



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ADHESIÓN Y ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMALES DE HUMANO AISLADAS DE MÉDULA ÓSEA, PLACENTA
Y CORDÓN UMBILICAL EN ANDAMIOS DE FIBRINA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. CHAIRES ROSAS CASANDRA PAULINA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM
DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

CD. MX., AGOSTO, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ADHESIÓN Y ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMALES DE HUMANO AISLADAS DE MÉDULA ÓSEA, PLACENTA
Y CORDÓN UMBILICAL EN ANDAMIOS DE FIBRINA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. CHAIRES ROSAS CASANDRA PAULINA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM
DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MÉXICO, CD. MX., AGOSTO, 2019.

OFICIO CPCB/756/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 25 de marzo de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CHAIRES ROSAS CASANDRA PAULINA** con número de cuenta **515015720**, con la tesis titulada **“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ADHESIÓN Y ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE HUMANO AISLADAS DE MÉDULA ÓSEA, PLACENTA Y CORDÓN UMBILICAL EN ANDAMIOS DE FIBRINA”**, realizada bajo la dirección del **DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**:

Presidente: DR. JESÚS CHIMAL MONROY
Vocal: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
Secretario: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN CÁRDENAS AGUAYO
Suplente: DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de junio de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por su contribución a mi formación académica.
- ❖ Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de este estudio (no. 263778).
- ❖ Al PAPIIT DGAPA UNAM no. IN218315, IN108116 y IN22316.
- ❖ A los miembros del Comité Tutor, integrado por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez y el Dr. Juan José Montesinos Montesinos, por sus observaciones e inestimable apoyo durante los últimos años.

A TÍTULO PERSONAL...

- ❖ A mis padres por guiarme y apoyarme durante toda mi vida, y a mis hermanos por creer en mí y ser mis raíces.
- ❖ Al Dr. Andrés Castell por darme la oportunidad de crecer como investigadora, y su ejemplo, cariño y respaldo.
- ❖ Al Dr. Juan José Montesinos por permitirme trabajar en su laboratorio, y proporcionarme células troncales mesenquimales de médula ósea y placenta cada que lo necesité.
- ❖ A los Dres. Miguel Herrera Enríquez y Gabriela Piñón Zárate por su asesoría, consejos y palabras de aliento.
- ❖ A la M. en C. Érika Hernández Estévez y a la Dra. Marta Castro Manreza por su ayuda en el cultivo y caracterización de células troncales mesenquimales de médula ósea y placenta.
- ❖ Al Dr. Javier Rolando Ambrosio por su apoyo y permitirme trabajar en su laboratorio cuando así lo requerí.
- ❖ A la Dra. Xóchitl Ambriz por su ayuda en ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal, amistad, y más que nada por sus consejos e ideas que mejoraron este trabajo.
- ❖ Por su asesoramiento técnico a: Biol. Beatriz Hernández Téllez, QFB Martina Flores Jiménez, Dra. Judith Álvarez Pérez y Dra. Katia Jarquín Yáñez.
- ❖ Por su asistencia en el manejo del microscopio confocal a: C.D. María José Gomorra Herrera y al Biol. José Alfredo Jiménez Medina.
- ❖ Por su amistad y/o solidaridad a los miembros (y aquellos que lo fueron) del laboratorio de mi tutor principal, y a los del laboratorio del Dr. Montesinos, entre ellos: Rosa, Nadia, Alda, Gaby Cano, Bety Hernández, Gaby Piñón, Dino, Judith, Katia, Rodrigo, Lupita, Adrián, Marti, Pilar, Érika, etc.
- ❖ Por último, y no menos importantes, a quienes durante varios años han sido un soporte en mi vida: Miguel, Dana, Sandor, Carmen, Carlos, Diana, Karla y Luis Antonio.

Esta tesis está dedicada a mi abuela Ignacia

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | |
| FIGURAS Y TABLAS | |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| INTRODUCCIÓN | |
| Células troncales mesenquimales | 5 |
| Importancia de las MSCs en la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa | 7 |
| Mecanismos de reparación de heridas por MSCs..... | 10 |
| ANTECEDENTES | |
| Fenotipo de las MSCs en cultivos 2D | 17 |
| Adhesión | 17 |
| Proliferación y migración | 24 |
| Diferenciación | 24 |
| Fenotipo de las MSCs en cultivos 3D | 25 |
| Adhesión | 25 |
| Remodelación/degradación..... | 27 |
| Proliferación y migración/invasión | 27 |
| Diferenciación | 27 |
| Fenotipo de las MSCs en hidrogeles de fibrina | 29 |
| Adhesión | 30 |
| Fibrinólisis | 31 |
| Diferenciación | 31 |
| JUSTIFICACIÓN | 33 |
| HIPÓTESIS..... | 33 |
| OBJETIVOS..... | 34 |
| METODOLOGÍA | 35 |
| RESULTADOS | 43 |
| DISCUSIÓN..... | 61 |
| CONCLUSIONES | 70 |
| PERSPECTIVAS | 71 |
| LITERATURA CITADA..... | 72 |
| APÉNDICE (Artículo requisito para la obtención del grado)..... | 79 |

