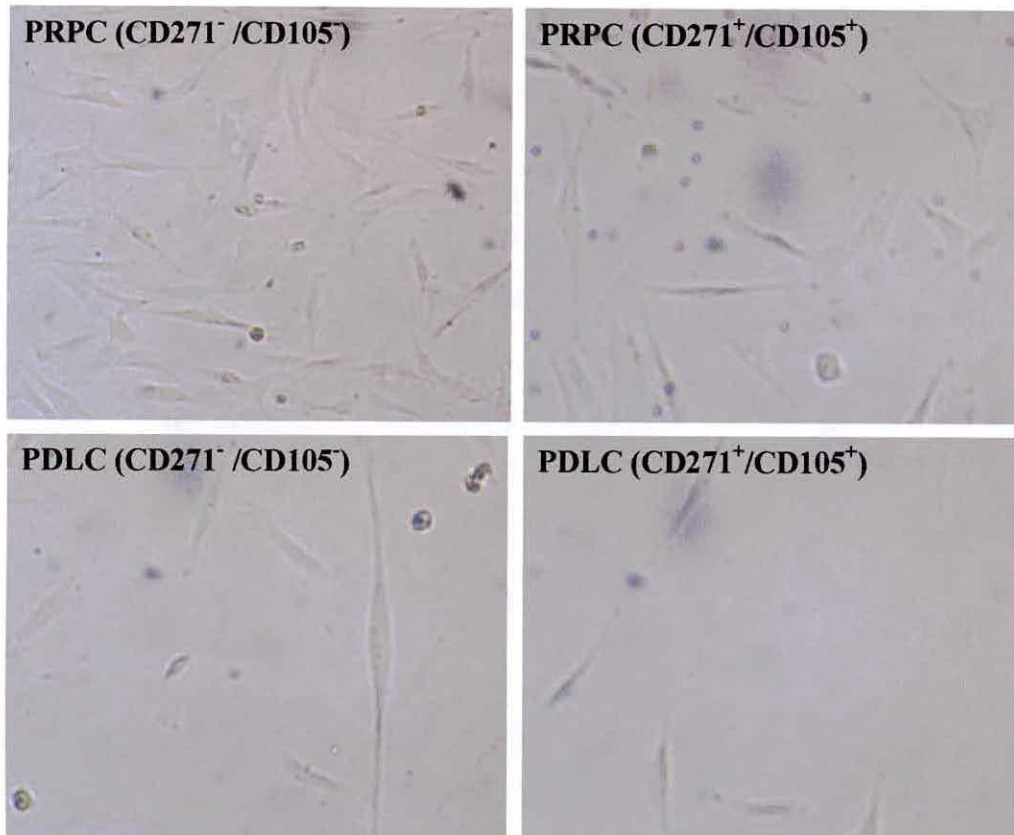


Figura 11. Morfología de sub-poblaciones positivas y negativas correspondientes al pasaje 0 después del proceso de separación. Se observa que estas no presentan diferencias morfológicas evidentes.

3.2 Proliferación

Observaciones cualitativas iniciales daban cuenta de que las células PRPC tenían mejor capacidad proliferativa que las otras células evaluadas, esto era evidente al notar que alcanzaban confluencia más rápidamente una vez que emigraban desde el explante. También se observaron diferencias en la proliferación entre células positivas y negativas para los marcadores mediante los cuales se aislaron las sub-poblaciones (Figura 12). Se observó que las células que expresaban los marcadores y, por lo tanto, componen la sub-población positiva, tanto PRPC como PDLC, presentaban una proliferación más rápida (Figura 12) lo cual se refleja en un tiempo de duplicación poblacional (TDP) menor (Figura 12). Por lo tanto, la separación inmuno-magnética utilizando los marcadores seleccionados, permitió

recuperar una población de células con una proliferación mayor. También se observa que las células PRPC, tanto positivas como negativas, presentan una proliferación mayor y un TDP menor en comparación con células PDLC.

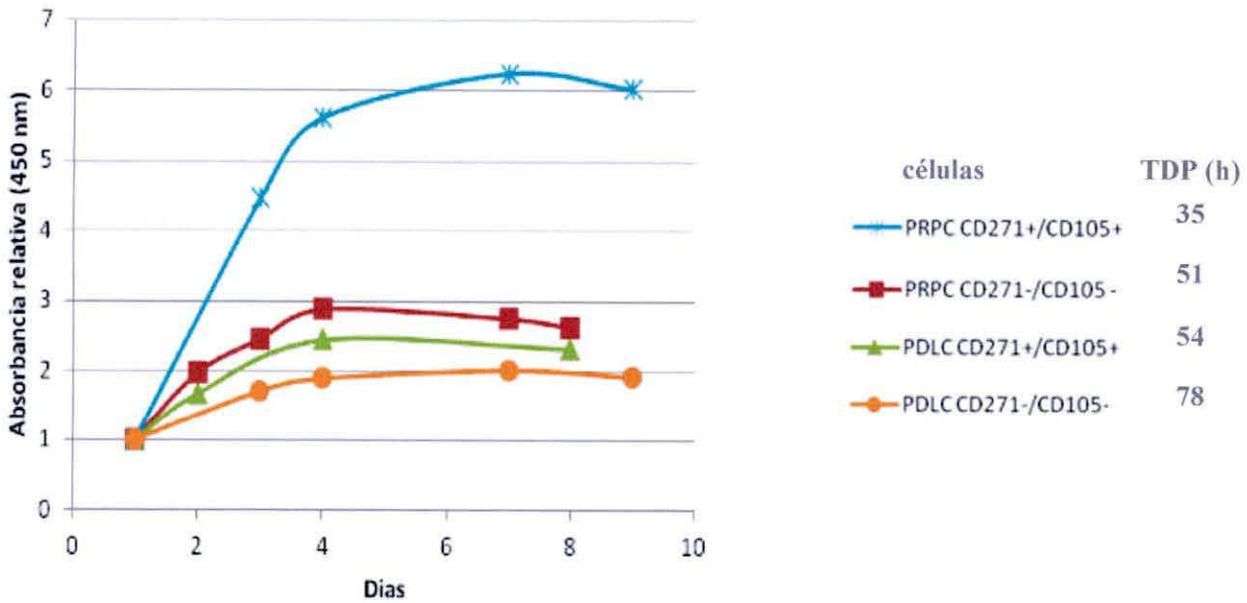


Figura 12. Comparación de la capacidad proliferativa entre sub-poblaciones negativas y positivas de cultivos de células PRPC y PDLC. Las células se sembraron a una densidad de 4×10^3 células/cm² y se cultivaron a diferentes tiempos (0, 3, 4, 7, 8 y 9 días). Se determinó la proliferación mediante el ensayo colorimétrico WST-1. El TDP se calculó a partir de la pendiente de la fase exponencial de crecimiento.

3.2 Diferenciación a linajes mesenquimáticos

Las células provenientes de ambos tejidos dentales y separadas inmuno-magnéticamente se caracterizaron de acuerdo a su potencial de diferenciación a los linajes mesenquimáticos. Se observó en ambos tipos celulares (PRPC y PDLC), que las sub-poblaciones positivas tenían el potencial de diferenciarse a los tres linajes mesenquimáticos evaluados (Tabla 6, Figura 13). Ambas sub-poblaciones negativas no poseían el potencial de diferenciarse a adipocitos y no siempre formaban micromasa en la diferenciación condrogénica.

Tabla 6. Inducción de la diferenciación adipo-, osteo- y condrogénica de cultivos de PRPC y PDLC CD105⁺/CD271⁺ y CD105⁻/CD271⁻. El signo ± indica que las células, en algunos casos, no mantuvieron la condición de micromasa en la diferenciación condrogénica, lo que implica que la diferenciación debe considerarse negativa. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes.

Células	Diferenciación		
	Adipogénica	Osteogénica	Condrogénica
PRPC (CD271 ⁻ /CD105 ⁻)	-	+	±
PRPC (CD271 ⁺ /CD105 ⁺)	+	+	+
PDLC (CD271 ⁻ /CD105 ⁻)	-	+	±
PDLC (CD271 ⁺ /CD105 ⁺)	+	+	+

Todos los experimentos de caracterización de las células aisladas se basaron en recomendaciones emitidas por la Sociedad Internacional de Terapia celular con el objetivo de definir las como MSC (Dominici et al., 2006). Dentro de las recomendaciones se sugiere evaluar al menos diferenciación a tres linajes mesenquimáticos, lo que de acuerdo a los resultados mostrados en la figura 13 se cumplen para las sub-poblaciones CD105⁺/CD271⁺. Por otro lado las MSC deben tener capacidad de adherirse a la placa de cultivo y tener morfología fibroblastoide (Figura 13A, B). Por otro lado, las MSC deben tener un perfil de expresión de marcadores de superficie característico, siendo positivas para CD105, CD73, CD44 y negativas para los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 (Figura 14).

Como se mencionó anteriormente, las células aisladas desde tejido de encía (GC) no se diferenciaron al linaje adipogénico bajo las condiciones experimentales de esta investigación (otros autores si han descrito la diferenciación de estas células al linaje adipogénico). Esto a pesar que los cultivos de GC presentaron el mayor porcentaje de células CD105⁺/CD271⁺ como se muestra en la Tabla 6. Este resultado hace evidente que la expresión de marcadores por sí solo no siempre permite determinar que las células sean MSC. Esto se debe confirmar con ensayos de diferenciación (Dominici et al., 2006).

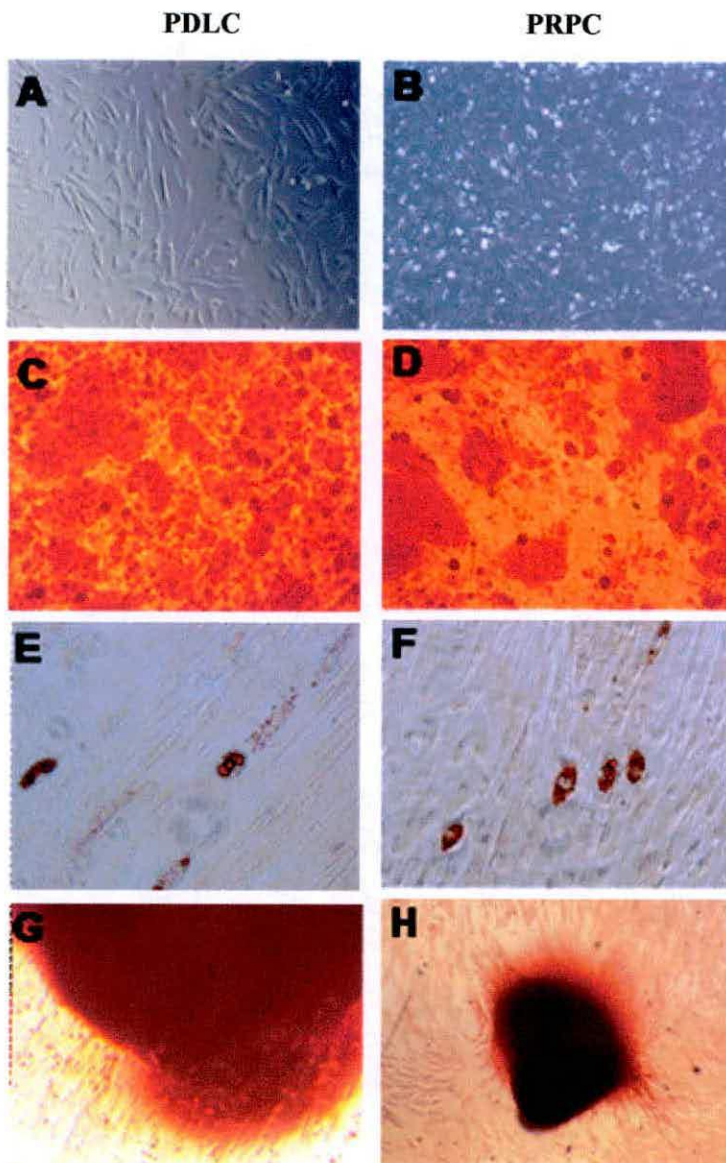


Figura 13. Inducción de la diferenciación adipo-, osteo- y condrogénica de cultivos de PDLC y PRPC CD105⁺/CD271⁺. Morfología fibroblastoide y capacidad adherente (**A, B**). La tinción con Alizarin Red revela mineralización provista por la presencia de osteoblastos (**C, D**). Células conteniendo gotas lipídicas teñidas con Oil Red O, indican presencia de adipocitos. (**E, F**) Micromasa teñida con Safranina O, indicando síntesis de proteoglicanos por células diferenciadas a condrocitos (**G, H**).

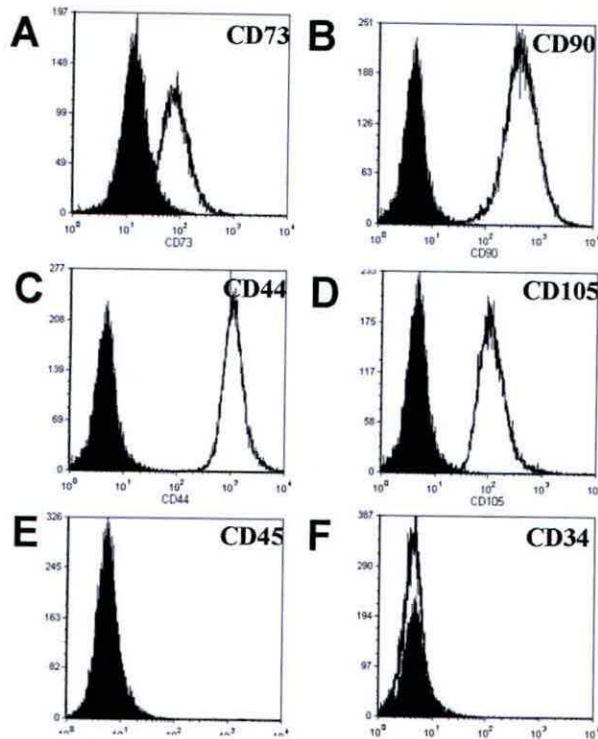


Figura 14. Citometría de flujo de un cultivo de PRPC $CD105^+/CD271^+$. Se evaluó la expresión de un perfil característico de MSC utilizando los marcadores CD73, CD90, CD44, CD105, CD45 y CD34. El perfil obtenido es característico de MSC aisladas de otros tejidos.

Desde este punto ya no se siguió caracterizando las sub-poblaciones negativas, además se optó por seguir los próximos experimentos caracterizando las células PRPC positivas, las cuales serán utilizadas para la inmovilización en matrices y posterior evaluación de la secreción de TGF- β 3. Las células PDLC $CD105^+/CD271^+$ se descartaron porque debían expandirse considerablemente para lograr obtener un número adecuado de células para los experimentos siguientes. Esto traía como consecuencia que los cultivos empezaran a adquirir un fenotipo senescente (datos no mostrados).

Desde hace ya algún tiempo se ha demostrado que MSC aisladas de varios tejidos tienen la capacidad de diferenciarse a otros linajes, además del linaje mesenquimático, a lo que se le denomina plasticidad celular (Wagers y Weissman, 2004). Por esta razón se evaluó la diferenciación de PRPC $CD105^+/CD271^+$ al linaje neural (Figura 15). Después del protocolo neural (ver materiales y métodos), se evaluó mediante inmuno-citofluorescencia la expresión de dos marcadores del linaje neural, GFAP (marcador temprano de astrocito, Figura 15A) y GAP43 (marcador neuronal, Figura 15B).

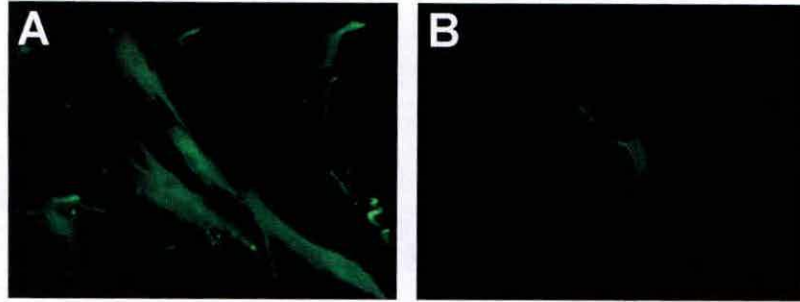


Figura 15. Inmuno-citofluorescencia de cultivos de PRPC CD105⁺/CD271⁺ para evaluar la diferenciación neural. Expresión de GFAP (A). Expresión de GAP43 (B).

(Objetivo 2)

4. Determinación de la secreción de TGF- β 3 por PRPC-*MSC* cultivadas en condición de monocapa

Una vez caracterizadas las PRPC como células madre mesenquimáticas (PRPC-*MSC*) se continuaron los experimentos utilizando estas células, dadas sus características (rápida proliferación y potencial de diferenciación multipotente).

En una primera aproximación se determinó si estas células secretaban TGF- β 3 cuando estaban cultivadas en la condición de monocapa a distintos tiempos (24, 48 y 72 h) mediante el inmuno-ensayo Dot-Blot (Figura 16). No se detectó secreción de TGF- β 3, dentro del límite de detección de esta técnica (del orden de los η g).

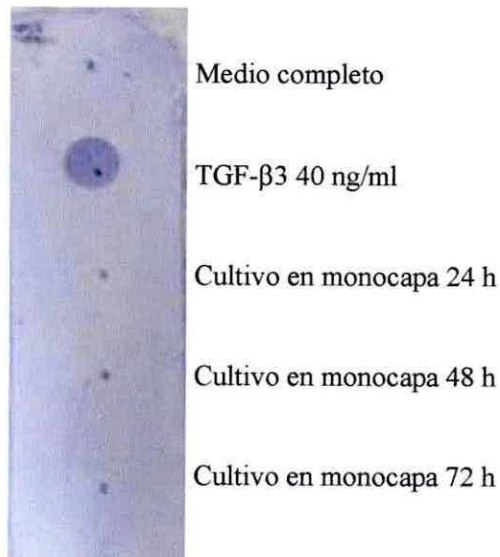


Figura 16. Inmuno-ensayo Dot-Blot. Cultivos de PRPC-MSC se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/cm² en medio de cultivo completo. Se recolectó el medio condicionado por 24, 48 y 72 h y 20 μ l fueron utilizados para determinar TGF- β 3 secretado.

Esta descrito que MSC secretan una gran variedad de factores de crecimiento, pero varios de estos requieren de señales específicas del micro ambiente para su secreción, tanto *in vitro* como *in vivo* (Meirelles et al., 2009).

En el siguiente experimento se determinó, mediante citometría de flujo, si la proteína estaba siendo producida, pero no siendo secretada por PRPC-MSC en la condición monocapa (Figura 17). Se observó que un gran porcentaje de las células expresaban la proteína intracelularmente (Figura 17A). Más aún, se observó que las células CD105 positivas eran aquellas que expresaban TGF- β 3. CD105 corresponde a la endoglina, la cual forma parte del receptor de TGF- β (Figura 3). Este resultado podría implicar que una de las señales para la secreción de TGF- β 3 podría ser de naturaleza autocrina.

Mediante ensayo de ELISA, mucho más sensible que el inmundo ensayo Dot- Blot, se determinó que los cultivos en monocapa también secretan TGF- β 3, pero en menor medida que células encapsuladas, como se presentará más adelante.

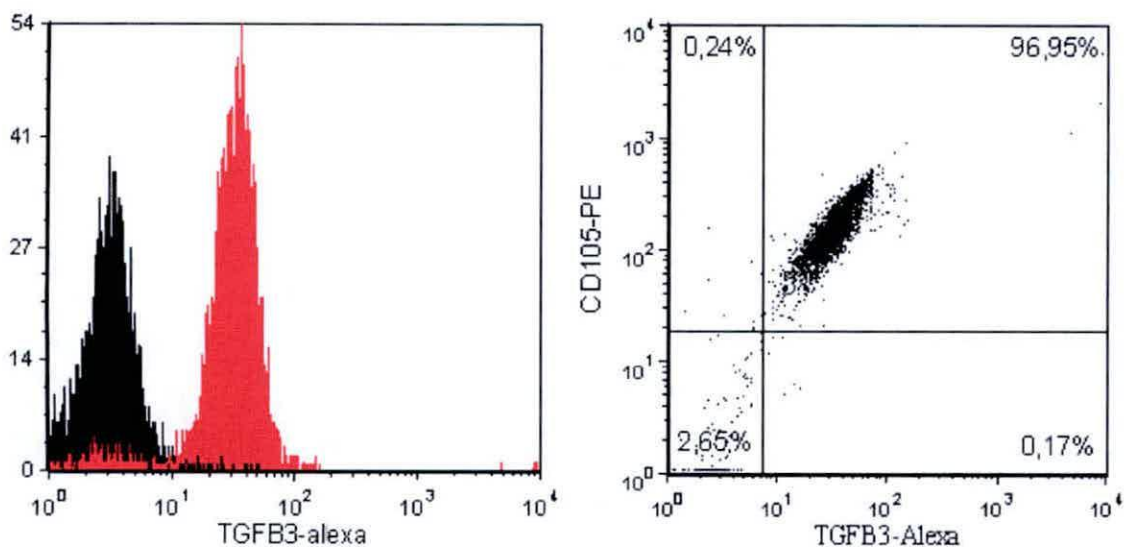


Figura 17. Citometría de flujo para determinar presencia de TGF- β 3 intra-celular en células PRPC-MSC cultivadas en monocapa. Para el ensayo se tripsinizaron células entre 24-72 h post-siembra. Se realizó la inmuno-tinción permeabilizando las células. En la figura se muestran datos de intensidad de fluorescencia (histograma) y dot-plot para CD105 y TGF- β 3. La gran mayoría de las células que marcaban para TGF- β 3 intracelular eran CD105 positivas. Los datos son representativos de células a 24, 48 y 72 h en cultivo en monocapa.

(Objetivo 3)

5. Encapsulación celular

Con el objetivo de determinar si las señales micro-ambientales proporcionadas por la condición de cultivo en conformación tridimensional (3D) permitían activar las células hacia un fenotipo secretor de TGF- β 3, éstas se encapsularon en alginato y dos tipos de fibrina (20 y 54 mg/ml de proteína coagulable), además se utilizó otra condición de cultivo en 3D, pero dentro de una matriz porosa de Gelatina/Quitosano/Ácido hialurónico para lo cual se utiliza fibrina como vehículo para internalizar las células dentro del polímero. A este sistema se le denomina sistema de implante integrado (SII, Young et al., 2006).

5.1 Encapsulación en alginato

Las células se encapsularon en alginato al 1,2 %, concentración a la cual se utiliza comúnmente este biomaterial en aplicaciones de ingeniería de tejidos (Wong, 2004). Las células se resuspendieron a una densidad de $0,4 \times 10^6$, 1×10^6 y 2×10^6 células/ml de alginato, densidades reportadas en literatura (Goren et al., 2010; Wong, 2004). La solución de alginato con las células se goteó utilizando una jeringa de 22G sobre una solución de cloruro de calcio 100 mM con agitación constante, lo que permitió la polimerización formando cápsulas bien definidas (Figura 18). La técnica de encapsulación se optimizó para que las cápsulas se formaran de manera homogénea y fueran todas de un tamaño similar. Se observó que a las densidades de 1×10^6 y 2×10^6 células/ml alginato la cápsula comenzaba a degradarse a las 48 h post-siembra, por lo tanto, se utilizó en los siguientes experimentos capsulas con densidad de $0,4 \times 10^6$ células/mL alginato.

Se evaluó la viabilidad de las células encapsuladas mediante el ensayo live/dead y ensayo MTT (Figura 18C, D). Para el ensayo de viabilidad live/dead se realizó un corte transversal de las cápsulas y se incubaron con la solución provista en el kit comercial. Las células vivas se observan en un color verde y las muertas en rojo, la gran mayoría de las células estaban vivas después de finalizada la encapsulación (al microscopio se observaban algunos puntos rojos en el centro de la cápsula).

Mediante el ensayo con MTT, que también es un ensayo de viabilidad que funciona bajo el mismo principio del ensayo con WST-1 (ver materiales y métodos), pero donde se genera un precipitado insoluble de la sal de formazan por células metabólicamente activas, se pudo observar, esta vez sin necesidad de realizar un corte, que las células se disponían mayoritariamente en una región entre el centro y el borde de la capsula (Figura 18D).

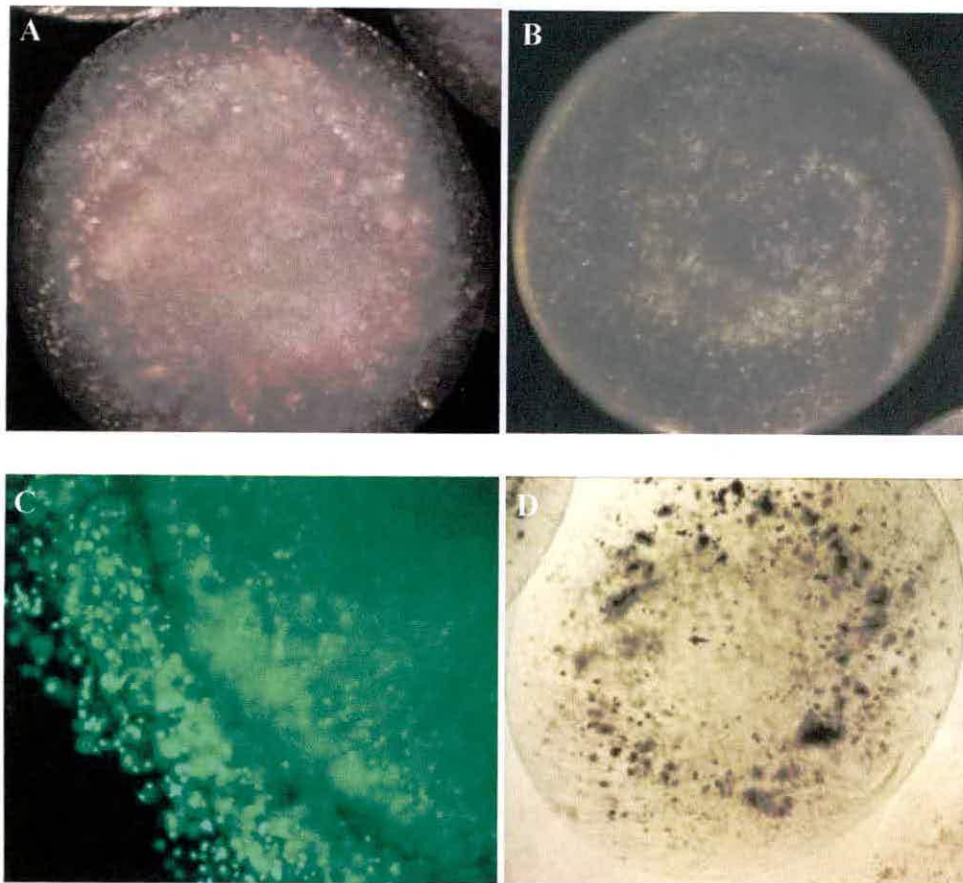


Figura 18. Encapsulación de PRPC-MSC en alginato. Las células se encapsularon en alginato al 1,2 % a densidades de 1×10^6 (A) y 0.4×10^6 (B) células/mL alginato. Para comprobar la viabilidad y disposición celular dentro de la cápsula se realizó en el ensayo live/dead de un corte (C) y ensayo MTT de una cápsula completa (D).

5.2 Encapsulación en fibrina

Las células se encapsularon en fibrina con el objetivo de determinar si tanto la condición en 3D como señales específicas dadas por la matriz extracelular, permitían obtener un fenotipo secretor de TGF- β 3 de PRPC-MSC. Está descrito que alginato, a pesar de ser una matriz de origen natural, es inerte para las células en términos de interacción célula-matriz, por ejemplo este no posee la señal RGD necesaria para que las células interactúen con la matriz mediante ciertas integrinas (Hunt y Grover, 2010). Por otro lado la fibrina si permite una interacción más eficiente entre células y matriz, debido a que posee

las moléculas necesarias para que las células interactúen funcionalmente con la matriz extracelular, por lo tanto, se activen vías de señalización específicas mediadas por integrinas (Eslami et al., 2009).

PRPC-MSC fueron encapsuladas en fibrina a una densidad de 2×10^4 células/cápsula. El coágulo de fibrina se generó *in situ* sobre pocillos de $1,9 \text{ cm}^2$ (Figura 19). Las células se suspendieron en una solución de trombina 7 mg/ml y se mezclaron 25 μl de esa solución con 25 μl de fibrinógeno 20 mg/ml y 54 mg/ml. Una vez formado el coágulo se agregó el medio completo de cultivo. Para comprobar la viabilidad celular después de la encapsulación se hicieron cortes transversales de la cápsula y se realizó el ensayo live/dead (Figura 19C, D). Se observó que el proceso de encapsulación no afectó la viabilidad celular, además las células se dispusieron homogéneamente en la totalidad de la cápsula. En términos estructurales y de disposición celular no se observaron diferencias entre las cápsulas generadas con 20 mg/ml y 54 mg/ml de fibrinógeno (Figura 19A, B).

5.3 Cultivo de PRPC-MSC en SII

Con el objetivo de determinar si el cultivo de las células en una matriz porosa compuesta de gelatina, quitosano y ácido hialurónico (Figura 20A) podría generar un fenotipo secretor de TGF- β 3, las células se sembraron sobre este polímero usando fibrina 20 mg/mL como vehículo de integración (Young et al., 2006). Técnicamente las células en esta condición no se encuentran encapsuladas, más bien estas se disponen dentro de las porosidades internas de la matriz, lo que genera que el microambiente 3D sea distinto al que se produce en las condiciones anteriores (Mao, 2003).

Para sembrar las células sobre el SII, estas se resuspenden en una solución de trombina 7 mg/ml. La matriz es previamente cortada en pedazos de $1 \times 1 \text{ cm}$, esterilizada con etanol al 100%, e hidratada con medio completo, luego se depositan sobre la matriz 25 μL de fibrinógeno 20 mg/ml y sobre este se agregan 25 μl de la solución de trombina con las células. La densidad celular es de 2×10^4 células/ cm^2 de matriz. Para determinar la viabilidad celular después del proceso se realizó el ensayo WST-1, valiéndose de que se genera la coloración naranja que permite ver la disposición homogénea de las células sobre todo el polímero (Figura 20B). Para lograr esta homogeneidad se optimizó el protocolo de preparación, pues dependiendo del grado de hidratación de la matriz y de los tiempos para agregar las soluciones de fibrinógeno y trombina sobre la matriz, a veces las células no se disponían homogéneamente sobre ésta (Figura 20B).

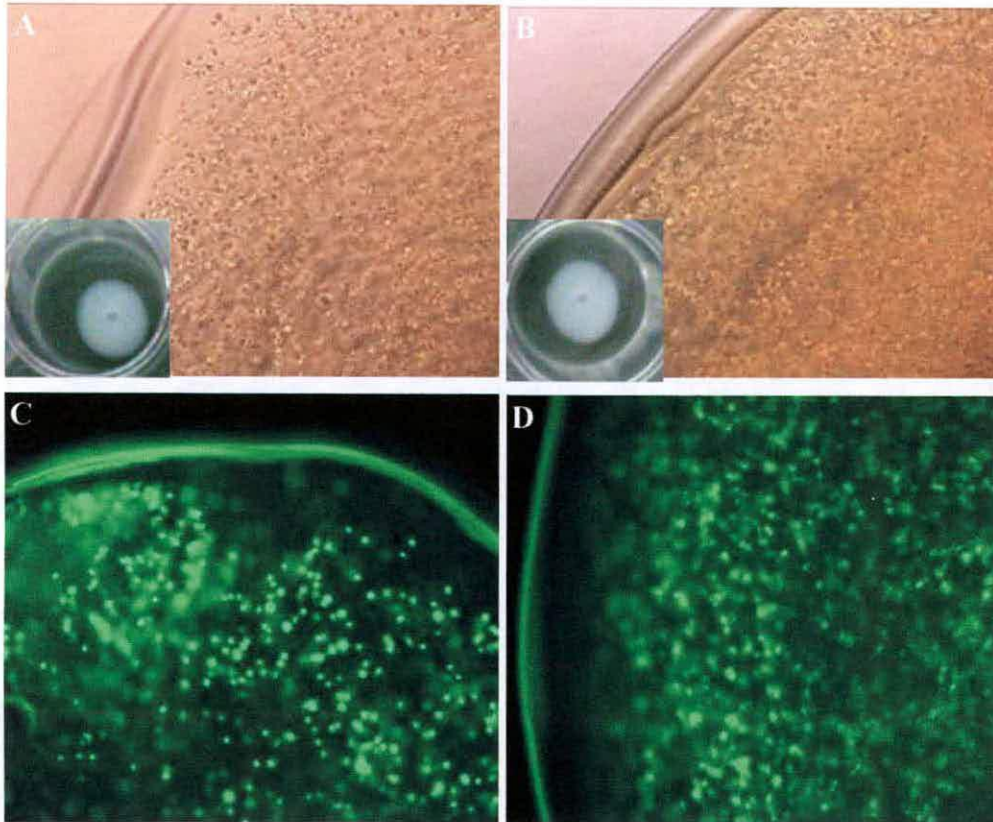


Figura 19. Encapsulación de PRPC-MSC en fibrina. Las células se encapsularon en fibrina 20 mg/mL (A) y 54 mg/mL (B) a una densidad de 2×10^4 células/cápsula. Para comprobar la viabilidad y disposición celular dentro de la cápsula se realizó el ensayo live/dead de un corte de cápsulas de 20 mg/ml (C) y 54 mg/ml (D).

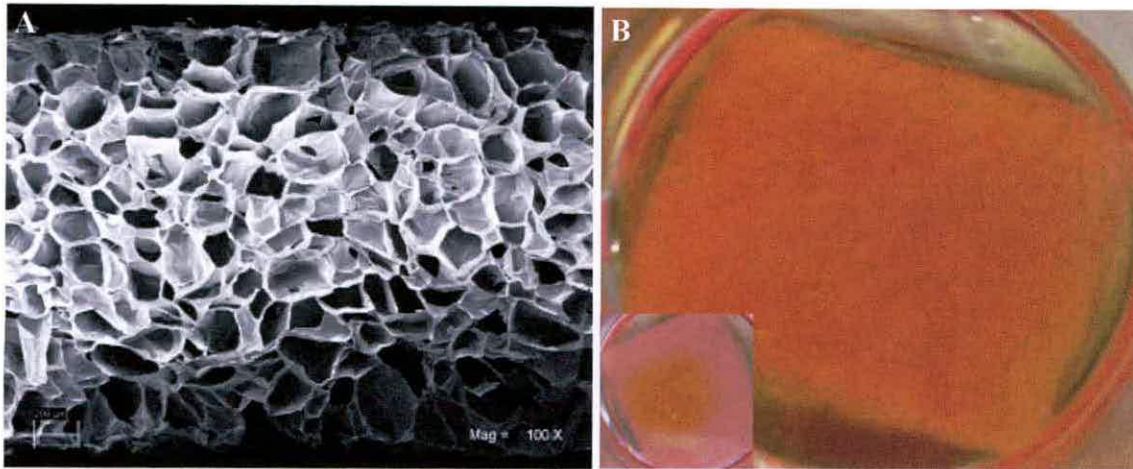


Figura 20. Cultivo de PRPC-MSC en SII. La matriz a base de gelatina/quitosano/ácido hialurónico es altamente porosa (A), permitiendo que las células se dispongan en una conformación 3D distinta que cuando son encapsuladas. Para determinar la disposición y viabilidad de las células sobre el SII se utilizó el ensayo WST-1 (B). El protocolo se optimizó para que la disposición celular sobre la matriz fuera homogénea por toda la extensión de la matriz porosa.

6. Proliferación de PRPC-MSC cultivadas en condiciones 3D

PRPC-MSC fueron cultivadas en las 4 condiciones a comparar en este estudio (monocapa, fibrina, alginato y SII) y determinada su proliferación a distintos tiempos (24, 48 y 72 h) mediante el ensayo WST-1 descrito en materiales y métodos. Las células fueron sembradas en un número constante en todas las condiciones (aproximadamente 2×10^4 células/condición). Previamente se realizó una curva de calibración para poder determinar el número de células en relación a la absorbancia medida. El ensayo se realizó mínimo en triplicado en experimentos independientes (Figura 21). Se observó que las células proliferaron más rápido en la condición de cultivo 3D (fibrina, alginato y SII) en comparación con el cultivo tradicional en monocapa. Esto se ve reflejado en los menores tiempos de duplicación en estas condiciones de cultivo celular (Figura 21). En la figura suplementaria 2 se graficaron los valores sin ser relativizados al tiempo inicial.

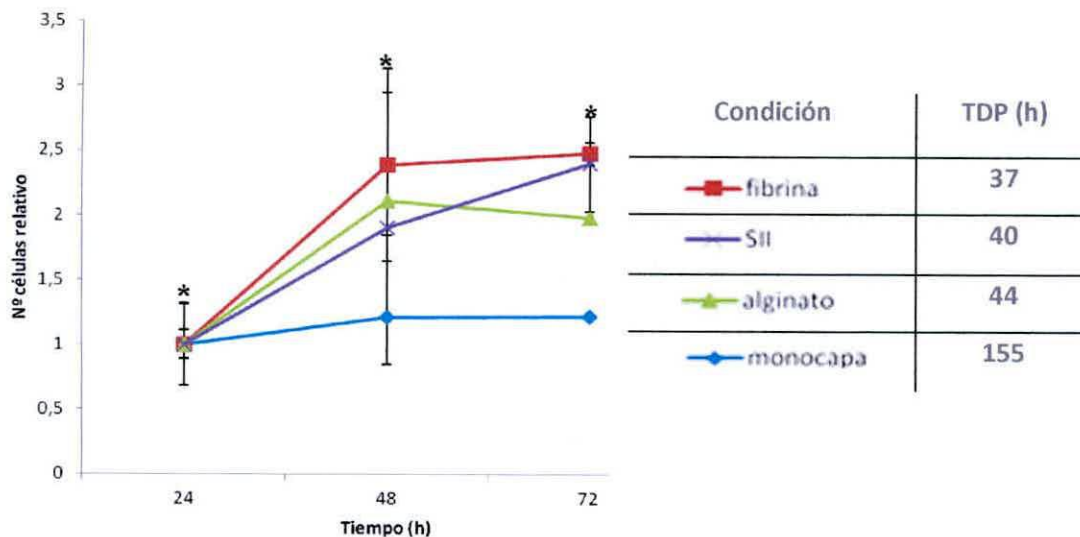


Figura 21. Proliferación de PRPC-MS cultivadas en monocapa, fibrina, alginato y SII. Los datos corresponden a mínimo 3 experimentos independientes. Las células fueron sembradas a 2×10^4 células/condición. La curva se realiza relativa al número de células a las 24 horas. El TDP se calcula a partir de la fase exponencial de cada curva mediante la siguiente expresión: $TDP = \ln 2 / \mu$, donde μ es la velocidad específica de crecimiento. La proliferación de las células en las matrices fue mayor en comparación con el cultivo en monocapa ($*p < 0,05$).

7. Determinación del consumo de glucosa y la producción de lactato de PRPC-MS cultivadas en las condiciones 3D

Estos parámetros relacionados con la actividad metabólica de las células se determinaron con el objetivo de estimar los cambios metabólicos que ocurren cuando se cambian las condiciones de cultivo desde monocapa a un cultivo 3D y finalmente establecer un modelo de secreción de TGF- β 3 en base a correlaciones con otros parámetros. Los niveles de glucosa y lactato se midieron en los mismos medios condicionados desde los cuales se estimaron las concentraciones de TGF- β 3, utilizando kits comerciales (ver materiales y métodos).

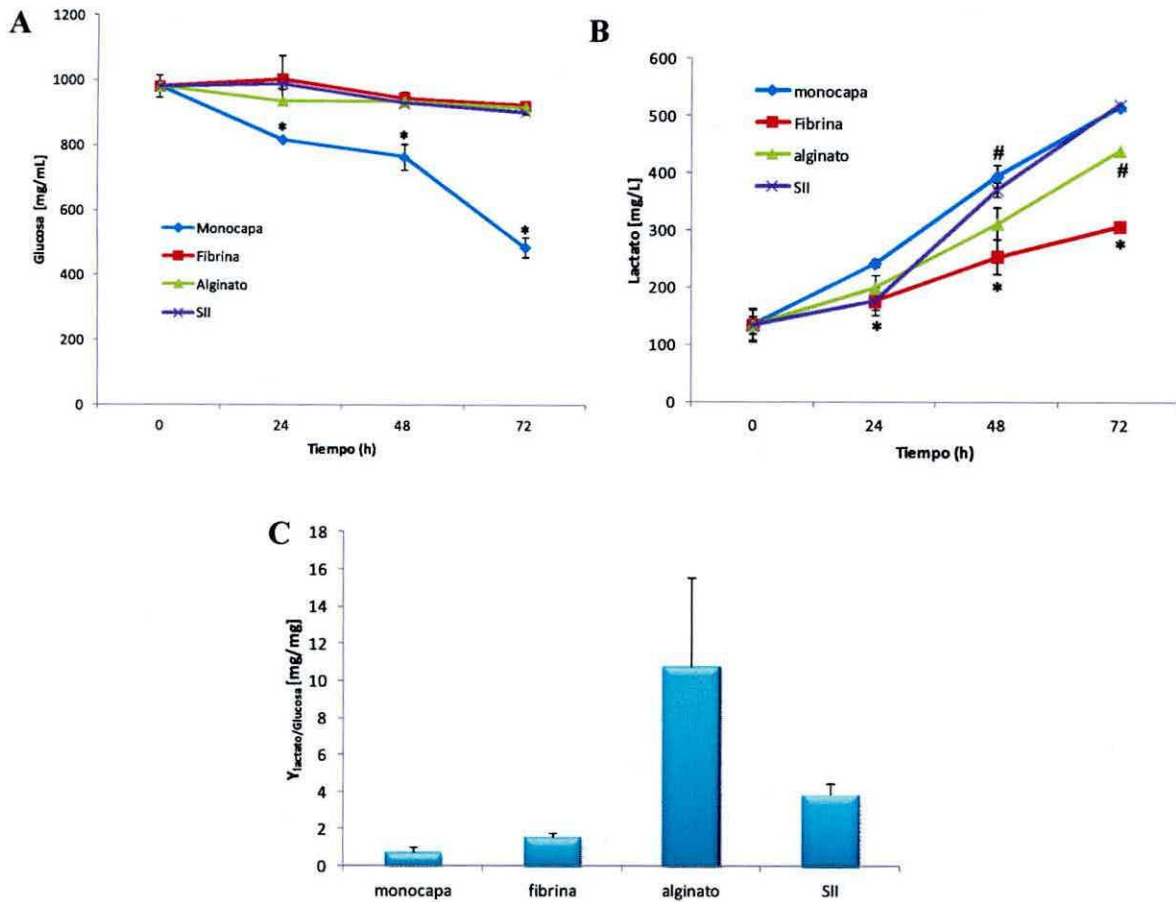


Figura 22. Estado metabólico de PRPC-MSC en las condiciones de cultivo analizadas. Consumo de glucosa (A), el consumo fue mayor en monocapa en los tres tiempos evaluados (* $p < 0,05$). Producción de lactato (B), a las 24 h se produjo menos lactato en fibrina en comparación a monocapa (* $p < 0,05$). A las 48 y 72 h había menos lactato en fibrina (* $p < 0,05$) y alginato (# $p < 0,05$) en comparación a monocapa y SII. Se realizaron mínimo 3 experimentos independientes. El rendimiento de glucosa en lactato ($Y_{\text{lactato/glucosa}}$) (C) corresponde a la pendiente de la recta de los valores graficados de lactato vs glucosa para cada condición (Figura suplementaria 3).

8. Secreción de TGF- β 3 por PRPC-MSD cultivadas en las condiciones 3D

La cuantificación de la secreción de TGF- β 3 por PRPC-MSD se realizó mediante test de ELISA-sándwich. Se utilizó un kit comercial (ver materiales y métodos) de componentes básicos (no hay kit comerciales completos para medir TGF- β 3), el cual había que optimizar para ser usado en las condiciones experimentales de este trabajo. Este ensayo sólo permite detectar TGF- β 3 activo, por lo cual había que realizar un paso previo de activación de la proteína en los medios condicionados mediante acidificación con HCl. Para la cuantificación se realizaron curvas de calibración en cada determinación, por triplicado. Las concentraciones de TGF- β 3 secretado se expresan en términos de pg/mL/10⁴ células⁻¹ (Figura 23). Previamente se evaluó la secreción de manera cualitativa mediante el inmuno-ensayo Dot-Blot (Figura suplementaria 1).

Se observó una diferencia significativa entre la secreción del factor de crecimiento por PRPC-MSD en monocapa en comparación con las células cultivadas en las matrices. Sin embargo no se observaron diferencias entre las distintas matrices, sugiriendo que el cambio en la condición de cultivo desde monocapa a 3D proveía la señalización necesaria para que TGF- β 3 fuera secretado al medio extracelular. Por otro lado también se observó que los niveles de TGF- β 3 secretado disminuían considerablemente a las 48 y 72 h, en comparación con la condición a las 24 h. Los cambios significativos en la concentración de TGF- β 3 se producen comparando el cultivo en monocapa en comparación con el cultivo en 3D en todos los tiempos evaluados. Por otra parte la disminución de la secreción entre las 24 y 48/72 h también es significativa.

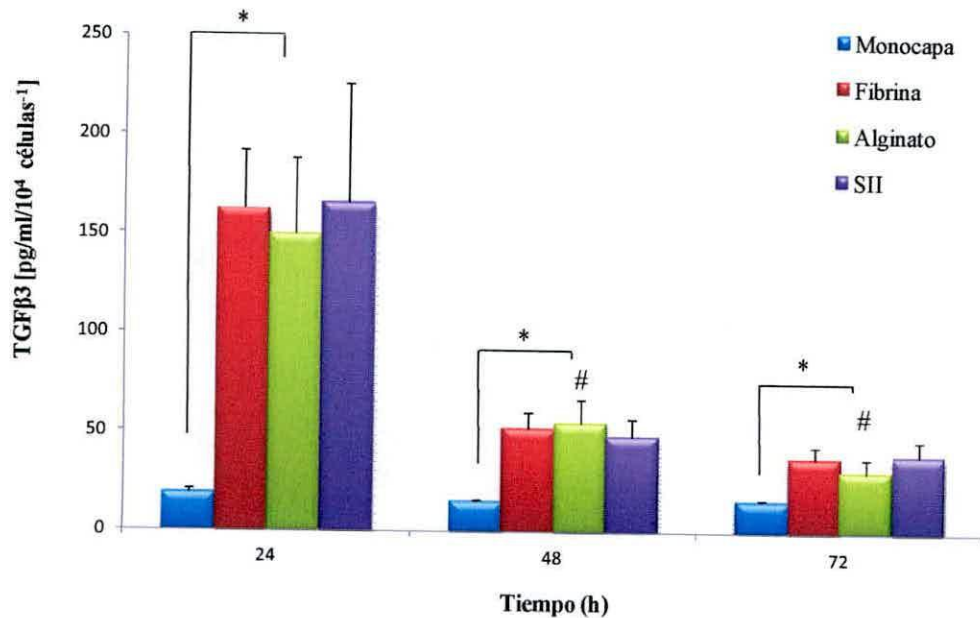


Figura 23. Cuantificación de la secreción de TGF- β 3 por PRPC-MSC en las distintas condiciones de cultivo. Previa a la medición se realiza una activación del TGF- β 3 total presente en los medios condicionados. Las mediciones se hicieron en mínimo 3 experimentos independientes. Los cambios significativos se dieron entre cultivo en monocapa y cultivo en las matrices en los tres tiempos estudiados (* $p < 0,05$). La disminución de la secreción a las 48 y 72 h en comparación con las 24 h también fue significativa entre los cultivos en las matrices (# $p < 0,05$).

9. Expresión génica de TGF- β 3 y otros factores de crecimiento

Para determinar la expresión de TGF- β 3 se realizó RT-PCR en tiempo real utilizando un equipo Light-Cycler de Roche. Se extrajo el RNA de la condición en monocapa mediante el uso del reactivo Trizol. La extracción de RNA de las células cultivadas en las matrices se realizó mediante una modificación del protocolo descrito por Wang y Stegemann (Wang y Stegemann 2011), que está optimizado para aislar RNA a partir de muestras complejas, donde el acomplejamiento iónico que se produce entre los ácidos nucleicos y la matriz hace complicada la extracción, no permitiendo obtener buenos rendimientos de RNA. La cantidad de RNA extraída desde células sembradas en el SII no fue suficiente para obtener cDNA para realizar el análisis, esto debido a la complejidad de la matriz. Para la cuantificación relativa de la expresión se utilizó la expresión del gen constitutivo GAPDH (Figura

24). Para comprobar que la amplificación correspondiera específicamente al amplicón descrito en la Tabla 5, se realizó un análisis de denaturación (Figura 24). Los valores de punto de corte (Ct) se obtuvieron de la curva de amplificación generada para cada gen (Figura 24).

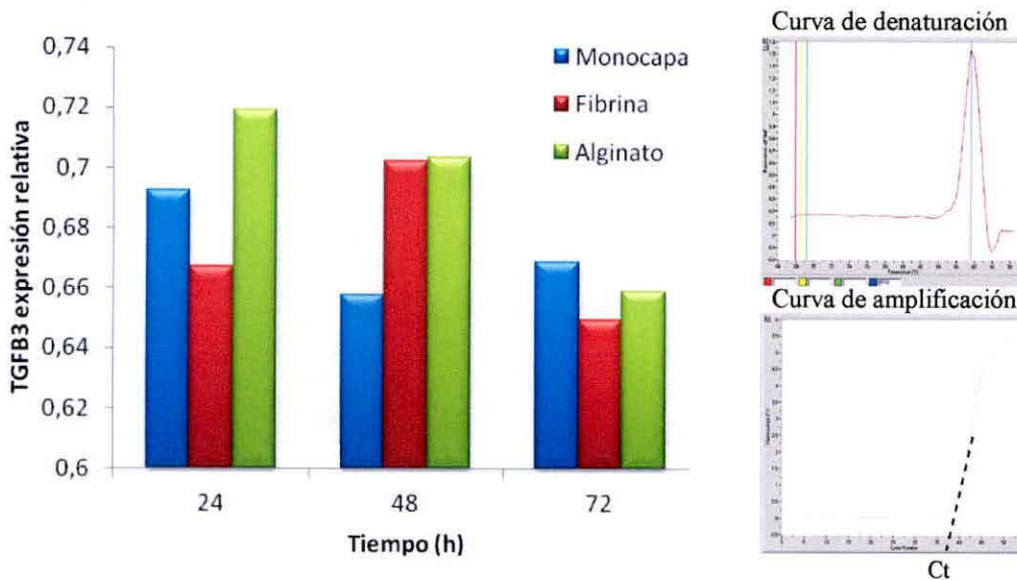


Figura 24. Cuantificación relativa de la expresión de TGF-β3 por PRPC-MSC mediante RT-PCR en tiempo real en las distintas condiciones de cultivo. Se extrajo el RNA total de las células en monocapa y cultivadas en las matrices y se realizó la transcripción reversa para obtener el cDNA correspondiente (n=2). Las condiciones de amplificación se detallan en la tabla 2. Se presentan curvas representativas de melting y de amplificación. La expresión se calculó relativa a la expresión del gen constitutivo GAPDH.

Mediante RT-PCR convencional se determinó la expresión de otros importantes factores de crecimiento involucrados en la reparación/regeneración de tejidos (Tabla 7, Robson et al., 1998; Metcalfe y Ferguson, 2007), por PRPC-MSC cultivadas en las distintas condiciones de cultivo. Se observó que el perfil de expresión en fibrina y en alginato es muy similar. No se observó expresión de VEGF en ninguna de las condiciones de cultivo. Por otro lado FGF2 se expresó de manera constitutiva en todas las condiciones, resultado esperable, pues se ha descrito que la acción trófica de MSC es en gran parte mediada por FGF2 (Trouche et al., 2010).

Tabla 7. Expresión de factores de crecimiento involucrados en la reparación/regeneración de heridas en PRPC-MSC cultivadas en las distintas condiciones mediante RT-PCR convencional y posterior análisis electroforético. Los resultados se muestran cualitativamente como +: expresión del gen; -: no expresión del gen; -/+ en una muestra no se expresó el gen (n=2).

	Tiempo (h)	Monocapa	Fibrina	Alginato
TGF-β3	24	+	+	+
	48	+	+	+
	72	+	+	+
EGF	24	-	-	-
	48	-/+	-	+
	72	+	+	-
FGF2	24	+	+	+
	48	+	+	+
	72	+	+	+
VEGF	24	-	-	-
	48	-	-	-
	72	-	-	-
PDGF	24	-	+	+
	48	-	+	+
	72	-	-	-

10. Análisis de componentes principales

Con el objetivo de encontrar relaciones significativas entre las diversas variables medidas en estas condiciones de cultivo, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) previo análisis de correlaciones entre las variables (Figura 25). Dentro de los métodos de análisis de más de una variable, el ACP es una forma de encontrar un patrón de relación entre los datos y a su vez de reducir gran cantidad de variables. Así, ACP es un método que permite la identificación de patrones en un conjunto de datos. Por otra parte, expresa los datos de manera tal que resalta las similitudes y diferencias entre ellos.

Las variables utilizadas fueron: Tiempo, biomasa, concentración de TGF-β3, concentración de glucosa, concentración de lactato, crecimiento (μ), producción de TGF-β3 ($Q_{TGF-\beta3}$), Consumo de glucosa (Q_{glu}),

Producción de lactato (Q_{lac}), expresión de EGF, PDGF y TGF- β 3. Las observaciones fueron las distintas mediciones en el tiempo (0, 24, 48 y 72 h) en monocapa y en matrices.

Se encontraron correlaciones significativas entre las siguientes variables (Figura 25):

- Tiempo y concentración de lactato (positiva)
- Tiempo y producción de TGF- β 3 (negativa)
- Tiempo y producción de lactato (negativa)
- Biomasa y producción de lactato (negativa)
- Concentración de TGF- β 3 y concentración de glucosa (positiva)
- Concentración de TGF- β 3 y concentración de lactato (negativa)
- Concentración de TGF- β 3 y producción de TGF- β 3 (positiva)
- Concentración de TGF- β 3 y consumo de glucosa (negativa)
- Concentración de TGF- β 3 y expresión de PDGF (positiva)
- Concentración de glucosa y concentración de lactato (negativa)
- Concentración de glucosa y expresión de PDGF (positiva)
- Concentración de lactato y producción de TGF- β 3 (negativa)
- Concentración de lactato y expresión de PDGF (negativa)
- Crecimiento y expresión de PDGF (positiva)
- Producción de TGF- β 3 y Producción de lactato (positiva)
- Expresión de TGF- β 3 y expresión de PDGF (positiva)

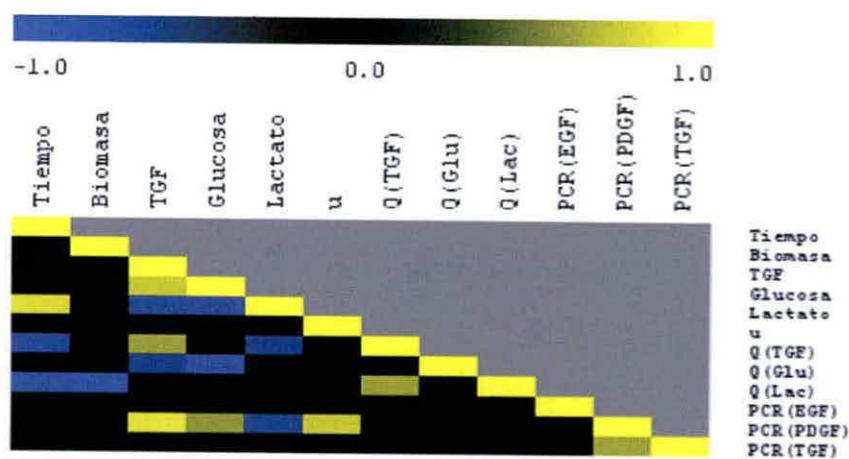


Figura 25. Análisis de correlación de Pearson.

Mediante el análisis de contraste entre variables en el componente principal 1 y 2 se determinaron los grupos de variables más relacionadas entre sí (Tabla 8). Los valores en un mismo color corresponden a un grupo de variables, estos grupos de distinto color contrastan en el primer plano principal (CP1) y en el segundo plano principal (CP2).

Tabla 8. Análisis de contrastes entre grupo de variables de acuerdo al análisis de componentes principales. Los variables relacionadas se muestran del mismo color, los valores 0 indican que el contraste no fue significativo.

Variable	Contraste entre variables	
	CP1	CP2
Tiempo	0,35	0,29
Biomasa	0,00	0,51
TGF- β 3	-0,37	0,00
Glucosa	0,00	0,00
Lactato	0,40	0,00
u	0,00	0,00
Q(TGF- β 3)	0,00	-0,27
Q(Glu)	0,00	-0,36
Q(Lac)	0,00	-0,49
PCR(EGF)	0,00	0,00
PCR(PDGF)	-0,38	0,00
PCR(TGF- β 3)	0,00	0,00

También se realizó un análisis de contribución en las variables con respecto al cambio en la condición de cultivo (Tabla 9). Esto permitió establecer la contribución de la composición química de la matriz sobre el cambio en cada variable.

Tabla 9. Análisis de contribución. Se determinó la contribución en el cambio global de una variable cuando se pasa desde una condición de cultivo en monocapa a condición de cultivo en 3D (fibrina y alginato). El valor 0 corresponde que la contribución a la variable no fue significativa

	Monocapa a Fibrina (%)	Monocapa a Alginato (%)
Tiempo	0	0
Biomasa	60,8	39,2
TGF-β3	54,4	45,6
Glucosa	51,7	48,3
Lactato	65,4	34,6
μ	58,7	41,3
Q(TGF-β3)	56,5	43,5
Q(Glu)	52,9	47,1
Q(Lac)	61	39
PCR(EGF)	0	0
PCR(PDGF)	48,3	51,7
PCR(TGF-β3)	0	0

Finalmente el análisis gráfico de componentes principales (primer plano principal) se presenta en la Figura 26, en este se destacan las condiciones que están agrupadas de acuerdo a su condición de ser significativamente similares (de acuerdo a su posición en el mismo cuadrante) y las variables que se ven afectadas mayormente por las condiciones particulares.

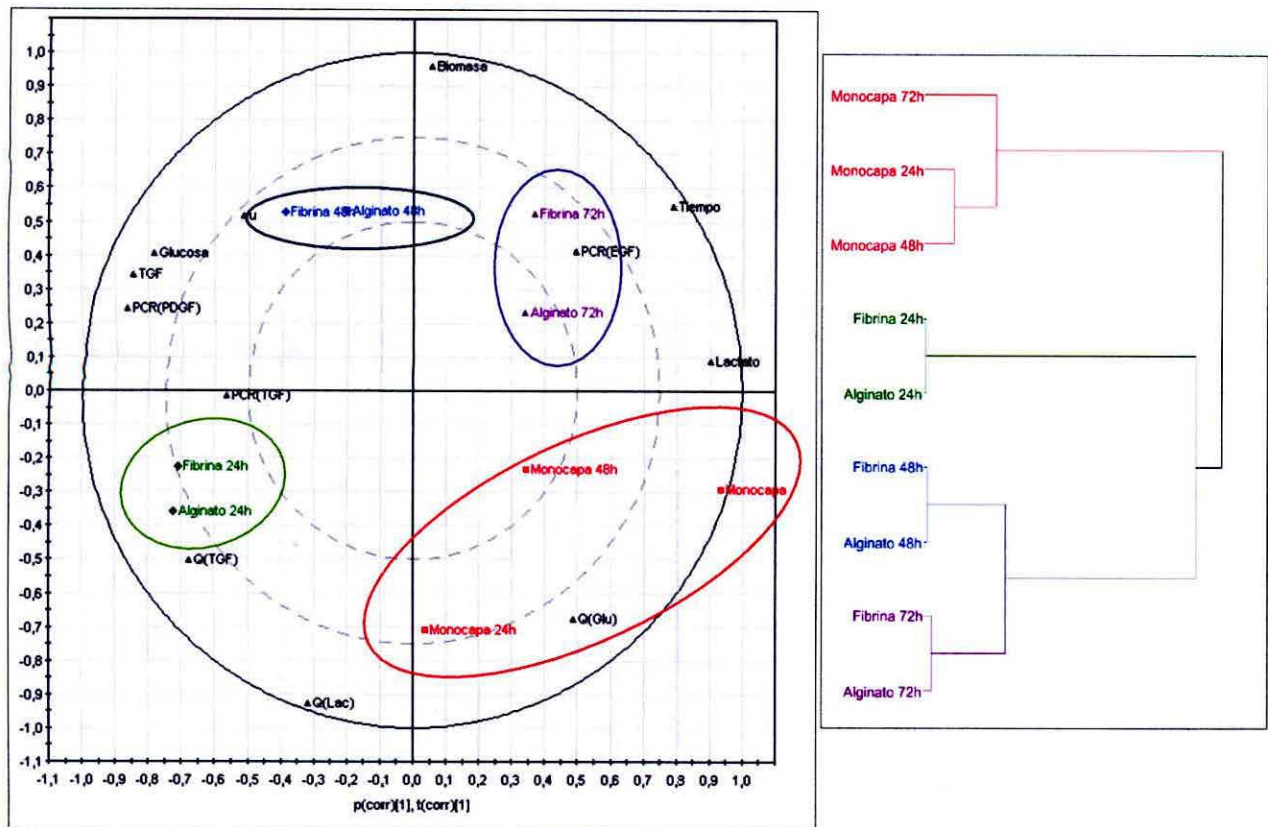


Figura 26. Análisis de componentes principales: Primer plano principal

DISCUSIÓN

1. Tejidos dentales como fuente de MSC

A la fecha muchos estudios han demostrado que células madre adultas están presentes en diversos tejidos, incluyendo medula ósea, tejido neural, piel, retina, tejido adiposo, cordón umbilical, entre otros. Además estas células poseen las capacidades de autorrenovación y de diferenciación hacia numerosos tejidos (revisado en Mimeault y Batra, 2008). Esta propiedad de numerosos tejidos adultos es sin duda una gran ventaja para aplicación en terapia celular, sin embargo muchos de estos son inaccesibles o la intervención para obtener biopsias, con el objetivo de aislar células madre, puede ser complicada metodológicamente o producir efectos colaterales adversos en los pacientes.

En la presente investigación se obtuvieron células madre adultas a partir de tejidos dentales obtenidos de terceros molares extraídos por razones de ortodoncia y que eran material de desecho. Los tejidos aislados fueron cortados en pequeños pedazos y sembrados como explante, desde los cuales las células migraron hacia la placa de cultivo (Figura 9). Los cultivos obtenidos son heterogéneos, estando compuestos por diversos tipos celulares, entre fibroblastos, células endoteliales, precursores y células madre, estas últimas encontrándose probablemente en una muy baja proporción (0,01-2%) según lo descrito para otras células madre adultas (Wagers y Weissman, 2004). Por esta razón se requiere de un procedimiento experimental que permita aislar la subpoblación de células de interés, en este caso las MSC. Se ha descrito en trabajos anteriores que la selección de MSC en base a la expresión de CD105 y CD271 permite obtener células con alta capacidad proliferativa y de diferenciación (Jarocha et al., 2008b). De acuerdo a este antecedente se eligieron estos marcadores para aislar la subpoblación de células mediante separación inmunomagnética. Para realizar este procedimiento se utilizó el sistema de separación Dynabeads de Invitrogen, el cual consiste en microesferas paramagnéticas (Figura 10A, B), que tienen acoplado un anticuerpo secundario que permite usar cualquier anticuerpo sintetizado en ratón. Este sistema además tiene la ventaja de poder separar las microesferas de las células aisladas debido a que el

anticuerpo secundario se encuentra unido a la microesfera mediante un enlazador de DNA, el cual puede ser cortado con DNasa (Figura 7).

La viabilidad celular después del procedimiento fue de alrededor del 90% (datos no mostrados), la eficiencia de aislamiento fue dispar entre los tres tejidos desde los cuales se aislaron células, obteniéndose la mayor cantidad de células CD105⁺/CD271⁺ de los cultivos de GC. Esto se refleja en que se obtuvieron aproximadamente un 10% de células positivas a partir del cultivo celular obtenido de tejido gingival, lo que contrasta con el 1,2 y 0,36% de células positivas obtenidas a partir de PRP y PDL respectivamente (Tabla 5). La porción de células negativas para los marcadores también fue cultivada para la posterior caracterización. Se observó que las subpoblaciones positivas y negativas poseían similar morfología (Figura 11), pero diferían en su capacidad proliferativa (Figura 12) y de diferenciación (Tabla 7). PRPC y PDLC CD105⁺/CD271⁺ proliferaron aproximadamente 1,5 veces más rápido que la sub-población negativa correspondiente, por otro lado, PRPC CD105⁺/CD271⁺ proliferaron 1,5 veces más rápido que PDLC CD105⁺/CD271⁺.

Un resultado esperado es que las células negativas para CD105 no se diferenciaron eficientemente al linaje condrogénico, lo que puede deberse al hecho de que CD105 es uno de los receptores de TGF-β3 (Wong et al., 2000) y justamente una de las señales para que se diferencien al linaje condrogénico es TGF-β3. Estos resultados permiten evidenciar que la sub-población CD105⁺/CD271⁺ consiste en células con características de MSC.

Siguiendo las recomendaciones para caracterizar MSC proporcionadas por la Sociedad Internacional de Terapia celular (Dominici et al., 2006), las células extraídas a partir de los tres tejidos elegidos para esta investigación (PDL, PRP y GC, Figura 6) fueron caracterizadas como MSC, los criterios se cumplieron sólo en el caso de las células que fueron seleccionadas previamente en base a la expresión de los marcadores CD105 y CD271 mediante separación inmuno-magnética. Estos criterios son: capacidad adherente bajo condiciones estándar de cultivo (Figura 13A, B), expresión de los marcadores de superficie CD105, CD73, CD90 y CD44 (Figura 14A-D) y negativas para CD34 y CD45 (Figura 14E, F) y diferenciación a los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico *in vitro* (Figura 13C-H, Tabla 7). Estos resultados permiten establecer a las células aisladas como MSC. Aunque las PDLC cumplían (no así las GC, las cuales no se

diferenciaron a adipocitos) con los criterios antes descritos (Tabla 6), los siguientes experimentos sólo se continuaron con PRPC, esto debido a que, en el caso de PDLC, la separación inmunomagnética era notablemente menos eficiente que para PRPC, pudiéndose obtener en promedio un 0,36% del total de las células de la muestra (Tabla 5). Este resultado indica que en este tejido las células que expresan CD105 y/o CD271 están en una muy baja proporción. Esto tenía como consecuencia que para lograr el número suficiente de células para llevar a cabo los siguientes experimentos, los cultivos tenían que ser expandidos en gran medida, lo que al final producía cultivos con muchas células senescentes que perdían la capacidad de dividirse y eventualmente diferenciarse.

PRPC fueron aisladas y descritas por primera vez en 2008 (Sonoyama y Liu, 2008) a partir de terceros molares de adultos entre 18 y 20 años. La papila periapical es parte del tejido blando encontrado en los ápices de dientes permanentes inmaduros, el cual eventualmente da lugar al tejido pulpar. Estas células fueron descritas teniendo capacidad multipotente de diferenciación, capaces de llegar a más de 70 duplicaciones poblacionales y expresar todos los marcadores característicos de MSC (Sonoyama y Liu, 2008). Por otro lado han sido descritas tener características que habían sido sólo descritas en MSC de médula ósea, como capacidad inmunomoduladora (Ding et al., 2010) y plasticidad celular para diferenciarse a otras células pertenecientes a linajes no mesenquimáticos (Lalonde y Cheung, 2010).

Debido a esto último, se consideró relevante comprobar que PRPC-MSCs podían diferenciarse a células del linaje neural. Se sometió a las células a un protocolo de diferenciación neural previamente descrito (Somoza et al., 2008, 2010). Luego se detectó la expresión de GFAP (marcador glial) y GAP43 (marcador neuronal) (Figura 15). Este resultado y los descritos anteriormente, permiten establecer que las PRPC cumplen con todas las características, establecidas en la actualidad, para ser consideradas MSC.

Muchos estudios han descrito la presencia de células tipo MSC en diversos tejidos (revisado en Crisan et al., 2008). Esto dio lugar a la hipótesis de que el verdadero nicho de las MSC era más bien vascular (en vez de sólo residir en la médula ósea), es decir las MSC serían células tipo pericitos que estarían dispuestas perivascularmente. Hay antecedentes que apoyan el hecho de que para casi todos los vasos sanguíneos del cuerpo, MSC son observadas en lugares perivasculares

(Crisan et al., 2008). Actualmente está claro que pericitos aislados exhiben un panel de marcadores de superficie que son idénticos a los expresados por MSC. Esto ha llevado a sugerir que todas las MSC son pericitos (Caplan y Correa, 2011). Un marcador de pericitos es CD146, que ha sido utilizado para aislarlos y expandirlos *in vivo* (Crisan et al., 2008), por otro lado PRPC también expresan este marcador (Laberge y Cheung, 2010), lo que sugiere que también tienen un origen perivascular en el tejido periapical de la raíz. Todos estos antecedentes permiten establecer con seguridad que las PRPC son MSC (PRPC-MS). Finalmente, el hecho de que todas las MSC sean pericitos abre la posibilidad en cuanto como visualizar fisiológicamente y terapéuticamente el rol de las MSC (Caplan y Correa, 2011).

Consistente con la propuesta de que hay un creciente cambio en la filosofía con respecto al potencial clínico ofrecido por MSC, casi todos los ensayos clínicos que están en desarrollo y que se basan en MSC (aproximadamente 200, <http://clinicaltrials.gov>), como también estudios pre-clínicos, utilizan MSC de maneras terapéuticas y medicinales, sin pensar en que estas se diferencien a algún linaje en particular.

Así, considerando el nicho perivascular de las MSC en todos los tejidos, incluyendo tejidos dentales, las MSC tendrían la capacidad de sensar el medio y por ende, cambiar de fenotipo frente a esta(s) señal(e)s que estarían relacionadas con las necesidades de un tejido en particular. De esta manera se activarían para ejercer la actividad medicinal secretando distintos factores, provocando así un microambiente regenerativo en los tejidos afectados (Figura 27). Se desconocen cuáles serían las señales específicas que producen la activación de MSC hacia el fenotipo medicinal.

2. Secreción de TGF- β 3 por PRPC-MS cultivadas en monocapa

Una vez caracterizadas las células, éstas se cultivaron en condiciones de cultivo convencional en monocapa para evaluar si estas secretan TGF- β 3 sin mayor estímulo. De manera preliminar se realizó un inmuno-ensayo Dot-Blot, para lo cual medios condicionados por PRPC-MS durante 24, 48 y 72 h fueron recolectados por triplicado. Luego se procedió a la activación de TGF- β 3 en el medio de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos, se aplicaron 20 μ l del medio sobre la membrana de nitrocelulosa activada y se procedió con el ensayo. No se detectó TGF- β 3 en los

medios condicionados (Figura 16), esto considerando el límite de detección de esta técnica (del orden de los ηg).

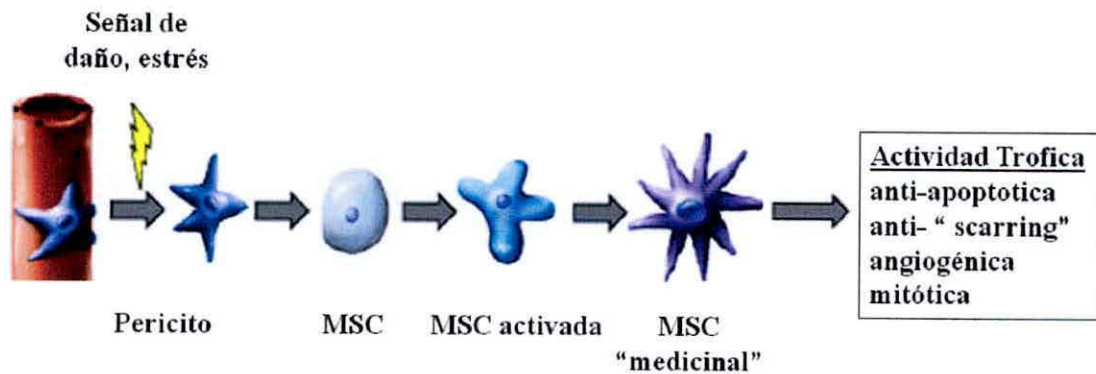


Figura 27. Actividad trófica de MSC *in vivo*. Las MSC, consideradas recientemente como pericitos, estarían presentes en todos los tejidos vascularizados de manera perivascular. Cuando el tejido se ve sometido a algún daño o estrés, las MSC podrían ser capaces de sentir esas señales y activarse para cambiar a un fenotipo "medicinal" ejerciendo su actividad trófica en el tejido afectado, mediante la secreción de distintos factores anti apoptóticos, anti-"scarring" o pro-regeneradores, angiogénicos y mitóticos. (Figura adaptada de Caplan y Correa, 2011).

Mediante citometría de flujo se detectó expresión de la proteína intracelularmente en PRPC-MS (Figura 17). Fue interesante observar que aproximadamente un 97% de células CD105^+ expresaban $\text{TGF-}\beta 3$. Lo más probable es que las células CD105^- en los resultados de la citometría corresponden a células solo CD271^+ dentro de la sub-población $\text{CD105}^+/\text{CD271}^+$. De acuerdo a este resultado, se confirma que PRPC-MS producen $\text{TGF-}\beta 3$ en condiciones normales de cultivo, sin embargo no se presentan los estímulos necesarios para que la proteína sea secretada.

No se encontró bibliografía con respecto a la secreción de factores de crecimiento por MSC aisladas desde tejidos dentales, exceptuando células aisladas de tejido periodontal, pero sin ser caracterizadas como MSC (Pinkerton et al., 2008). Sin embargo hay numerosos trabajos que han estudiado los perfiles de expresión de factores de crecimiento en MSC aisladas de médula ósea (revisado en Meirelles et al., 2009). Los factores de crecimiento más comúnmente secretados por MSC son FGF2 , VEGF , PDGFBB , $\text{TGF-}\beta 1$ y diversas citoquinas (Liu et al., 2006; Caplan y

Dennis, 2006). Estudios comparativos han demostrado que MSC aisladas desde médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical muestran características comparables con respecto al perfil de expresión de ciertos factores de crecimiento (Schinköthe et al., 2008). Estos antecedentes sugieren que MSC aisladas de tejidos dentales podrían también producir muchos de los factores descritos en MSC de otros tejidos.

En particular con respecto a la expresión/secreción de TGF- β 3 no hay muchos estudios, la mayoría de los trabajos en torno a TGF- β 3 y MSC se basa en que este factor es parte importante de los estímulos para inducir a las células a diferenciarse al tejido condrogénico (Minguell et al., 2001), y no se ha considerado que este factor pudiera ser parte del perfil de secreción de MSC. Sin embargo en estudios donde han evaluado ampliamente el perfil de expresión de MSC se ha reportado expresión de TGF- β 3, pero en muy baja proporción (Smiler et al., 2010; Liu y Hwang, 2005).

Los resultados obtenidos, junto con estos antecedentes permiten inferir que las células necesitan un estímulo externo para activar la secreción de la proteína mediante una vía de secreción en particular. El mecanismo mediante el cual TGF- β 3 es secretado no ha sido descrito, se sabe que la proteína precursora de TGF- β dentro de la célula es proteolizada desde el C-terminal, pero permanece unida no-covalentemente al péptido de latencia (LAP), formando un complejo pequeño de latencia. Este complejo es exportado desde la célula donde se une a la proteína de unión a TGF- β latente (LTBP) mediante enlaces de cisteína para formar el complejo de latencia mayor (LLC), en esta forma circula extracelularmente (Flanders et al., 2003; Wallace y Hardy, 2005).

En macrófagos se ha estudiado ampliamente cuales son las vías de secreción de ciertas citoquinas y factores de crecimiento (Stow et al., 2009). Las etapas tempranas de las vías de secreción son comunes para todas las células eucarióticas, donde las proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático son plegadas, sometidas a un control de calidad y parcialmente glicosiladas, para luego ser cargadas en vesículas para su transporte al complejo de Golgi, donde se continúa con el procesamiento postraduccional, incluida la glicosilación (Alberts et al., 2008).

La red trans-golgi es la última estación en el complejo de Golgi, luego las vías de secreción divergen y difieren en las rutas, en los transportadores y organelos que se usan para transportar proteínas con diversas funciones. La vía de secreción clásica o canónica es la que media la

secreción constitutiva de pequeñas cantidades de proteínas desde la red trans-golgi a la superficie (Duitman et al., 2011). En algunos tipos celulares como los macrófagos, esta vía constitutiva puede ser sobrerregulada para aumentar la secreción de ciertas proteínas cuando las células son activadas (Stow et al., 2009). Las proteínas que se van a secretar transitan desde el sistema trans-golgi hacia la membrana plasmática y pueden ser almacenadas en gránulos hasta que su secreción sea activada mediante señales específicas (Duitman et al., 2011).

Aunque no se detectó mediante el inmuno ensayo Dot-Blot (Figura 16), las células secretan constitutivamente una pequeña cantidad de TGF- β 3 (detectado mediante ELISA, Figura 23). Esto ha sido reportado para el caso de MSC de otros tejidos (Smiler et al., 2010; Liu y Hwang, 2005) y como se discutirá más adelante, condiciones de cultivo particulares pueden estimular la secreción de TGF- β 3.

3. Inducción del fenotipo: células secretoras de TGF- β 3

La capacidad que se tiene *in vitro* de manejar la vía de diferenciación de MSC hacia un fenotipo en particular, se debe a que estas células responden de diferentes maneras a estímulos generados por diversos factores solubles en el medio, estímulos generados por componentes de la matriz extracelular natural o artificial, diversas interacciones celulares, fuerzas mecánicas e hidromecánicas, la tensión de oxígeno y el pH, entre otros. Así controlando estos factores mediante condiciones de cultivo particulares se puede lograr diferenciar y/o activar MSC hacia algún linaje en particular y a la sobreproducción de algún factor de interés (Figura 28).

Se ha reportado que el potencial de diferenciación de MSC hacia algunos linajes particulares se puede optimizar usando cultivos en 3D, es decir inmovilizando las células en matrices de diversos materiales (Tuan et al., 2002). Como se indicó antes, este tipo de cultivo permite generar un microambiente mucho más favorable para el crecimiento celular y la disponibilidad de señales específicas que permitan a las células adquirir un fenotipo mediante una vía de diferenciación o una activación específica.

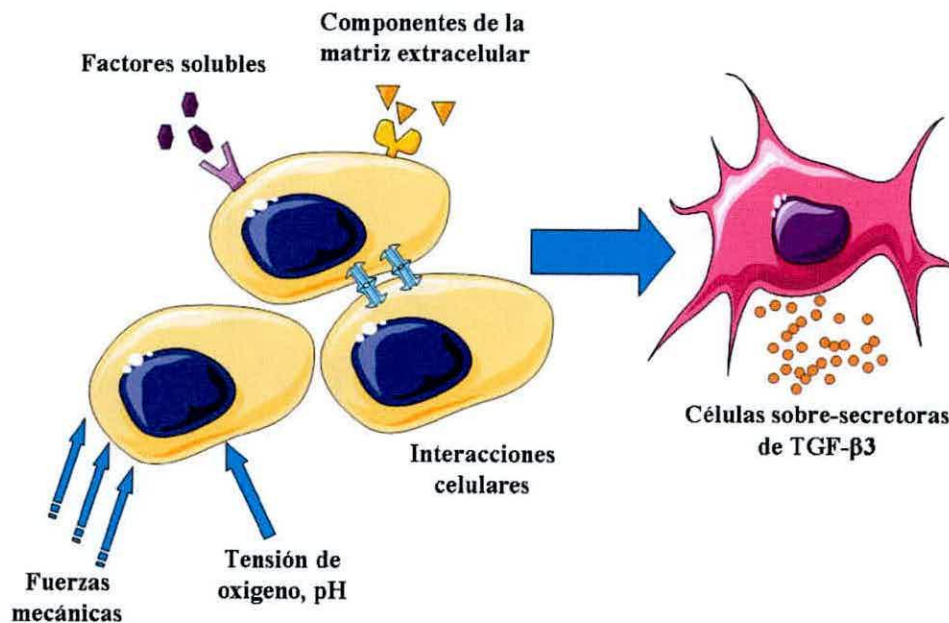


Figura 28. Modulación del fenotipo final de MSC mediante señales externas. MSC responden a diferentes señales que permiten obtener un fenotipo en particular, en este caso células sobre-productoras de TGF- β 3 (Figura adaptada de Korossis et al., 2005).

Los métodos de cultivo en 3D permiten que las células adopten una morfología nativa, se facilita el contacto célula-célula y a la vez el contacto con la MEC, por otro lado se alteran significativamente los procesos de señalización (Grayson et al., 2006). La condición de cultivo en 3D representa un estado en la cual las células se disponen de manera muy diferente a la condición de cultivo convencional en monocapa, por lo tanto, las señales a las cuales las células están expuestas son muy distintas a las del cultivo convencional en monocapa. Por esta razón se eligió como condición de inducción de una sobre-secreción de TGF- β 3 este tipo de cultivo. Para esto las células se encapsularon en fibrina, en alginato y también se sembraron en el SII antes descrito.

3.1 Encapsulación en Alginato

PRPC-MSK se encapsularon en alginato siguiendo protocolos utilizados en otros trabajos de encapsulación de MSC (Goren et al., 2010). La concentración celular fue optimizada a $0,4 \times 10^6$ células/ml de alginato. A densidades celulares mayores la cápsula de alginato se empezaba a degradar lentamente a las 48 h, lo que no permitía proseguir el experimento hasta las 72 h bajo las mismas condiciones de cultivo. Esta mayor velocidad de degradación de la cápsula a densidades celulares altas, se podría atribuir a la producción de enzimas que participan en la biodegradación de la matriz. Por otra parte, a esta densidad celular el número de células por condición de estudio (monocapa, fibrina, alginato y SII) era similar cuando las células eran sembradas en pocillos de placas de 24 pocillos ($1,9 \text{ cm}^2$). A un mayor número de células, la condición en monocapa no podía ser comparada, pues desde un inicio las células ya estarían en confluencia.

El proceso de encapsulación no afectó la viabilidad celular, lo que se comprobó realizando cortes de las cápsulas y visualizando las células vivas y muertas mediante el ensayo live/dead (Figura 18C). También se observó una disposición no homogénea de las células en la cápsula (Figura 18D), probablemente debido a que durante la polimerización del alginato se crea un microambiente con características heterogéneas, sectores muy densos (corteza superficial), zonas de gelificación fuerte, media y débil y regiones con microfracturas y zonas huecas o túneles (Bienaimé et al., 2003; Figura 29). De acuerdo a la figura 18D, las células se disponen preferentemente en la zona de gelificación media. También se pudo observar que la morfología de las células encapsuladas difiere con la morfología que presentan las células cultivadas en monocapa. Las células encapsuladas mantienen una morfología esférica durante todo el tiempo de cultivo.

Se determinó que no hay restricciones difusionales para el oxígeno y la glucosa cuando las células están cultivadas en las matrices de acuerdo a las condiciones experimentales de esta investigación. Esto último se estimó mediante el criterio del módulo de Thiele modificado para encapsulación celular (Kim et al., 1998; Villalobos et al., 2010, ver anexo II de cálculo del módulo de Thiele).

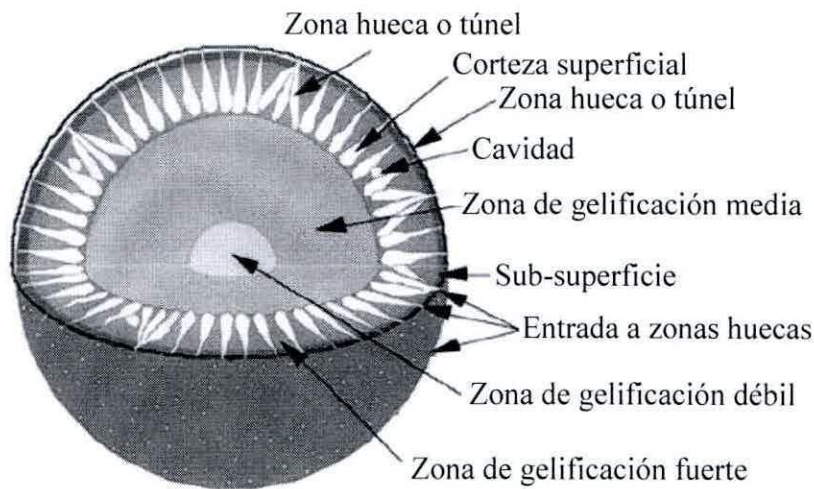


Figura 29. Representación esquemática de la heterogeneidad estructural que se produce en el proceso de polimerización de las cápsulas de alginato (Figura adaptada de Bienaimé et al., 2003)

El alginato ha sido usado previamente como matriz de encapsulación de MSC (Duggal et al., 2009; Goren et al., 2010; Ghidoni et al., 2008). La encapsulación de células en alginato representa un excelente sistema de cultivo que permite la expansión y diferenciación de distintos tipos celulares. De hecho se supone que mantiene la viabilidad celular, promueve la proliferación y la producción de matriz extracelular (Tuan et al., 2003). Sin embargo esta matriz no es especialmente funcional para que las células interactúen de manera eficiente con la matriz.

En estudios anteriores se han usado péptidos para modificar el alginato de manera que este se funcione para que posea la actividad bioactiva que necesitan ciertas células para ejercer funciones avanzadas y mejorar la adhesión celular (Zhou y Xu, 2011). Generalmente esta modificación se hace agregando péptidos correspondientes a la señal RGD. La señal RGD (Arg-Gly-Asp) es la secuencia de adhesión de muchos tipos celulares. Muchos tipos de integrinas reconocen esta secuencia en la matriz extracelular. Estas señales permiten que las células se anclen de manera más eficiente a la matriz, permitiendo también que se activen las vías de señalización para que las células proliferen y ejerzan otras actividades biológicas (Ruoslahti, 1996).

De acuerdo a este antecedente se eligió esta matriz como un control para analizar si el efecto de la encapsulación sobre PRPC-MSc se debe sólo al hecho de que las células se encuentran en una

conformación en 3D, o si el cambio funcional observado se debe principalmente a la interacción con la matriz de manera avanzada dada por este tipo de interacciones, como las mediadas por la señal RGD y otras similares, que el alginato no posee, pero si la fibrina (Hunt y Grover, 2010).

3.2 Encapsulación en Fibrina

Una red de fibrina es la primera matriz a la cual una célula queda expuesta cuando está desarrollando su rol en el proceso de reparación/regeneración de heridas (Janmey et al., 2009). A diferencia de las matrices extracelulares formadas por colágeno, laminina y proteoglicanos, las cuales se ensamblan lentamente y a medida que son secretadas por las células, la fibrina se ensambla muy rápidamente mediante una reacción de policondensación modificada entre el fibrinógeno, muy abundante en el plasma sanguíneo, tan pronto como la trombina es activada en la cascada de la coagulación. La trombina remueve parte de los polipéptidos del fibrinógeno que previenen su polimerización espontánea (Figura 30). El resultado es una red 3D de fibras entrecruzadas. (Janmey, 1982).

A diferencia del alginato, la fibrina es una matriz bioactiva la cual provee de señalización adecuada para que las células se adhieran y proliferen de manera muy eficiente. La molécula de fibrina tiene dos pares de sitios RGD que pueden interactuar con las integrinas (Janmey et al., 2009). Esta actividad biológica de la fibrina la hace una matriz atractiva para la encapsulación de diversos tipos celulares con funciones biológicas especiales, como células madre para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

Así, las células se encapsularon en fibrina con el objetivo de establecer si tanto la condición en 3D como las señales específicas dadas por la matriz producían un cambio funcional en PRPC-MSK, específicamente para provocar una activación de las células para que estas secreten TGF- β 3.

Hay antecedentes donde se ha observado que la encapsulación de células en fibrina provoca respuestas específicas, incluyendo cambios en la secreción de proteínas (Acevedo et al., 2010; Sporn et al., 1995). La respuesta celular a la superficie de la fibrina es dependiente de aspectos específicos de la estructura de la molécula de fibrina (señales mediadas por reconocimiento de las integrinas) como también de eventos generados durante el proceso de polimerización (liberación de los fibrinopéptidos A y B). Se ha descrito que los fibrinopéptidos pueden desencadenar cambios en las respuestas celulares de las células en contacto con la fibrina (Sporn et al., 1995).

secreción de enzimas fibrinolíticas en respuesta al contacto con la fibrina como parte de su capacidad de migrar hacia el tejido dañado y ejercer su acción reparadora, proceso que ha sido descrito en la literatura (Neuss et al., 2010). Por esta razón se continuó utilizando sólo la condición con fibrinógeno 54 mg/mL con el propósito que las células estuvieran el mayor tiempo posible dentro de la matriz de fibrina.

3.3 Cultivo de PRPC-MSC en el SII

El sistema de implante integrado (SII) utilizado en esta investigación corresponde a un producto de ingeniería de tejidos desarrollado por investigadores de la Universidad Federico Santa María y Universidad de Valparaíso (Weinstein-Oppenheimer et al., 2010) y que ha sido exitoso en pruebas pre-clínicas y clínicas en el tratamiento de heridas. La matriz polimérica está formada por quitosano, gelatina y ácido hialurónico. Al igual que en el caso de la fibrina, los biomateriales que conforman esta matriz polimérica tienen propiedades bioactivas debido a que contienen dominios específicos como la señal RGD, estos también son bioabsorbibles y biodegradables (Tan et al., 2007). A diferencia de la encapsulación en alginato y fibrina, en esta matriz las células se disponen dentro de los poros (Figura 20A), generando otro tipo de conformación, que no necesariamente es una encapsulación, pues las células no se encuentran rodeadas por una matriz, si no que están adheridas a las paredes porosas (Mao, 2003). En el caso particular del SII las células son incorporadas en la matriz usando a la fibrina como transportador, mediante una gelificación *in situ* (Young et al., 2006). Como la fibrina se utiliza como vehículo y esta se polimeriza con las células en su interior, el efecto en el cambio de condiciones de cultivo puede ser similar al que experimentan en el caso de la formación de cápsulas de fibrina, por lo menos a tiempos iniciales. Sin embargo después de cierto tiempo en cultivo las células probablemente escapan de la red de fibrina pudiendo quedar en contacto directamente con la matriz porosa de quitosano. Se ha reportado que la adhesión celular en sustratos adecuados promueven la actividad celular, la cual puede resultar en la producción de factores de crecimiento que son importantes en la regeneración de tejidos (Weinstein-Oppenheimer et al., 2010).

Al igual que en los casos anteriores, la viabilidad celular no se vio afectada por el proceso de cultivo en el SII. En este caso no es posible determinar la viabilidad celular con el ensayo live/dead, pues la matriz al no ser transparente no permite observar las células en su interior. Para tener una apreciación cualitativa de la viabilidad celular se realizó un ensayo utilizando WST-1, así, las células

metabólicamente activas producirán la coloración característica que pudo ser observada (Figura 20B). La gelificación *in situ* se optimizó para que las células se dispersaran por toda la superficie (Figura 20B).

3.4 Proliferación de PRPC-MSK en matrices

PRPC-MSK fueron cultivadas en las 4 condiciones a comparar en este estudio, monocapa, fibrina, alginato y SII y determinada la proliferación a distintos tiempos (24, 48 y 72 h) (Figura 21) mediante el ensayo WST-1. Las células fueron sembradas en un número constante en todas las condiciones (aproximadamente 2×10^4 células/condición). La proliferación celular fue mayor en las condiciones de cultivo en 3D en comparación con células cultivadas en monocapa (prueba t, $p < 0,05$). Este resultado se refleja en los TDP obtenidos (Figura 21). Las células cultivadas en las matrices de fibrina, alginato y SII proliferaron casi 4 veces más rápido que las células cultivadas en monocapa. La proliferación comparada entre las matrices fue muy similar (Figura 21). Hay que considerar que no necesariamente las células tienen una menor capacidad proliferativa en monocapa en comparación con los cultivos en matrices (Figura 9). La diferencia radica en que al tener menor superficie para expandirse en la condición de monocapa, se produce inhibición del crecimiento por contacto a tiempos iniciales post-siembra (Wieser et al., 1990). Esto es porque el experimento se realizó en pocillos de $1,9 \text{ cm}^2$, así el número inicial de 2×10^5 células ya implica que las células a las 24 h de cultivo llegan a la confluencia. Sin embargo cuando las células están encapsuladas, la superficie que tienen para proliferar antes de llegar a la inhibición por contacto es mucho mayor. No se observaron diferencias significativas en la proliferación celular entre las condiciones de cultivo en matrices, exceptuando entre crecimiento en alginato en comparación con crecimiento en fibrina y SII (Figura 21, prueba t, $p < 0,05$).

Se observó que partir de las 48 h en alginato cesó la proliferación celular, esto puede explicarse por la naturaleza del alginato, la cual no es considerada una matriz completamente bioactiva para las células, debido a que en esta no hay señales específicas de adhesión celular como es el caso de la señal RGD (Ruoslahti, 1996). Esto finalmente produce que las células pierdan adherencia a la matriz, provocando la detención del ciclo celular. Por otro lado la proliferación en fibrina y en el SII fue muy similar, probablemente porque en ambos casos las células están en contacto con las señales bioactivas que proporciona la fibrina.

3.5 Consumo de glucosa y producción de lactato

Con el objetivo de visualizar el estado metabólico de las células inmovilizadas en comparación con el cultivo convencional en monocapa se determinó el consumo de glucosa y la producción de lactato (Figura 22). Se aprecia una diferencia significativa entre el consumo de glucosa de las células cultivadas en las matrices en relación a las células en monocapa, estas últimas consumieron un 53% más de glucosa que las células cultivadas en la condición en 3D (Figura 22A). Este fenómeno no se debe a restricciones difusionales de los nutrientes cuando las células están encapsuladas, basándose en el criterio del módulo de Thiele modificado (Kim et al., 1998; ver apéndice II para el detalle del cálculo y resultados). Es muy probable que las condiciones de cultivo en conformación 3D afecten de alguna manera el metabolismo celular, por ejemplo cambios en el consumo de glucosa y producción de lactato se han observado en cultivos de MSC en microcarriers (Schop et al., 2008). Se sabe muy poco acerca de las consecuencias bioquímicas del proceso de inmovilización sobre las células (Simpson et al., 2007), por otro lado el requerimiento nutricional de las células madre esta poco estudiado.

Con respecto al rendimiento de glucosa en lactato calculado ($Y_{\text{lactato/glucosa}}$, Figura 22C), este fue menor a 2 mg/mg en monocapa y fibrina lo que indica que el lactato producido proviene del metabolismo de la glucosa (a partir de 1 mol de glucosa se generan 2 moles de lactato). La acumulación de lactato hasta $Y_{\text{lactato/glucosa}}$ 10,8 y 3,8 mg/mg en alginato y SII respectivamente, puede estar asociado a cambios en el metabolismo energético de la célula (Higuera et al., 2012). Es muy probable que bajo condiciones físicas, químicas y factores biológicos particulares, las células encapsuladas puedan sufrir modificaciones en sus actividades metabólicas. Estudios previos han descrito diferencias en las actividades metabólicas entre células cultivadas en monocapa y células encapsuladas. Por ejemplo se ha visto que células encapsuladas en alginato disminuyen el consumo de glucosa e incrementan su tasa de crecimiento (Sun et al., 2007).

$Y_{\text{lactato/glucosa}}$ mayores que 2 pueden ser explicados por el hecho que el lactato también puede ser producido por el metabolismo de la glutamina y otros aminoácidos (Glacken 1988), así las células encapsuladas en alginato y SII estarían metabolizando preferentemente glutamina sobre glucosa, esto deducido del hecho que $Y_{\text{lactato/glucosa}}$ son mayores que 2. Es importante considerar que además del

metabolismo de la glucosa, la energía celular también puede ser generada mediante el metabolismo de la glutamina. Este aminoácido no esencial, presente en el medio de cultivo utilizado, es hidrolizado mediante la glutaminasa generando glutamato y amonio. El glutamato luego es convertido a α -cetoglutarato que luego es convertido en piruvato vía ciclo de Krebs y el transportador malato-aspartato. La conversión de la glutamina a piruvato es llamada glutaminólisis. El piruvato luego puede ser convertido a lactato.

El hecho que las células encapsuladas consumen menos glucosa podría indicar que se favorece el metabolismo aeróbico de la glucosa en las células cultivadas dentro de las matrices, requiriendo así menor cantidad de glucosa para generar la energía necesaria para los procesos celulares y por otro lado, el lactato se estaría generando a partir del catabolismo de la glutamina y del piruvato (Schneider, 1996). Se ha observado que MSC consumen rápidamente la glutamina presente en el medio durante las primeras 72 h de cultivo, pero que la glutamina no sería tan importante en el metabolismo energético de MSC en condiciones de cultivo convencionales (Higuera et al., 2012).

Los resultados obtenidos pueden también deberse a otros factores producidos por la encapsulación celular que muchas veces no son considerados. Como se analizará a continuación, muchos de estos cambios comparando cultivo en monocapa con condiciones de cultivo en 3D pueden deberse a efectos producidos por la composición química de las matrices y la interacción con la MEC (Schop et al., 2009). Estos factores corresponden al estrés celular producido por el proceso de encapsulación (Schneider 1996; Sun et al., 2007), cambios en el metabolismo celular (Constantinidis et al., 1999; Simpson et al., 2006), estimulación mecánica (Chen 2010; Constantinidis et al., 1999; O’Cearbhaill et al., 2003; Eshghi y Schaffer, 2008; Bilodeau, 2006), efectos de la elasticidad de la matriz (Engler et al., 2006), que las células perciben al estar encapsuladas. Debido a que el metabolismo celular se ve alterado en el cultivo 3D en comparación con el cultivo en monocapa, esto puede tener implicaciones significativas en el uso de matrices debido a que el metabolismo afecta toda la fisiología celular (Deorosan y Nauman, 2011).

3.6 Producción de TGF-β3 por PRPC-MSC en condiciones de cultivo en 3D

De los puntos discutidos anteriormente, se ha presentado el concepto de que las células en monocapa y las células cultivadas en las condiciones en 3D se encuentran en un estado fisiológico distinto en términos de proliferación celular, morfología y estado metabólico. Lo siguiente es determinar si estas condiciones propician a que las células adquieran una funcionalidad distinta, en este caso que adquieran un fenotipo de secreción de un factor de crecimiento muy importante en la reparación/regeneración tisular como es TGF-β3 (Hao et al., 2008; Kohama et al., 2002; Occleston et al., 2009). Muy probablemente la diferencia entre el perfil de secreción de factores de crecimiento entre la condición en monocapa y la condición en 3D es muy distinta. Esta investigación se enfocó en TGF-β3, debido a su relevancia en la regeneración de los tejidos sin cicatriz y también porque no hay estudios que hayan determinado la secreción de este factor comparando diferentes condiciones de cultivo, exceptuando por un estudio que analizó de manera global el cambio en el perfil de expresión de diversas citoquinas y factores de crecimiento de PDLC en condiciones de deformación mecánica, donde TGF-β3 fue uno de los factores de crecimiento que más se sobre-expresó en la condición analizada, esto se discutirá más adelante (Pinkerton et al., 2008).

Mediante cuantificación con el inmuno-ensayo ELISA, se determinó un cambio significativo en la secreción de TGF-β3 por células cultivadas en la condición en 3D en todos los tiempos analizados, en comparación con la condición en monocapa (Figura 23, prueba t * $p < 0,05$). Este cambio correspondió a un aumento de la secreción de aproximadamente 9 veces a las 24 h de cultivo ($19 \text{ pg/mL}/10^4$ células en monocapa a $174 \text{ pg/mL}/10^4$ en promedio en cultivo en matrices) y de casi 4 veces a las 48 y 72 h. Los niveles de TGF-β3 secretado están de acuerdo a los reportados para este y otros factores de crecimiento (Engler et al., 2006; Eshghi y Schaffer, 2008; Ingber, 2002; Sainio et al., 2009; Chen, 2010; Liu et al., 2006; Rehman et al., 2004; Acevedo et al., 2010; Somoza et al., 2010). No se observaron diferencias significativas en la secreción de TGF-β3 entre las condiciones de cultivo en matrices, este resultado estaría indicando que las distintas composiciones químicas de las matrices utilizadas no influenciarían *a priori* sobre la adquisición de un fenotipo secretor de PRPC-MSC. La activación de las células hacia un fenotipo secretor estaría gobernado por los cambios fisiológicos que las células experimentan al pasar de una condición de cultivo en monocapa a una condición en 3D (Simpson et al., 2006; Schop

2010; Constantinidis et al., 1999). Como se evidenció anteriormente el metabolismo celular cambia en las condiciones de cultivo en 3D con respecto al consumo de glucosa y producción de lactato (Figura 22), lo que podría estar relacionado con el cambio observado en la secreción del factor de crecimiento (Simpson et al., 2006; Schop 2010; Constantinidis et al., 1999).

Por otro lado, los cambios fenotípicos observados pueden deberse a que las señales transmitidas mediante receptores en la MEC afectarían a las células de diversas maneras. El estado dinámico de un cultivo celular, donde las conexiones adhesivas entre las células y la MEC son creadas y a la vez eliminadas, pueden llevar a respuestas celulares que no se observan bajo condiciones de cultivo convencionales (Bilodeau, 2006). Este estado dinámico es mayor a tiempos tempranos desde el proceso de encapsulación, lo que podría explicar la mayor secreción de TGF- β 3 a las 24 h (Figura 23). A tiempos mayores este estado dinámico entre la matriz y las células disminuye debido a que las células se adaptan a la nueva condición, regulando los procesos fisiológicos que cambiaron en las primeras horas post-encapsulación (Bilodeau, 2006).

Esta disminución de TGF- β 3 a tiempos posteriores también está relacionada con que esta proteína tiene un tiempo de vida media muy corto, aproximadamente 1 h (Yao et al., 2010), también se ha descrito que TGF- β 3 es consumido por las propias células que lo producen (dando indicios de esta señalización autocrina). Schinköthe et al, observaron que TGF- β 3 era consumido por MSC, comparando la cantidad inicial a las 24 h y la concentración final a las 72 h, la concentración del factor en el sobrenadante era de aproximadamente -25% (Schinköthe et al., 2008). En el caso de esta investigación la disminución de TGF- β 3 entre las 24 y 72 h fue de aproximadamente un -22%.

La activación de la vía de secreción de TGF- β no está del todo clara, se ha sugerido que su producción estaría regulada de manera autocrina (Acevedo et al., 2010). Una posible explicación de por qué los niveles de TGF- β 3 disminuyeron a partir de las 48 h es que podría estarse produciendo un feedback negativo, es decir TGF- β 3 estaría bloqueando su propia producción. Esto tiene sentido por el hecho de que la célula sensa que en su microambiente hay un exceso del factor, junto con la disminución de otras señales producidas en el proceso de encapsulación, y por lo tanto dejaría de secretar el factor al medio.

En la condición *in vivo* las MSC, al ser activadas, secretan factores de crecimiento y citoquinas anti-inflamatorias, anti-apoptóticas y pro-regeneradoras (anti-scarring) ante distintas señales de daño en los tejidos, provocando una activación de las células hacia un fenotipo secretor de diversos factores (Caplan y Correa, 2011). Se ha propuesto que las MSC activadas actúan como “mini-reactores” de secreción de factores de crecimiento y citoquinas. Esta producción de factores de crecimiento jugaría un rol en la coordinación y regulación de procesos celulares como la inflamación, proliferación celular, remodelación de la matriz extracelular, entre otros procesos (Liu et al., 2006).

La señales específicas de activación de MSC *in vivo* no son del todo conocidas, sin embargo como se discutió anteriormente, estas señales podrían ser tanto de naturaleza soluble, diversas interacciones con la matriz, estrés producido por falta de nutrientes, estrés mecánico y condiciones de hipoxia (Figura 29, Bilodeau 2006; Engler et al., 2006; Eshghi et al., 2008; Grayson et al., 2006; Haynesworth et al., 1996; Sainio et al., 2009; Sun et al., 2007; Ohtaki et al., 2008).

En un interesante trabajo, Ohtaki et al, 2008 inyectaron hMSC en el hipocampo de ratones adultos un día después de producida una isquemia transiente y global. Se observó que las MSC mejoraron la función neurológica y disminuyeron la muerte neuronal del hipocampo. Los autores determinaron que los transcriptomas de las MSC cambiaron mediante la sobrerregulación de 170 genes. Los autores discuten que los efectos beneficiosos de las células implantadas fueron producidos por MSC siguiendo una secuencia de eventos, primero las hMSC fueron activadas mediante señales de estrés provenientes desde el tejido isquémico o mediante comunicación cruzada con células isquémicas. Las hMSC activadas sobre-regularon la expresión de una serie de factores inmuno-modulatorios, anti-inflamatorios y anti-apoptóticos como LTBP2 (proteína de unión a TGF- β latente 1), TGF- β 2 y TGF- β 3 (Ohtaki et al., 2008).

En otro trabajo, los autores estudiaron la respuesta de PDLC a la deformación mecánica en términos de interacción de redes de citoquinas (Pinkerton et al., 2008). El objetivo era estudiar estos procesos biológicos complejos cuando las células son sometidas a deformación mecánica en los tejidos, especialmente por que las células que componen los tejidos dentales, están mucho más expuestas a estas fuerzas mecánicas en comparación a células de otros tejidos. Consistente con la hipótesis que la

fuerza de tensión podría favorecer un patrón osteogénico de señalización se observó una sobreexpresión de TGF- β 1 y TGF- β 3 (Pinkerton et al., 2008).

Considerando estos antecedentes, cuando las células son transplantadas en un tejido en particular se produce un cambio de la condición de cultivo, similar a lo que ocurre cuando las células son encapsuladas en matrices que imitan la función de la MEC. Este cambio generaría modificaciones generales en la fisiología celular.

Las señales que producen estos cambios en las células al cambiar la condición de cultivo estarían mediadas por mecanismos de mecanotransducción. El término mecanotransducción se refiere al proceso mediante el cual las células transducen el estrés mecánico en señales bioquímicas para regular diversas funciones. Las vías de señalización que son activadas mediante la estimulación mecánica pueden afectar funciones celulares como apoptosis, contracción, diferenciación, migración, proliferación y secreción (Sniadecki, 2010).

Estos mecanismos de mecanotransducción son importantes en condiciones *in vivo*, no tanto así en condiciones de cultivo tradicionales en monocapa. Las células en los tejidos constantemente están expuestas a estímulos mecánicos (Ingber, 2002). Estímulos físicos tales como las fuerzas de corte, compresión y tensión, no solo alteran la organización y distribución de elementos estructurales y organelos dentro de las células, sino que también se transducen en señales bioquímicas que modulan vías de señalización dentro y entre las células (Bilodeau, 2006).

El estrés mecánico es un modulador importante de la fisiología celular. Hay considerable evidencia que los estímulos físicos afectan la expresión génica e incrementan significativamente la actividad biosintética en distintas células. Los efectos del ambiente mecánico en el comportamiento de células óseas ha sido estudiado extensivamente y más recientemente hay evidencia que las MSC en tejidos no óseos también responden a estímulos mecánicos (Bilodeau, 2006).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el proceso de inmovilización de las células en las matrices podría estar proporcionando las señales mecánicas que producen los cambios fisiológicos, en este caso la activación de PRPC-MS para secretar factores de crecimiento, específicamente TGF- β 3. La química de la matriz no sería lo más importante en este caso, pues no se observaron diferencias significativas de proliferación y secreción de TGF- β 3 entre las matrices (Figura 21 y 23), esto sugiere

que el cambio de condición de cultivo es lo que gatilla la activación de la secreción, lo que podría deberse a los cambios dinámicos de interacciones célula-matriz y el estrés mecánico que las células sensan al pasar de una condición de cultivo en monocapa (2D) a una condición de cultivo en 3D, producidas probablemente por el proceso de polimerización del alginato y la fibrina. El hecho de que la secreción de TGF- β 3 disminuya después de las 48 h en las matrices puede atribuirse a que las señales *dinámicas* y mecánicas que gatillaron el cambio inicialmente ya no son tan significativas y permiten una adaptación de las células en la nueva condición.

Otra asociación importante que se puede establecer en estos eventos es el rol de las integrinas con respecto a la mecanotransducción y también a su función como transductores de vías de señalización específicas (Ingber, 2002; Eslami et al., 2009). El estrés mecánico aplicado a las integrinas puede activar vías de señalización intracelulares e inducir la transcripción génica (Ingber, 2002). Por otro lado ciertas integrinas con ligandos específicos pueden ser sobrerregulados en condiciones microambientales particulares, por ejemplo la integrina α v β 6 es co-expresada y se encuentra co-localizada con TGF- β 3 en heridas de tejido gingival, esta co-expresión se mantiene a lo largo de la regeneración de la herida sin observarse la formación de tejido cicatrizal (Eslami et al., 2009).

En otro estudio similar que evaluó la secreción de diversos factores de crecimiento cuando MSC fueron estimuladas con extracto de tejido dañado (dermis), La producción de TGF- β se incrementó significativamente el primer día en que los cultivos se condicionaron con los extractos del tejido dañado. Las células produjeron 711-809 pg/mL de TGF- β en comparación de 75-121 pg/ml con extracto de tejido sano (valores que están dentro de los rangos que se obtuvieron en esta investigación). Los autores concluyen que el medio inflamatorio de la herida puede estimular la producción de factores de crecimiento por MSC (Liu et al., 2006). Esto ilustra como distintas señales pueden gatillar que MSC se activen adquiriendo un fenotipo de “célula medicinal”.

3.7 Expresión génica de TGF- β 3

Es interesante observar que la activación celular, dada por la condición de cultivo en 3D, está posiblemente relacionada con la activación de la vía de secreción de TGF- β 3 y no necesariamente a una activación de la transcripción de TGF- β 3. Esto se infiere del hecho de que la expresión génica se

mantuvo constante en el tiempo y sin cambios significativos entre las condiciones de cultivo (Figura 24). Como se mencionó anteriormente, esto también se puede concluir del hecho que las células en monocapa están expresando la proteína intracelularmente (Figura 17), sin embargo en esta condición la activación de la vía de secreción no estaría favorecida. Se ha observado que el periodo de liberación de factores de crecimiento está regulado tanto espacial como temporalmente mediante diversos eventos celulares y su relación con la evolución de las condiciones microambientales (Purcell et al., 2009). En trabajos pioneros en el estudio de la producción de TGF- β se observó que monocitos no activados expresaban el mRNA de TGF- β , pero no secretaban la proteína al medio a menos que estos fueran activados a macrófagos, los autores sugieren que la expresión del mRNA de TGF- β es constitutiva, mientras que la secreción es inducible. Esto mismo se evidenció al analizar la expresión de TGF- β en una línea celular de monocitos (U937) (Assoian et al., 1987). En otro trabajo con MSC se observó que TGF- β era expresado constitutivamente por MSC (Liu et al., 2006).

3.8 Expresión de otros factores de crecimiento

Mediante RT-PCR no cuantitativo se analizó la expresión de otros factores de crecimiento importantes en la regeneración/reparación de heridas (Carter, 2003; Barrientos et al., 2008; Grazul-Bilska et al., 2003). Estos son EGF, FGF2, VEGF y PDGF. La principal función de EGF es incrementar la epitelización de heridas y reducir la formación de cicatriz previniendo la excesiva contracción de la herida. FGF2 es un poderoso mitógeno de varios tipos celulares, induce la migración celular y la neovascularización. PDGF también es un mitógeno de varios tipos celulares, promueve la angiogénesis, la producción de colágeno, por lo tanto participa activamente en la remodelación de la MEC del tejido dañado. Por último VEGF es mitógeno específico de las células endoteliales con una potente actividad angiogénica *in vivo* (Grazul-Bilska et al., 2003; Barrientos et al., 2008). Se ha observado una mejora en la reparación de heridas al aplicar estos factores de crecimiento en el tejido afectado (Liu et al., 2006).

En general no se observaron cambios en la expresión de estos factores comparando la condición de cultivo en monocapa y en matrices (Tabla 7), exceptuando por PDGF cuya expresión se indujo en alginato y fibrina a las 24 y 48 h. Este resultado está de acuerdo con la noción de que TGF- β y PDGF interactúan en los procesos de reparación de heridas (Barrientos et al., 2008). Por otro lado se ha descrito que la transcripción de PDGF es activada mediante la vía de señalización Smad2/3/4 mediada

por TGF- β (Andrae et al., 2008), esto se correlaciona con los resultados, pues a las 24 h hay mayor concentración de TGF- β 3 lo que podría estar activando la transcripción de PDGF. Se ha descrito que PDGF se expresa tempranamente en heridas de embriones y adultos, sin embargo en las primeras desaparece a las 48 horas de producida la herida (Broker et al., 1999).

Se encontró que FGF2 está expresado permanentemente en todas las condiciones de cultivo analizadas, esto es un resultado esperado, pues se ha observado anteriormente que FGF2 se expresa constitutivamente en MSC (Liu et al., 2006). Por otro lado se ha demostrado que muchas de las funciones tróficas de MSC están mediadas por FGF2, por lo tanto su expresión es una señal de que estas células se mantienen funcionales en su acción trófica cuando están en la condición de cultivo en 3D (Mías et al., 2008; Trouche et al., 2010).

No es común encontrar trabajos donde estudien la expresión y secreción por MSC de EGF, al igual que TGF- β 3 (Meirelles et al., 2009). Liu et al., observaron que la secreción de EGF era activada mediante la exposición de MSC a extracto de tejido dañado (la misma inducción se produjo con TGF- β). También se observó que EGF era expresado tanto en la condición control (MSC en monocapa sin estímulo) y en las condiciones con estímulo (Liu et al., 2006). En el caso de PRPC-MSK la expresión de EGF fue inducida por el tiempo de cultivo y no por las condiciones de cultivo (Tabla 7), lo que podría indicar que la expresión de EGF se activa por la acumulación de otras señales indeterminadas en el medio de cultivo.

Por último VEGF no se expresó en ninguna de las condiciones analizadas, indicando que PRPC-MSK no producen este factor de crecimiento involucrado en la angiogenesis. Este último resultado no concuerda con lo reportado en varios trabajos con MSC que informan que MSC producen VEGF en varias condiciones (Meirelles et al., 2009; Liu et al., 2006; Doorn et al., 2012). La falta de expresión de VEGF concuerda con la observación de que las células en las condiciones de cultivo evaluadas en este trabajo no se encuentran en situaciones de hipoxia, pues la expresión de este factor de crecimiento en MSC es inducida por bajas concentraciones de oxígeno (Chung et al., 2009; Grayson 2009; Baumgartner et al., 2010; Kagiwada et al., 2008). Finalmente es importante destacar la expresión de TGF- β 3, EGF, FGF2 y PDGF por las PRPC-MSK en las condiciones estudiadas, pues se ha reportado que en úlceras crónicas, la expresión de estos 4 factores está muy disminuida (Robson et al., 1998), así,

implantar células que eventualmente puedan producir estos factores en las heridas permitiría generar una mejora substancial de la reparación de los tejidos.

3.9 Análisis de componentes principales

Del análisis se pueden destacar algunas asociaciones interesantes que confirman algunas observaciones iniciales y otras que aparecen gracias al análisis que permite el método. Del análisis de correlaciones significativas se observa que la concentración de TGF- β 3 está correlacionada de manera positiva con la concentración de glucosa en el medio, lo que podría indicar que a altas concentraciones de glucosa se favorece la secreción de TGF- β 3 al medio, algo similar ocurre con la expresión de PDGF, la cual se favorece a altas concentraciones de glucosa (Figura 25).

En un estudio anterior se observó el efecto contrario cuando se realizó el mismo análisis con TGF- β 1, ya que a bajas concentraciones de glucosa se estimulaba la secreción de TGF- β 1 (Acevedo et al., 2010). Este resultado podría estar relacionado con el efecto contrapuesto que tienen TGF- β 1 y β 3, donde el primero es básicamente pro-inflamatorio y el segundo es anti-inflamatorio (Watabe y Miyazono, 2009), así, la concentración de glucosa en el medio podría ser uno de los estímulos que permiten activar la secreción de una u otra isoforma, tema que requiere ser elucidado en investigaciones futuras. Otra correlación que confirma esta observación es que a mayor consumo de glucosa disminuye la concentración de TGF- β 3 en el medio (Figura 25). Otra asociación significativa que se observó fue que a mayor concentración de TGF- β 3 aumenta la producción de TGF- β 3, lo que indicaría una acción autocrina, por lo menos a tiempos iniciales. De este análisis se confirma lo que se había discutido anteriormente, en relación a que la expresión de PDGF podría estarse activando a medida que aumenta la concentración de TGF- β 3, la misma correlación positiva aparece al correlacionar la expresión génica de TGF- β 3 y PDGF. Por otro lado se verificó que a mayor concentración de lactato disminuye la secreción de TGF- β 3 y la expresión de PDGF, lo que podría estar relacionado con el efecto tóxico de la acumulación del lactato en el medio o eventualmente el lactato podría ser una señal por sí solo.

En el análisis de contrastes entre grupos de variables (Tabla 8) se observan asociaciones en el primer componente principal entre el grupo de variables “tiempo y lactato”, con el grupo “concentración de TGF- β 3 en el medio y la expresión de PDGF”, esto indica que a mayor tiempo hay mayor

concentración de lactato lo que afectaría la concentración de TGF- β 3 en el medio y consecuentemente la expresión de PDGF al haber más o menos cantidad de TGF- β 3 que active su expresión. De este análisis se puede inferir que la acumulación de lactato en el medio podría estar afectando la estabilidad de TGF- β 3, por ejemplo cambiando el pH. En el segundo componente principal contrastaron los grupos de variables “biomasa y tiempo” con el grupo “producción de TGF- β 3, consumo de glucosa y producción de lactato”, resultado que es completamente lógico, pues la producción y consumo de metabolitos depende exclusivamente de las células.

Se ha venido discutiendo hasta ahora que el cambio en la condición de cultivo desde monocapa a cultivo en 3D es el factor que determina que las células activen su capacidad secretora de TGF- β 3 y que la química de la matriz no estaría involucrada en este cambio. Sin embargo, el análisis de contribución permite destacar que el tipo de matriz si tiene un efecto sobre las células (Tabla 9). Es necesario recordar que no se incluyó en este análisis a la matriz SII, debido a que no fue posible realizar el análisis de expresión génica. Sin embargo como en el SII las células también están en contacto con la fibrina, el efecto global podría ser similar al analizado en el caso de la encapsulación en fibrina. De manera general se observa que el cambio de condición desde monocapa a fibrina contribuye más al cambio en las variables analizadas, exceptuando por la expresión de PDGF (Tabla 9). Las contribuciones de la fibrina son especialmente significativas en la generación de biomasa, concentración de lactato, crecimiento celular, producción de TGF- β 3 y producción de lactato. Estos resultados están de acuerdo a lo reportado sobre las condiciones favorables de cultivo de MSC y otras células en fibrina, debido a que esta matriz tiene características bioactivas para las células que están en contacto con ella, especialmente porque permiten que receptores de la superficie celular, como las integrinas, interaccionen con las señales que proporciona la fibrina originando señalización intracelular (Janmey et al., 2009; Clark, 2001; Eshghi y Schaffer, 2008; Mazlyzam et al., 2007).

Finalmente del gráfico del primer plano principal (Figura 26) se observan agrupaciones de condiciones, junto con las variables a las cuales afectan más significativamente (ver agrupaciones destacadas de las condiciones de cultivo en cada uno de los 4 cuadrantes de la Figura 26). Así, la condición de cultivo en monocapa es en general muy similar en todo el período de tiempo del experimento y afectaría más significativamente al consumo de glucosa. En cuanto al cultivo en fibrina y alginato se observan asociaciones de acuerdo a los distintos tiempos de cultivo, esto de acuerdo a que a las 24, 48 y 72 h se

ubicar en cuadrantes distintos dentro del análisis. En el cuadrante inferior izquierdo se destaca que la condición de cultivo en fibrina a las 24 horas es la que afecta más a la producción de TGF- β 3 y en menor medida a su expresión génica. A las 48 h de cultivo en fibrina y en alginato las variables que más se afectan son la concentración de glucosa, la concentración de TGF- β 3 y la expresión de PDGF. Finalmente a las 72 h de cultivo en fibrina y alginato tienen mayor relevancia en el cambio de la expresión de EGF. Considerando los resultados obtenidos, junto con los antecedentes discutidos, se plantea un modelo en cual se describen los posibles mecanismos que estarían involucrados en la activación de PRPC-MSK para secretar TGF- β 3 (Figura 31).

Estos resultados permiten establecer recomendaciones en el diseño del proceso que permitan una optimización de la secreción de TGF- β 3. El proceso debe ser diseñado para tiempos cortos, mantener una concentración de glucosa del orden de 1 g/L, por ejemplo mediante la disminución del consumo de glucosa cambiando las condiciones de cultivo (i.e bajando la temperatura del cultivo).

4. Importancia de TGF- β 3 en ingeniería de tejidos

Los procesos de reparación son muy complejos, consisten en múltiples componentes celulares y moleculares que actúan de manera concertada para llevar a cabo un proceso cuyo objetivo, en organismos adultos, es producir una reparación rápida de los tejidos (Ferguson y O'Kane, 2004). Esto se logra principalmente porque, luego de la lesión, se genera una respuesta inflamatoria importante, seguida de una remodelación del tejido no estructurada que finalmente genera una cicatriz, principalmente debido a que el tejido fibroso reemplaza a la arquitectura normal del tejido (Metcalf y Ferguson, 2007). En muchos casos el proceso de cicatrización puede generar cicatrices hipertróficas y queloides, que producen morbilidad, problemas de movimiento, restricción del crecimiento y mala estética.

En contraste numerosos estudios han demostrado que embriones regeneran los tejidos dañados de manera perfecta, sin la mínima generación de cicatriz (Ferguson y O'Kane, 2004). El patrón histológico de los tejidos embrionarios es restaurado como si no hubiera sido dañado (Broker et al., 1999). Por otro lado se ha descubierto que en el organismo adulto, los tejidos de la mucosa bucal tienen la capacidad de repararse con mínima generación de cicatriz (Eslami et al., 2009; Schrementi et al., 2008).

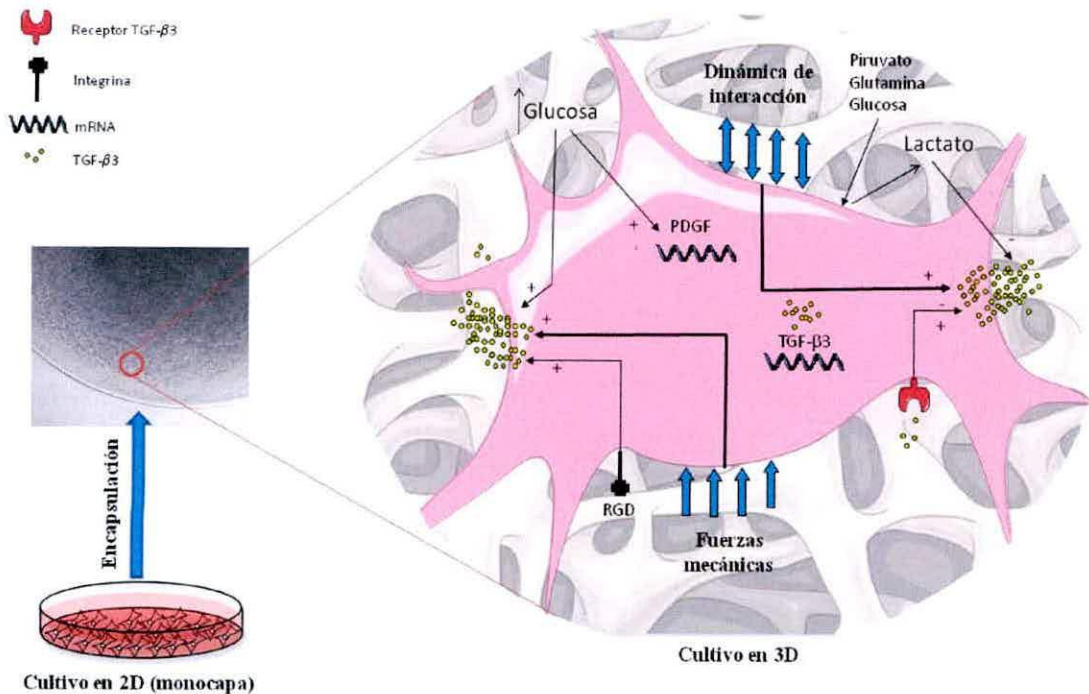


Figura 31. Modelo propuesto para la activación de la secreción de TGF-β3 por PRPC-MSC encapsuladas en fibrina y alginato. Cuando las células cultivadas en monocapa pasan a la condición de cultivo en 3D, se exponen a estímulos que producen cambios fisiológicos. Durante el proceso de encapsulación, las células sufren tensiones superficiales producidas por fuerzas mecánicas durante la polimerización de la matriz. Estas fuerzas mecanotransducidas podrían activar vías de señalización intracelulares que influyan en el cambio en los fenómenos medidos (glicólisis, secreción de TGF-β3, expresión génica). Los cambios dinámicos de interacción entre las células y la matriz durante el tiempo inicial de la encapsulación también podrían estar involucrados en los cambios observados. Las concentraciones de glucosa y lactato parecen tener cierta influencia en el proceso, la glucosa en la expresión génica de PDGF y la secreción de TGF-β3 y el lactato en la estabilidad de la proteína en el medio. La señalización autocrina producida por TGF-β3 también podría afectar su propia secreción, positivamente a tiempos iniciales y negativamente a tiempos posteriores. En el caso de la fibrina las interacciones específicas dadas por la composición química de la matriz, como por ejemplo la señal RGD, afectarían en cierta medida en los cambios observados. Finalmente se observó una expresión constitutiva del mRNA de TGF-β3, lo que podría ser un indicador que estas células están en un estado precondicionado para producir el factor de crecimiento. Como se discutió, en este sistema la disponibilidad de los nutrientes no está restringida por fenómenos difusionales, por otro lado es muy posible que el exceso de lactato producido provenga del metabolismo de la glutamina y el piruvato.

Una consecuencia directa de estas diferencias entre la reparación de los tejidos en embriones y adultos es que el perfil de factores de crecimiento asociados a este proceso en ambos modelos es distinto, lo mismo ocurre comparando el tejido de la mucosa oral y la piel (Tabla 10; Ferguson y O’Kane, 2004; Metcalfe et al., 2007; Broker et al., 1999).

En ambos procesos se han identificado los factores que producen estas diferencias, en comparación con la reparación de heridas cutáneas, uno de estos factores es TGF- β 3 que juega un rol clave en la reparación sin generación de cicatriz. Esto se hizo evidente cuando se descubrió que TGF- β 3 era la isoforma que más se expresaba en tejido embrionario y mucosa oral, esto en comparación a TGF- β 1, TGF- β 2 y otros factores de crecimiento (Occeleston et al., 2008; Beanes et al., 2003; Hao et al., 2008; Tabla 10).

Tabla 10. Niveles de algunos factores de crecimiento en tejido embrionario y fetal en comparación con tejidos adultos		
Factor de crecimiento	Herida en tejido fetal y embrionario	Herida en tejido adulto
TGF- β 1	bajo/ausente	alto
TGF- β 2	bajo/ausente	alto
TGF- β 3	alto	Muy bajo
PDGF	muy bajo/ausente	alto
FGF	alto	bajo

Experimentos posteriores realizados en embriones transgénicos indicaron que la manipulación experimental de los niveles de estos factores de crecimiento, especialmente de las isoformas de TGF- β , permitía obtener una reparación del tejido con cicatriz reducida o sin cicatriz (Schwade et al., 2002; Sha et al., 1995; revisado en Ferguson y O’Kane, 2004). De estos estudios se ha determinado que TGF- β 3 tiene un rol fundamental en la regeneración de tejidos.

Estos antecedentes y muchos otros que confirman el rol de TGF- β 3 como un agente regenerador hacen de este factor de crecimiento un blanco promisorio para aplicaciones terapéuticas e ingeniería de tejidos. Numerosos estudios en animales y uno en humanos han permitido establecer que la aplicación

exógena de TGF- β 3 produce una aceleración de la reparación, junto con un remodelamiento ordenado de la matriz extracelular, lo que finalmente produce un tejido fuerte y elástico, al contrario de lo que es el tejido cicatrizal (Hao et al., 2008).

Todos los ensayos clínicos en humanos con TGF- β 3 han sido realizados por la empresa biotecnológica Renovo. Estudios clínicos en fase I y II en voluntarios humanos utilizando TGF- β 3 de manera intra-dermal (llamado JuvistaTM) demostraron la seguridad y tolerabilidad de este factor de crecimiento. Por otro lado se ha observado una disminución estadísticamente significativa del tamaño de la cicatriz y una mejor apariencia de incisiones controladas en comparación al grupo placebo (Ferguson et al., 2009; Figura 32).

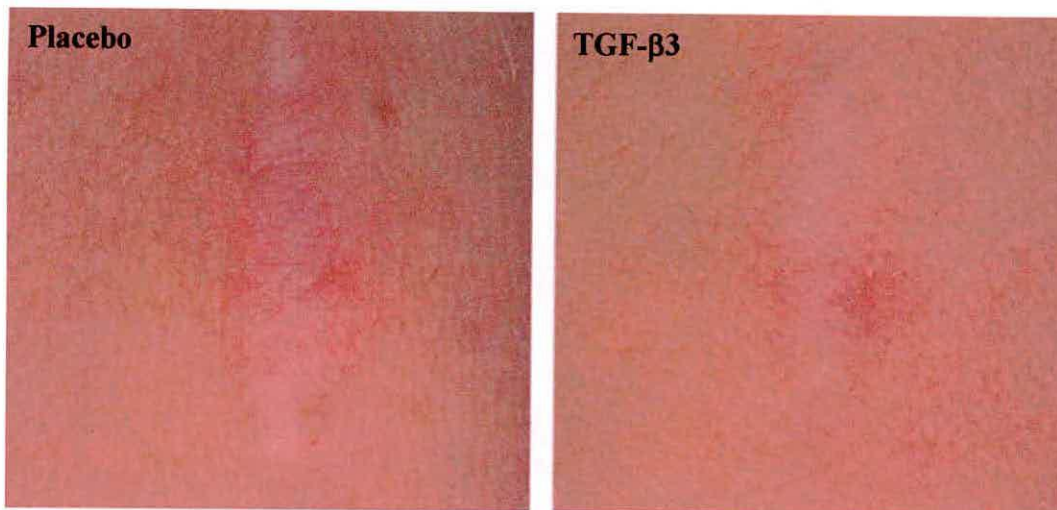


Figura 32. Cicatrices originadas de incisiones 12 meses después de la herida tratadas con TGF- β 3. Se administro TGF- β 3 intra-dermalmente después de generada la incisión (Ferguson et al., 2009)

A pesar de estos resultados prometedores utilizando TGF- β 3 en heridas, Juvista no cumplió con los objetivos primarios y secundarios al final de los ensayos clínicos en fase III (<http://www.renovo.com/en/products/juvista>). Los autores de los estudios están todavía estableciendo las razones por las cuales su producto no cumplió con los objetivos planteados. Esto puede estar relacionado con las características de este factor de crecimiento, primero, este es inestable en su estado activo teniendo una vida media de aproximadamente 1 h (Yao et al., 2010), lo que puede haber

afectado su acción anti-fibrótica muy rápidamente en la herida; segundo, los autores no mencionan el origen de la proteína recombinante, esta es producida por diversos sistemas de producción de proteínas recombinantes (*E. coli*, Baculovirus, células CHO, entre otras). TGF- β 1,2,3 son factores de crecimiento codificados por genes distintos (Ocleston et al., 2008), sin embargo poseen un alto grado de homología, En la mayoría de los ensayos *in vitro* la actividad biológica de las tres isoformas es similar. El receptor para las tres isoformas es el mismo, sin embargo estas tienen actividades biológicas *in vivo* diferentes y muchas veces contrapuestas. Esto puede significar que la actividad biológica de la proteína recombinante aplicada en la herida no tenga la misma actividad biológica que la nativa, a pesar de contar con las modificaciones post-traduccionales producidas por los sistemas CHO y baculovirus, si este fuera el caso. Tercero, los autores no consideraron la importancia del perfil de factores de crecimiento en la herida y sólo se basaron en la aplicación de TGF- β 3, esperando que por sí solo produjera el efecto regenerador esperado. Se ha visto que los factores de crecimiento actúan muchas veces concertadamente y de manera organizada en los procesos de reparación (Broker et al., 1999).

La propuesta y los resultados obtenidos en esta investigación podrían ser una forma de abordar nuevas terapias en el tratamiento para la reparación de heridas. PRPC-MSK presentan una capacidad proliferativa y de diferenciación sobresaliente, además que pueden ser aisladas sin mayor dificultad desde material biológico de desecho, como son los terceros molares extraídos habitualmente. Esto sumado al potencial de estas células de provenir de un tejido que se caracteriza por exhibir una constante renovación celular y de evidente capacidad regenerativa como es el dental (Huang et al., 2009).

Por otro lado, el cultivo celular en 3D utilizando matrices compuestas de materiales de origen natural presenta varias ventajas para uso en aproximaciones de ingeniería de tejidos y terapia celular. Las células al estar confinadas dentro de la matriz se encuentran protegidas contra las respuestas inmunes del hospedero cuando estas sean implantadas, además la matriz provee de una gran superficie para que las células puedan expandirse sin presentar inhibición de crecimiento por contacto célula-célula. Además el cultivo en 3D provoca un cambio fisiológico en las células que no está mediado *a priori* por la composición química de la matriz, si no probablemente por señales mediadas por fenómenos de mecanotransducción que provocan un cambio tanto a nivel metabólico como funcional de las células.

En esta investigación las células fueron sembradas en la matriz a bajas densidades, en comparación con otros trabajos donde se utilizan alginato y fibrina (Baumgartner et al., 2010; Duggal et al., 2009; Fang et al., 2004; Trombi et al., 2008), lo que permite, entre otras cosas que las restricciones difusionales de los nutrientes al interior de las capsulas sean mínimas, lo que optimiza la viabilidad celular al interior de la matriz. Finalmente se comprobó que las condiciones de cultivo evaluadas provocan la activación de las células a un fenotipo secretor de TGF- β 3, lo que permitiría contar con una fuente estable de proteína nativa cuando las células sean implantadas para promover la regeneración de una herida.

La metodología de generar un fenotipo celular con propiedades específicas *in vitro*, para luego ser usado *in vivo* ha sido propuesto por varios autores y se ha demostrado que este se mantiene cuando las células son implantadas en el tejido que requiere ser reparado (Somoza et al., 2010). En el trabajo citado se generó *in vitro* un fenotipo celular secretor del factor de crecimiento BDNF, importante en la reparación de tejido neural, a partir de MSC mediante un cambio en las condiciones de cultivo, luego estas células fueron implantadas directamente en la sustancia nigra de un modelo de rata con Parkinson, se comprobó que las células siguieron produciendo el factor de crecimiento *in vivo*, dato importante teniendo en cuenta que las condiciones *in vitro* son muy distintas a las que las células se ven expuestas *in vivo*.

Por otro lado este sistema permitiría proveer de un perfil de factores de crecimiento, además de TGF- β 3, beneficioso para promover una reparación de mejor calidad de los tejidos, pues se comprobó que las células en las matrices expresan algunos factores de crecimiento importantes en la reparación de heridas. Finalmente los resultados obtenidos hacen evidente que el entendimiento de los efectos de la encapsulación u otros cambios de las condiciones de cultivo en MSC, en los mecanismos metabólicos y secretorios es crítico para el diseño de un implante generado mediante ingeniería de tejidos.

CONCLUSIONES

El aislamiento, desde una población heterogénea, mediante la selección de células CD105 y CD271 positivas permitió obtener sub-poblaciones (PRPC y PDLC CD271⁺/CD105⁺) con características de proliferación y diferenciación superiores a las células que no expresaban estos marcadores. Esto las posiciona como las células a seleccionar en tratamientos medicinales en aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Células gingivales (GC) aisladas basándose en la expresión de CD271⁺/CD105⁺, presentan características de diferenciación y proliferación inferiores en comparación a PDLC y PRPC CD271⁺/CD105⁺.

Las células PRPC aisladas del tejido periapical de la raíz dental, descritas en este trabajo, cumplen con los criterios establecidos internacionalmente para ser consideradas MSC. Este es el único trabajo donde se comprueban completamente estos criterios en PRPC humanas.

Las células PRPC-MSc expresaron el mRNA de TGF- β 3 y FGF2 en todas las condiciones de cultivo analizadas.

Las células cultivadas en monocapa contienen TGF- β 3 intracelularmente y minimamente en forma extracelular. lo que permitiría concluir que la disponibilidad de TGF- β 3 está regulada mediante la activación de la vía de secreción y no de la transcripción de TGF- β 3.

Cuando las PRPC son cultivadas en cápsulas de alginato o fibrina (3D) sobre secretan TGF- β 3 a las 24 horas post-ensamblado en concentraciones de 174 pg/mL pg para 1×10^4 células, significativamente superior al cultivo en monocapa (54 pg/mL para 1×10^4 células), lo que permitiría concluir que, en las condiciones 3D analizadas, las señales mecánicas son más relevantes que la composición química de la matriz en la inducción de la secreción de esta citoquina. Aunque la fibrina contribuye más que el alginato a los cambios observados (secreción de TGF- β 3, expresión genica y crecimiento celular).

El cambio en la condición de cultivo a 3D, produce una modificación en el estado metabólico de las células dada la mayor acumulación de lactato en el medio cuando las células están encapsuladas, en comparación a monocapa, lo que se atribuye a un cambio de utilización de sustratos para generar energía (glutamina sobre glucosa)

La acumulación de glucosa y la concentración de TGF- β 3 en el medio (señal autocrina), activan en parte la secreción de TGF- β 3, mientras que la expresión de PDGF esta determinada por la concentración de TGF- β 3 en el medio.

El cultivo de células PRPC-MSK en matrices 3D generan la expresión de un perfil de factores de crecimiento (TGF- β 3, EGF, FGF2, PDGF) favorable para el proceso de reparación/regeneración de una herida cutánea.

La hipótesis planteada se verifica, ya que PRPC en matrices tridimensionales secretan mayor cantidad de TGF- β 3. Esto permite proyectar el uso de estas células en ingeniería de tejidos ya sea para producción biotecnológica del factor o como células reparadoras, cuyo mecanismo de acción esté avalado por la capacidad de producción del factor TGF- β 3, según la necesidad sensada en el microambiente de la lesión.

ABREVIACIONES

BDNF: Factor de crecimiento derivado de cerebro
BMP: Proteína morfogénica del hueso
CMA: Células madre adultas
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF: factor de crecimiento epidermal
ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FDA: Federal drug administration
FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos
GAG: Glicosaminoglicanos
GC: Células gingivales
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
hMSC: Células madre mesenquimáticas humana
LAP: Proteína de asociación latente
LLC: Complejo grande de latencia
MEC: Matriz extracelular
MSC: Célula madre mesenquimáticas
LTBP: proteína de unión a TGF- β latente
PBS: Tampón fosfato salino
PC: Células de la pulpa dental
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDLC: Células del tejido periodontal
PRPC: Células de la papila periapical de la raíz dental
PRPC-MSC: MSC derivadas de la papila periapical de la raíz
RGD: Sitio de reconocimiento Arg-Gly-Asp
SII: Sistema de implante integrado
TGF- β 3: Factor transformante beta 3
VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial
3D: tridimensional

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, CA., Brown, DI., Young ME., Reyes, JG. (2009). Senescent cultures of human dermal fibroblasts modified phenotype when immobilized in fibrin polymer. *J Biomater Sci Polym Ed*, 20(13):1929-42.
- Acevedo, CA., Somoza, R., Weinstein-Opppenheimer, C., Brown, DI., Young, ME. (2010). Growth Factor Production from Fibrin-Encapsulated Human Keratinocytes. *Biotechnology letters*, 32(7):1011-7.
- Agam, L., Gefen, A. (2007). Pressure ulcers and deep tissue injury: a bioengineering perspective. *J Wound Care*, 16(8):336-42.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Rafi, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). Intracellular vesicular traffic in: *Molecular biology of the cell*, quinta edición, 799-809 pp. Garland science, Taylor & Francis Group: NewYork NY f 0016, USA.
- Andrae, J., Gallini, R. y Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development*, 22(10):1276-312.
- Aslan, H., Zilberman, Y., Kandel, L., Liebergall, M., Oskouian, R. J., Gazit, D., y Gazit, Z. (2006). Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(7):1728-37.
- Assoian, R. K., Fleurdelys, B. E., Stevenson, H. C., Miller, P. J., Madtes, D. K., Raines, E. W., Ross, R., (1987). Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(17):6020-4.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 16(5):585-601.
- Barrilleaux, B., Phinney, D., Prockop, D. J., y Connor, K. (2006). Ex Vivo Engineering of Living Tissues with Adult Stem Cells. *Tissue Engineering*, 12(11).
- Battula, V. L., Treml, S., Bareiss, P. M., Gieseke, F., Roelofs, H., de Zwart, P., Müller, I. (2009). Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*, 94(2):173-84.
- Baumgartner, L., Arnhold, S., Brixius, K., Addicks, K., y Bloch, W. (2010). Human mesenchymal stem cells: Influence of oxygen pressure on proliferation and chondrogenic differentiation in fibrin glue in vitro. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 93(3):930-40.

Beanes, S. R., Dang, C., Soo, C., y Ting, K. (2003). Skin repair and scar formation: the central role of TGF-[beta]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(08):1-11.

Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H (2003). A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 24, pp.2497–2502

Bienaimé, C., Barbotin, J.N. & Nava-Saucedo, J.E., (2003). How to build an adapted and bioactive cell microenvironment? A chemical interaction study of the structure of Ca-alginate matrices and their repercussion on confined cells. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 67(2):376-88.

Bilodeau, K., (2006). Bioreactors for Tissue Engineering: Focus on Mechanical Constraints. A Comparative Review. *Tissue Engineering*, 74, p.99.

Boyce, S.T., (2001). Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. *Surgery*, 27, pp.523- 533.

Broker, B. J., Chakrabarti, R., Blynman, T., Roesler, J., Wang, M., y Srivatsan, E. (1999). Comparison of Growth Factor Expression in Fetal and Adult Fibroblasts. *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 125(June):676-680.

Bühring, H.-J., Battula, V. L., Treml, S., Schewe, B., Kanz, L., y Vogel, W. (2007). Novel Markers for the Prospective Isolation of Human MSC. *Ann. NY Acad Sci*, 1106,pp.262-271.

Caplan A. (2007). Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine Cell. *Physiol*, 213,pp.:341-347.

Caplan AI (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*, 217,pp.318-324.

Caplan, A.I. y Correa, D., (2011). The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell*, 9(1):11-5.

Caplan, A.I. y Dennis, J.E., (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry*, 98(5):1076-84.

Carter, K., 2003. Growth factors: the wound healing therapy of the future. *British journal of community nursing*, 8(9):S15-6, S18-9, S22-3.

Cates, T. y Nanci, A. (2008). Repair and regeneration of oral tissues. En *Oral Histology*, septima edición. St. Louis : Mosby Elsevier.

Chen, X., (2010). Extracellular Matrix Provides an Optimal Niche for the maintenance and propagation of MSC.pdf. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 90(1):45-54.

Chen CP, Yang YC, Su TH, Chen CY, Aplin JD (2005) Hypoxia and transforming growth factor-beta 1 act independently to increase extracellular matrix production by placental fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(2):1083-90

- Chung, H.-M., Won, C.H. y Sung, J.H., (2009). Responses of adipose-derived stem cells during hypoxia: enhanced skin-regenerative potential. *Expert opinion on biological therapy*, 9(12):1499-508.
- Clark, R., (2001). Fibrin and wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936, pp.355-67.
- Constantinidis, I., Rask, I., Long, R. C., y Sambanis, A. (1999). Effects of alginate composition on the metabolic, secretory, and growth characteristics of entrapped beta TC3 mouse insulinoma cells. *Biomaterials*, 20(21):2019-27.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, 3(3):301-13.
- Currie LJ, Martin R, Sharpe JR, James SE. (2003) A comparison of keratinocyte cell sprays with and without fibrin glue. *Burns*, 29, pp.677-685.
- Dainiak MB, Allan IU, Savina IN, Cornelio L, James ES, James SL, Mikhailovsky SV, Jungvid H, Galaev IY. (2010). Gelatin-fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study. *Biomaterials*, 31(1),pp. 67-76.
- Davidson, J.M., (2008). First-class delivery: getting growth factors to their destination. *The Journal of investigative dermatology*, 128(6):1360-2.
- Deorosan, B. & Nauman, E. (2011). The role of glucose, serum, and three-dimensional cell culture on the metabolism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells international*, 2011, p.429187.
- Ding, G., Liu, Y., An, Y., Zhang, C., Shi, S., Wang, W., y Wang, S. (2010). Suppression of T cell proliferation by root apical papilla stem cells in vitro. *Cells, tissues, organs*, 191(5):357-64.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315-7.
- Doorn, J., Moll, G. y Le Blanc, K., (2012). Therapeutic Applications of mesenchymal stromal cells; paracrine effects and potentials improvements. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 18(2):101-115.
- Duggal, S., Frønsdal, K. B., Szöke, K., Shahdadfar, A., Melvik, J. E., y Brinchmann, J. E. (2009). Phenotype and gene expression of human mesenchymal stem cells in alginate scaffolds. *Tissue engineering Part A*, 15(7):1763-1773.
- Duitman, E.H., Orinska, Z. y Bulfone-Paus, S., (2011). Mechanisms of cytokine secretion: a portfolio of distinct pathways allows flexibility in cytokine activity. *European journal of cell biology*, 90(6-7):476-83.

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677-89.

Javier Enrione, Fernando Osorio, Daniel López, Caroline Weinstein-Oppenheimer, Miguel A. Fuentes, Ricardo Cereani, Donald I. Brown, Fernando Alborno, Elizabeth Sánchez, Patricio Villalobos, Rodrigo A. Somoza, Manuel E. Young, Cristian A. Acevedo (2010). Characterization of a Gelatin / Chitosan / Hyaluronan scaffold- polymer. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13.

Eyrich D, Gopferich A, Blunk T (2006) Fibrin in tissue engineering. *Adv Exp Med Biol*, 585, pp.379-92.

Eshghi, S. y Schaffer, D.V., (2008). Engineering microenvironments to control stem cell fate and function. In *StemBook*. pp. 1-12.

Eslami, A., Gallant-Behm, C. L., Hart, D. a, Wiebe, C., Honardoust, D., Gardner, H., Häkkinen, L., (2009). Expression of integrin alphavbeta6 and TGF-beta in scarless vs scar-forming wound healing. *The journal of histochemistry and cytochemistry*: official journal of the Histochemistry Society, 57(6):543-57.

Falabella A, Falanga V. (2001) Wound healing. In: Freinkel RK, Woodley DT (ed) *The biology of the skin*, Parthenon Publishing, pp 281-297

Fang, H., Peng, S., Chen, A., Li, F., Ren, K., y Hu, N. (2004). Biocompatibility studies on fibrin glue cultured with bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 24(3):272-4.

Ferguson, M. W., Duncan, J., Bond, J., Bush, J., Durani, P., So, K., Taylor, L., (2009). Prophylactic administration of avotermin for improvement of skin scarring: three double-blind, placebo-controlled, phase I/II studies. *The Lancet*, 373(9671):1264-1274.

Ferguson, M.W.J. y O’Kane, S., (2004). Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359(1445):839-50.

Flanders KC y Burmester JK (2003). Medical Applications of Transforming Growth Factor- β . *Clinical Medicine & Research*, 1(1):13-20.

Forbes, S. J., Vig, P., Poulson, R., Wright, N. y Alison, M. R. (2002). Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clinical science (London, England*: 1979), 103(4):355-69.

Ghidoni, I., Chlapanidas, T., Bucco, M., Crovato, F., Marazzi, M., Vigo, D., Torre, M. L., (2008). Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. *Cytotechnology*, 58(1):49-56.

- Glacken, M.W., (1988). Catabolic Control of Mammalian Cell Culture. *Bio/Technology*, 6(9):1041-1050.
- Godara P, McFarland CD y Nordon RE (2008). Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. *J Chem Technol Biotechnol*, 83, pp.408-420.
- González JH, Rodríguez R, Machado M, González J, Cabrera J (2004). Heridas. Métodos de tratamiento. *MEDISAN*, 8(1).
- Goren, A., Dahan, N., Goren, E., Baruch, L., y Machluf, M. (2010). Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoimmunogenic platform for long-term cellular therapy. *The FASEB journal*, 24(1):22-31.
- Grayson, W. L., Zhao, F., Izadpanah, R., Bunnell, B., y Ma, T, (2006). Effects of Hypoxia on Human Mesenchymal Stem Cell Expansion and Plasticity in 3D Constructs. *Journal of Cellular Physiology*, 339, pp.331-339.
- Grayson, W.L., (2009). Hypoxia and Stem Cell-Based Engineering of Mesenchymal Tissues. *Biotechnol Prog*, 25(1):32-42.
- Grazul-Bilska, T., Johnson, M. L., Bilski, J. J., Redmer, D., Reynolds, L. P., Abdullah, K. M. (2003). Wound healing: The role of growth factors. *Drugs of Today*, 39(10), p.787.
- Hao, J., Varshney, R.R. y Wang, D.A., (2008). TGF-beta3: A promising growth factor in engineered organogenesis. *Expert opinion on biological therapy*, 8(10):1485-93.
- Hao, J., Yao, Y., Varshney, R. R., Wang, L., Prakash, C., Li, H., y Wang, D. (2008). Gene Transfer and Living Release of Transforming Growth Factor-b3 for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering: Part C*, 14(4):273-280
- Haynesworth, S.E., Baber, M.A. y Caplan, A.I., (1996). Cytokine Expression by Human Marrow-Derived Mesenchymal -Progenitor Cells In Vitro: Effects of Dexamethasone and 11-1 a. *Cell*, 592, pp.585-592.
- Herdrich, B.J., Lind, R.C. y Liechty, K.W., (2008). Multipotent adult progenitor cells: their role in wound healing and the treatment of dermal wounds. *Cytotherapy*, 10(6):543-50.
- Higuera, G. A., Schop, D., Spitters, T. W. G. M., van Dijkhuizen-Radersma, R., Bracke, M., de Bruijn, J. D., Martens, D., (2012). Patterns of Amino Acid Metabolism by Proliferating Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, 18(5-6):654-664.
- Horwitz, E.M. y Prather, W.R., (2009). Cytokines as the major mechanism of mesenchymal stem cell clinical activity: expanding the spectrum of cell therapy. *The Israel Medical Association journal*, 11(4):209-11.

Huang, G.T.J., Gronthos, S. y Shi, S., (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*, 88(9):792-806.

Hunt, N.C. y Grover, L.M., (2010). Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. *Biotechnology letters*, 32(6):733-42.

Ingber, D., (2002). Mechanical signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961, pp.162-3.

Janmey, P. a, Winer, J.P. y Weisel, J.W., (2009). Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 6(30):1-10.

Jarocho, D., Lukasiewicz, E. y Majka, M., (2008b). Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 46(3):307-14.

Javelaud D, Mauviel A (2004). Mammalian transforming growth factor-Bs: Smad signaling and physio-pathological roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, pp.1161-5.

Jo, Y.Y., Lee, H.J., Kook, S.Y., Choung, H.W., Park, J.Y., Chung, J.H., Choung, Y.H., (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue engineering*, 13(4):767-73.

Jorgensen, C., Gordeladze, J. y Noel, D., (2004). Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Current opinion in biotechnology*, 15(5):406-10.

Kagiywada, H., Yashiki, T., Ohshima, A., Tadokoro, M., y Nagaya, N. (2008). Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. *Tissue Engineering*, (May):184-189.

Kim, S., Yu, S., Son, J., Holger, H., y Buchholz, R. (1998). Calculations on O₂ transfer in capsules with animal cells for the determination of maximum capsule size without O₂. *Biotechnology letters*, 20(6):549-552.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE (2004). Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 109, pp.1543-1549.

Knoblich JA (2008). Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell*, 132, pp.583–597.

Kohama, K., Nonaka, K., Hosokawa, R., Shum, L., y Ohishi, M. (2002). TGF-beta-3 Promotes Scarless Repair of Cleft Lip in Mouse Fetuses. *Journal of Dental Research*, 81(10):688-694.

Kolf CM, Cho E y Tuan R (2007). Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy* , 9, pp.204-214

Korossis SA, Bolland B, Kearney JN, Fisher J Ingham E (2005). Bioreactors in Tissue Engineering. Topics in Tissue Engineering, Volume 2. Eds. N. Ashammakhi & R.L. Reis.

Kourembanas S, Hannan R, Faller D (1990) Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor beta chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 86, pp.670-674.

Laberge, T. y Cheung, H.S., (2010). Multipotent Dental Stem Cells: An Alternative Adult Derived Stem Cell Source for Regenerative Medicine. In *Embryonic Stem Cells-Differentiation and Pluripotent Alternatives*. pp. 451-472.

Lee, K., Silva, E. & Mooney, D.J., (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 8(55):153-70.

Liu P, Deng Z, Han S, Liu T, Wen N, Lu W, Geng X, Huang S, y Jin A (2008). Tissue-Engineered Skin Containing Mesenchymal Stem Cells Improves Burn Wounds. *Artificial Organs*, 32(12):925–931.

Liu, C.H. y Hwang, S.M., (2005). Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine*, 32(6):270-9.

Liu H, Mao J, Yao K, Yang G, Cui L, Cao Y, (2004). A study on a chitosan-gelatin- hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. *J Biomater Sci Polymer*, 15:25-40.

Liu, Y., Dulchavsky, D., Gao, X., Kwon, D., Chopp, M., Dulchavsky, S., y Gautam, S. (2006). Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. *The Journal of surgical research*, 136(2):336-41.

Luo XH, Liao EY, Su X (2002). Progesterone upregulates TGF-B isoforms (B1, B2 and B3) expression in normal human osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*, 71, pp.329-334.

Lyons, R.M., (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *The Journal of Cell Biology*, 106(5):1659-1665.

Ma PX. (2006) *Alginate for Tissue Engineering in Scaffolding in Tissue Engineering* Edited by Peter X. Ma Jennifer Elisseeff. Published by CRC Press Taylor & Francis Group.

Mao, J., (2003). The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials*, 24(9):1621-1629.

Mao J, Zhao Li, Yin Yu, Yao K (2010). Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 24(6): 1067-1074.

- Mazlyzam, L., Aminuddin, B. S., Fuzina, N. H., Norhayati, M. M., Fauziah, O., Isa, M. R., Saim, L., (2007). Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 33(3):355-63.
- Meirelles, L. D. S., Fontes, A. M., Covas, D. T., y Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*, 20(5-6):419-27.
- Metcalf, A.D. y Ferguson, M.W.J., (2009). Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface*. 2007 Jun 22;4(14):413-37.
- Mias, C., Trouche, E., Seguelas, M.-H., Calcagno, F., Dignat-George, F., Sabatier, F., Piercecchi-Marti, M., (2008). Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(7):1749-57.
- Mimeault, M. y Batra, S.K., (2008). Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem cell reviews*, 4(1):27-49.
- Minguell, J.J., Erices, A. y Conget, P., (2001). Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, (8):507-520.
- Mittl P, Priestle JP, Cox DA, McMaster G, Cerletti N, y Grutter MG (1996). The crystal structure of TGF- β 3 and comparison to TGF- β 2: Implications for receptor binding *Protein Science*, 5, pp.1261-1271.
- Mitrano, T. I., Grob, M. S., Carrión, F., Nova-Lamperti, E., Luz, P. A., Fierro, F. S., Quintero, A. (2010). Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *Journal of periodontology*, 81(6):917-25.
- Murielle Mimeault y Surinder K. Batra (2008). Recent Progress on Tissue-Resident Adult Stem Cell Biology and Their Therapeutic Implications *Stem Cell Rev*, 4, pp.27-49.
- Neuss, S., Schneider, R. K. M., Tietze, L., Knüchel, R., y Jahnen-Dechent, W. (2010). Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. *Cells, tissues, organs*, 191(1):36-46.
- Occleston, N., Fairlamb, D., Hutchison, J., O'Kane, S., y WJ Ferguson, M. (2009). Avotermin for the improvement of scar appearance: a new pharmaceutical in a new therapeutic area. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Aug;18(8):1231-9.
- Occleston, N. L., Laverty, H. G., O'Kane, S., y Ferguson, M. (2008). Prevention and reduction of scarring in the skin by Transforming Growth Factor beta 3 (TGFbeta3), from laboratory discovery to clinical pharmaceutical. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 19(8):1047-63.

Oh JY, Kim MK, Shin MS, Weea WR, Lee HJ (2009). Cytokine secretion by human mesenchymal stem cells cocultured with damaged corneal epithelial cells. *Cytokine*, 46, pp. 100–103.

Ohtaki, H., Ylostalo, J. H., Foraker, J. E., Robinson, A. P., Reger, R. L., Shioda, S., y Prockop, D. J. (2008). Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38):14638-43.

O’Cearbhaill, E., Murphy, M., Barry, F., McHugh, P., y Barron, V. (2003). Behavior of hMSC in fibrin based vascular TE constructs.pdf. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(3):649-657.

Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Calafiore R, Chang TMS, De Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacík I, Shapiro J, Pedraz JL (2003) Cell encapsulation: Promise and progress. *Nat Med* 9, pp.104-107.

Park H, Shin JS y Kim CW (2007). Proteome of mesenchymal stem cells. *Proteomics*, 7, pp. 2881–2894.

Pinkerton, M. N., Wescott, D. C., Gaffey, B. J., Beggs, K. T., Milne, T. J., y Meikle, M. C. (2008). Cultured human periodontal ligament cells constitutively express multiple osteotropic cytokines and growth factors, several of which are responsive to mechanical deformation. *Journal of periodontal research*, 43(3):343-51.

Purcell, E.K., Singh, A. y Kipke, D.R.,(2009). Alginate composition effects on a neural stem cell-seeded scaffold. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 15(4):541-50.

Quirici N. (2002). Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Experimental Hematology*, 30, pp.783-791.

Rastrepo E. (2009). Monografía Cytogel, Matriz Multi-molecular regenerativa. Instituto de ingeniería y regeneración tisular.

Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., Pell, C. L., (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109(10):1292-8.

Robson, M.C., Mustoe, T. Hunt, T.K., (1998). The future of recombinant growth factors in wound healing. *American journal of surgery*, 176(2A Suppl), p.80S-82S.

Roura, S., Farré, J., Soler-Botija, C., Llach, A., Hove-Madsen, L., Cairó, J. J., Gòdia, F., (2006). Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells. *European journal of heart failure: journal of the Working Group on Heart Failure of the European Society of Cardiology*, 8(6):555-63.

Ruoslahti, E., (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*, 12, pp.697-715.

- Sainio, A., Koulu, M., Wight, T. N., Penttinen, R. H. (2009). Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 61(2):198-223.
- Schinköthe, T., Bloch, W. y Schmidt, A., (2008). In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, 17(1):199-206.
- Schneider, M., (1996). The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology*, 46(3):161-185.
- Schop, D., Janssen, F. W., Borgart, E., de Bruijn, J. D., y van Dijkhuizen-Radersma, R. (2008). Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(2-3):126-135.
- Schop, Deborah, (2010). Growth and metabolism of mesenchymal stem cells cultivated on microcarriers.
- Schop, Deborah, Janssen, F. W., van Rijn, L. D. S., Fernandes, H., Bloem, R. M., de Bruijn, J. D., y van Dijkhuizen-Radersma, R. (2009). Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, 15(8):1877-1886.
- Schrementi, M. E., Ferreira, A. M., Zender, C., y DiPietro, L. (2008). Site-specific production of TGF-beta in oral mucosal and cutaneous wounds. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 16(1):80-6.
- Schäffer, L., Scheid, A. Spielmann, P., Breyman, C., Zimmermann, R., Meuli, M., Gassmann, M., (2003). Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta*, 24(10):941-50.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C. y Nardi, N.B.,(2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, 119(11):2204-13.
- Shah M, Foreman DM y Ferguson MWJ (1995). Neutralisation of TGF-β1 and TGF-β2 or exogenous addition of TGF-β3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of Cell Science*, 108, pp.985-1002.
- Schmidt JJ, Rowley J, Kong HJ (2008) Hydrogels used for cell-based drug delivery. *J Biomed. Mater Res A*, 87(4):1113-22
- Schwade ND, Fowler JJ, Leach M (2002). The Effects of TGF-β3 Modulation on Scar Tissue Formation in the Pig. *Wounds*. 2000, pp.12(2).
- Simpson, N. E., Grant, S. C., Gustavsson, L., Peltonen, V.M., Blackband, S. J., Constantinidis, I. (2006). Biochemical consequences of alginate encapsulation: a NMR study of insulin-secreting cells. *Biomaterials*, 27(12):2577-86.

Smiler, D. G., Soltan, M., Soltan, C., y Matthews, C. (2010). Growth factors and gene expression of stem cells: bone marrow compared with peripheral blood. *Implant dentistry*, 19(3):229-40.

Sniadecki, N.J. (2010). A tiny touch: activation of cell signaling pathways with magnetic nanoparticles. *Endocrinology*, 151(2):451-7.

Somoza R, Conget P, Rubio FJ (2008). Neuropotency of Human Mesenchymal Stem Cell Cultures: Clonal Studies Reveal the Contribution of Cell Plasticity and Cell Contamination. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 14, pp.546-555 .

Somoza, R., Juri, C., Baes, M., Wyneken, U., y Rubio, F. J. (2010). Intranigral transplantation of epigenetically-induced BDNF-secreting human mesenchymal stem cells: implications for cell-based therapies in Parkinson s disease. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, (June):1-12.

Somoza, R.A y Rubio, F.J., (2012). Cell Therapy Using Induced Pluripotent Stem Cells or Somatic Stem Cells: This is the Question. *Current stem cell research & therapy*, 7(3):191-6.

Song I, Caplan AI, Dennis JE (2009). Dexamethasone Inhibition of Confluence-Induced Apoptosis in Human Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res*, 27, pp.216–221

Sonoyama, W. y Liu, Yi, (2008). Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study. *J Endod.*, 34(2):166-171.

Spath, L., Rotilio, V., Alessandrini, M., Gambarà, G., De Angelis, L., Mancini, M., Mitsiadis, T. (2009). Explant derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation. *J Cell Mol Med*, 14(6B):1635-44.

Sporn, L., Bunce, L. Francis, C.W., (1995). Cell proliferation on fibrin: modulation by fibrinopeptide cleavage. *Blood*, 86(5):1802-10.

Stow, J. L., Low, P. C., Offenhäuser, C., y Sangermani, D. (2009). Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology*, 214(7):601-12.

Sun, Z.J., Lv, G.-J., Li, S.Y., Yu, W.T., Wang, W., Xie, Y.B., y Ma, X. (2007). Differential role of microenvironment in microencapsulation for improved cell tolerance to stress. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(6):1419-27.

Tan, H., Gong, Y., Lao, L., Mao, Z., Gao, C. (2007). Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 18(10):1961-8.

Trombi, L., D'Alessandro, D., Pacini, S., Fiorentino, B., Scarpellini, M., Fazzi, R., Galimberti, S., (2008). Good manufacturing practice-grade fibrin gel is useful as a scaffold for human mesenchymal stromal cells and supports in vitro osteogenic differentiation. *Transfusion*, 48(10):2246-51.

- Trouche, E., Girod Fullana, S., Mias, C., Ceccaldi, C., Tortosa, F., Seguelas, M. H., Calise, D., (2010). Evaluation of alginate microspheres for mesenchymal stem cell engraftment on solid organ. *Cell transplantation*, 19(12):1623-33.
- Tuan, R.S., Boland, G. y Tuli, R., (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*, 5, pp.32-45.
- Villalobos, P., Acevedo, C. a, Alborno, F., Sánchez, E., Valdés, E., Galindo, R., y Young, M. E. (2010). A BOD monitoring disposable reactor with alginate-entrapped bacteria. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33(8):961-70.
- Vogel V y Baneyx G (2003). The tissue engineering puzzle: A molecular perspective. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5, pp.441-63.
- Wagers, A.J. y Weissman, I.L., (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5):639-48.
- Wang, L. y Stegemann, J.P., (2011). Extraction of High Quality RNA from Polysaccharide Matrices using Cetlytrimethylammonium Bromide. *Methods*, 31(7):1-14.
- Watabe, T. y Miyazono, K., (2009). Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell research*, 19(1):103-15.
- Weinstein-Oppenheimer, C. R., Aceituno, A. R., Brown, D. I., Acevedo, C., Ceriani, R., Fuentes, M., Alborno, F., (2010). The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on wound healing. *Journal of translational medicine*, 8, p.59.
- Wieser, R.J. et al., (1990). Growth control in mammalian cells by cell-cell contacts. *Environmental health perspectives*, 88, pp.251-3.
- Wong, M., (2004). Alginates in tissue engineering. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 238, pp.77-86.
- Wong SH, Hamel L, Chevalier S y Philip A (2000). Endoglin expression on human microvascular endothelial cells Association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF- β signalling receptors *Eur J Biochem*, 267, pp.5550-5560.
- Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE (2007). Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stem Cells*, 25, pp.2648-2659.
- Yalvac, M. E., Ramazanoglu, M., Rizvanov, a a, Sahin, F., Bayrak, O. F., Salli, U., Palotás, A., (2010). Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *The pharmacogenomics journal*, 10(2):105-13.
- Yao, Y., Zhang, F., Zhou, R., Li, M., y Wang, D. (2010). Continuous supply of TGF β 3 via adenoviral vector promotes type I collagen and viability of fibroblasts in alginate hydrogel. *J Tissue Eng Regen Med*, 4(7):497-504.

Zhao F, Pathi P, Grayson W, Xing Q, Locke BR y Ma T (2005). Effects of Oxygen Transport on 3-D Human Mesenchymal Stem Cell Metabolic Activity in Perfusion and Static Cultures: Experiments and Mathematical Model. *Biotechnol Prog*, 21, pp.1269-1280.

Zhou H. y Xu H.H.K., (2011). The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 32(30):7503-13.

Xia W. (2004). Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan- gelatin complex scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials*, 71B(2): 373-380.

Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S (2009). Multiple Differentiation Capacity of STRO-1+/CD146+ PDL Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells and Development*, 18(3):487-496.

Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T. (2006). Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research*, 133(2): 185-192.

Young M, Acevedo C, Albornoz F, Weinstein Oppenheimer, Aceituno A, Brown D, Tapia S. (2006). Integrated implant system (IIS) biocompatible, biodegradable and bioactive, comprising a biocompatible sterile porous polymeric matrix and a gel, integrating in situ the tridimensional matrix structure. Application Patent Number PCT/EP2007/005060.

Apéndice I

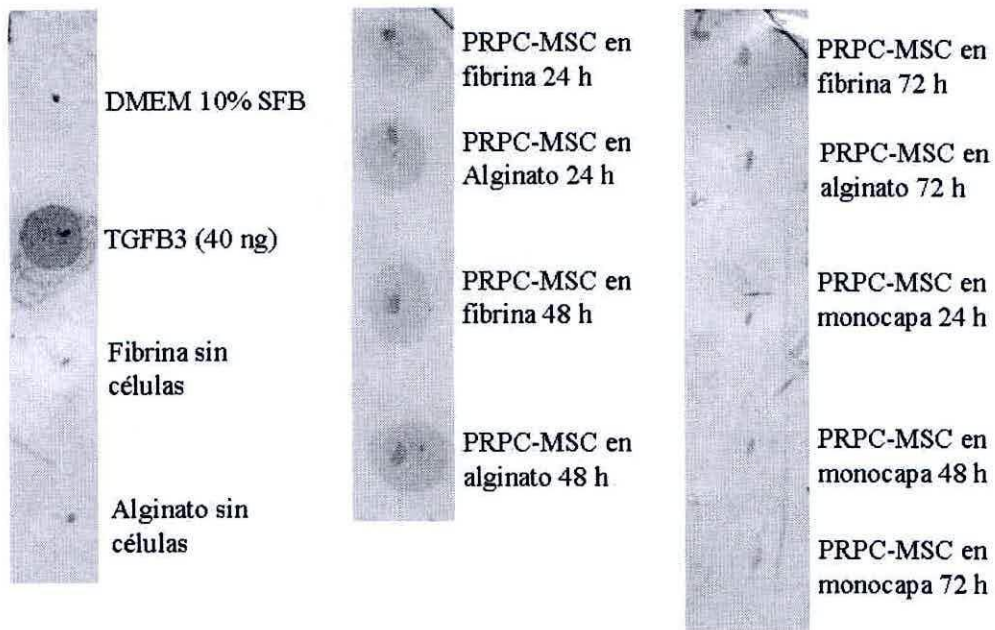


Figura suplementaria 1. Resultados preliminares obtenidos mediante el inmuno-ensayo- Dot-blot, que permitió observar que las células encapsuladas en fibrina y alginato secretaron TGF- β 3 al medio. En contraste esto no se evidenció para el cultivo en monocapa.

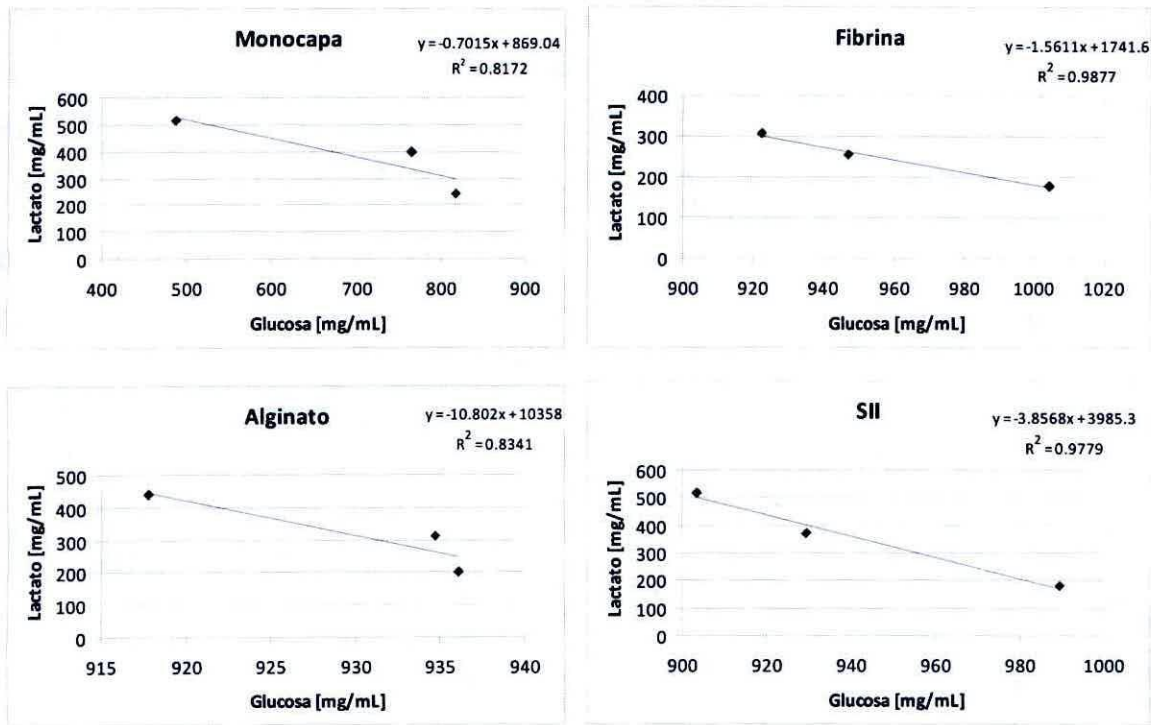


Figura suplementaria 2. Cálculo del rendimiento de glucosa en lactato ($Y_{\text{lactato/glucosa}}$)

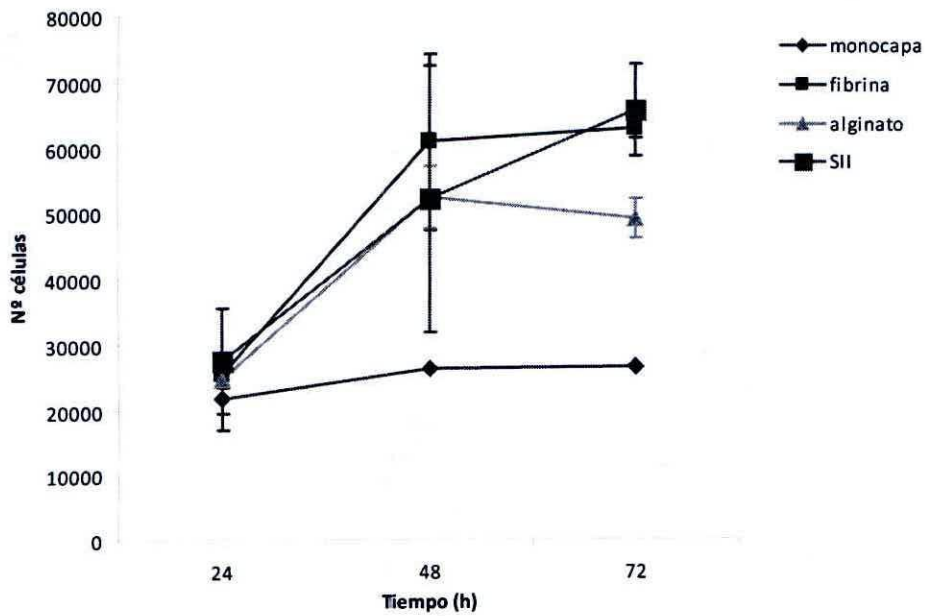


Figura suplementaria 3. Proliferación de PRPC-MS en las condiciones de cultivo analizadas.
 Los datos se encuentran graficados sin ser relativizados al tiempo inicial.

Apéndice II

Cálculo del módulo de Thiele

Para determinar si existen restricciones difusionales de nutrientes (glucosa y oxígeno) al interior de las matrices, se usó el criterio del módulo de Thiele modificado para cultivo celular (Kim et al., 1998). Se define que no hay restricciones difusionales cuando el modulo de Thiele es menor a 0,3. El cálculo se realiza mediante las siguientes expresiones.

$$q = \frac{V\Delta C}{X'\Delta t}$$

$$\phi = \frac{qXr^2}{9DC}$$

q = Captación de glucosa/tasa de respiración [mol/célula/seg⁻¹]

X = Concentración celular [células/cm³]

X' = Promedio entre el numero de células inicial y final

r = Radio de la cápsula [cm]

D = Difusibilidad de la glucosa/oxígeno en la matriz [cm²/seg]

C = Concentración glucosa/oxígeno [mol/cm³]

ΔC = Diferencia entre la concentración final e inicial

Δt = Diferencia entre el tiempo final e inicial

V = Volumen medio de cultivo

Tabla suplementaria 1. Cálculo del modulo de Thiele determinados a partir de valores reportados máximos de q (q_{mr}) de oxígeno y glucosa de cultivos primarios y valores reportados de D para oxígeno y glucosa reportados para las matrices de alginato y fibrina. La densidad celular, radio de la cápsula y concentración de glucosa corresponden a las utilizadas en este trabajo.

	Oxigeno		Glucosa	
	Alginato	Fibrina	Alginato	Fibrina
q _{mr} (mol/cell/s ⁻¹)	2,0E-16	2,0E-16	3,0E-16	3,0E-16
X (cell/cm ³)	4,0E+05	4,0E+05	4,0E+05	4,0E+05
r (cm)	1,5E-01	2,3E-01	1,5E-01	2,3E-01
D (cm ² /s)	2,1E-05	2,1E-05	6,4E-06	6,4E-06
C (mol/cm ³)	2,2E-07	2,2E-07	5,5E-06	5,5E-06
Thiele	0,043	0,102	0,009	0,020

Tabla suplementaria 2. Valores de Thiele calculados a partir de valores de q obtenidos en cada tiempo y a la correspondiente concentración celular.

		glucosa mg/L	glucosa mol/cm ³	células	células/cm ³	q (mol/cell/s ⁻¹)	Thiele
Fibrina	24	1000,0	5,6E-06	25421	508417	1,13255E-19	9,5E-06
	48	947,2	5,3E-06	60766	1215326	3,99717E-18	8,0E-04
	72	922,3	5,1E-06	63014	1260274	4,07531E-18	8,5E-04
Alginato	24	936,1	5,2E-06	24773	1753215	2,763E-18	8,0E-04
	48	934,7	5,2E-06	52341	3704267	1,55756E-18	9,5E-04
	72	917,8	5,1E-06	49106	3475276	1,48706E-18	8,5E-04
SII	24	989,5	5,5E-06	27378	136890	4,01436E-19	1,5E-03
	48	929,5	5,2E-06	52015	260074	2,31127E-17	1,7E-01
	72	903,6	5,0E-06	65664	328321	2,12514E-17	2,0E-01

LISTA DE PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES

Acevedo, C., Somoza, R., Weinstein-Oppenheimer, C., Brown, D., Young, M. (2010) Growth Factor Production from Fibrin-Encapsulated Human Keratinocytes. *Biotechnology Letters*, 32:1011–1017.

Javier Enrione, Fernando Osorio, Daniel López, Caroline Weinstein-Oppenheimer, Miguel A. Fuentes, Ricardo Cereani, Donald I. Brown, Fernando Albornoz, Elizabeth Sánchez, Patricio Villalobos, Rodrigo A. Somoza, Manuel E. Young, Cristian A. Acevedo (2010). Characterization of a gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold-polymer. *Electronic Journal of Biotechnology*, DOI: 10.2225/vol13-issue5-fulltext-15.

Rodrigo A Somoza and Francisco Javier Rubio (2012). Cell therapy using induced pluripotent stem cells or somatic stem cells: this is the question. *Current Stem Cell Research and Therapy*. 2012 Feb 13. [Epub ahead of print]

Rodrigo Somoza, Carlos Juri, Mauricio Baes, Ursula Wyneken, Francisco Javier Rubio (2010). Intranigral transplantation of epigenetically-induced BDNF-secreting human mesenchymal stem cells: implications for cell-based therapies in Parkinson's disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16: 1530-1540.

Cristian A. Acevedo; Rodrigo A. Somoza; Caroline Weinstein-Oppenheimer; Hernán Zárate; Macarena Moreno; Elizabeth Sánchez; Manuel E. Young, William MacNaughtan & Javier Enrione Improvement of human skin cells growth by radiation induced modifications of a Ge/Ch/Ha-scaffold. Submitted to *Bioprocess and Biosystems Engineering* (Aceptado, Julio 2012).

En preparación

Rodrigo A. Somoza, Cristian A. Acevedo, Maximo Hernandez, Caroline Weinstein, Manuel Young. TGF- β 3 secretion by Periapical root papilla mesenchymal stem cells. *Journal of Biotechnology*

Rodrigo A. Somoza, Fernando Albornoz, Manuel E. Young "Gelatin/Chitosan/Hyaluronan polymer modifications for the improvement of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from dental tissues"

Presentaciones en congresos

Rodrigo Somoza, Máximo Hernandez, Miguel A. Fuentes, Ricardo Ceriani, Caroline R. Weinstein-Oppenheimer, Manuel E. Young (2011). "Isolation of periapical root and periodontal tissue stem cells from exfoliated teeth, characterization of the CD105+ subpopulation". 20th International conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Santiago, Chile.

Rodrigo Somoza, Miguel A. Fuentes, Ricardo Ceriani, Fernando Albornoz, Patricia Luz, Flavio Carrión, Máximo Hernandez, Caroline R. Weinstein-Oppenheimer and Manuel E. Young (2011). "Mesenchymal stem cells isolated from dental tissues are multipotent and have increased osteogenic

potential: applications in wound healing and bone regeneration". MSC2011 conference, Cleveland, Ohio, USA.