ABREVIATURAS

AFs – Adhesiones focales

Ap – Aprotinina

AT – Ácido tranexámico

BB-94 - Batimastat

BM – Médula ósea

BM-MSCs – Células troncales mesenquimales de médula ósea

DMEM-F12 – Medio Eagle modificado de Dulbecco de F12

DMEM-LG – Medio Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa

FBS – Suero fetal bovino

MEC – Matriz extracelular

MMP - Metaloproteasa

MSCs – Células troncales mesenquimales

PAI-1 – Inhibidor del activador del plasminógeno 1

PL – Placenta

PL-MSCs – Células troncales mesenquimales de placenta

RGD – arginina-glicina-ácido aspártico

TGF- β – Factor de crecimiento transformante beta

TIMP – Inhibidor tisular de metaloproteasas

tPA - Activador del plasminógeno tisular

uPA – Activador del plasminógeno tipo uracilo

uPAR – Receptor del activador del plasminógeno tipo uracilo

WJ – Gelatina de Wharton

WJ-MSCs - Células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton

2D – dos dimensiones

3D – tres dimensiones

FIGURAS Y TABLAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Proceso de reparación de la piel | 9 |
| Figura 2. Mecanismos de acción de las MSCs durante el proceso de reparación de heridas | 16 |
| Figura 3. Adhesión en cultivos 2D mediante AFs | 19 |
| Figura 4. Diagrama de la síntesis y degradación de fibrina..... | 29 |
| Figura 5. Inmunofenotipo y diferenciación a linajes mesodérmicos de las MSCs..... | 45 |
| Figura 6. Viabilidad de las MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina y en 2D..... | 47 |
| Figura 7. Curso temporal de la distribución de vinculina y actina en MSCs cultivadas en 2D. | 51 |
| Figura 8. Curso temporal de la distribución de vinculina y actina en MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina. | 53 |
| Figura 9. Curso temporal de la degradación de fibrina por PL-MSCs y detección de AFs posterior a la fibrinólisis..... | 54 |
| Figura 10. Presencia de integrina α V en MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina y en 2D | 57 |
| Figura 11. Detección de integrina α V en PL-MSCs y BM-MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina por 48 h..... | 57 |
| Figura 12. Fibrinólisis generada por las MSCs..... | 59 |
| Figura 13. Contornos de las zonas degradadas en los hidrogeles de fibrina..... | 60 |
| Figura 14. Curso temporal de la degradación del hidrogel de fibrina por PL-MSCs y WJ- MSCs..... | 60 |
| Figura 15. Adhesión de las MSCs en hidrogeles de fibrina y su efecto fibrinolítico | 69 |
| | |
| Tabla 1. Inmunofenotipo de PL-MSCs, BM-MSCs y WJ-MSCs. | 43 |

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales (MSCs) son células multipotentes que poseen plasticidad, propiedades inmunorreguladoras, capacidad de soporte hematopoyético, y el potencial de modular la reparación de tejidos. Han sido empleadas en el tratamiento de diversas patologías en estudios preclínicos y clínicos, y son candidatas excelentes para ser utilizadas en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (IT y MR). Las MSCs aceleran la reparación de tejidos mediante su diferenciación a varios linajes, y señalización paracrina.

Las MSCs de médula ósea (BM) siguen siendo el estándar de oro y las más estudiadas en la IT y MR, así como en cultivos tridimensionales (3D), aunque los tejidos extraembrionarios como placenta (PL) y la gelatina de Wharton (WJ) representan alternativas ideales, ya que la edad del donador no restringe la calidad y cantidad de células aisladas, y su aislamiento no requiere de un proceso invasivo. De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), las MSCs aisladas de diferentes tejidos deben compartir los marcadores asociados y la capacidad de diferenciarse a linajes mesodérmicos. Sin embargo, su comportamiento varía en contextos específicos.

La fibrina es el producto terminal de la cascada de coagulación en respuesta al daño a vasos sanguíneos y es la matriz natural en todos los casos de heridas, por lo que los hidrogeles preparados con fibrinógeno ofrecen un sistema ideal para entender mejor las interacciones entre las células y un microambiente 3D similar al fisiológico. En este trabajo, se evaluó la adhesión y la actividad fibrinolítica de MSCs de BM, PL y WJ en hidrogeles de fibrina preparados con plasma sanguíneo no purificado, y comparado con cultivos bidimensionales (2D). Sin importar el tejido de aislamiento, las MSCs se adhirieron mediante adhesiones focales (AFs) positivas a vinculina e integrina αV en 2D, mientras que las AFs no pudieron

ser detectadas en los hidrogeles de fibrina. Además, algunas células no se extendieron y se mantuvieron redondas. Las proporciones de fenotipos extendido y redondo variaron, siendo PL-MSCs las que presentaron el porcentaje más bajo de células extendidas (~10%). En todos los casos, las MSCs degradaron fibrina a distintas tasas, y las PL-MSCs tuvieron la actividad fibrinolítica más fuerte, mediada principalmente a través del eje plasminógeno-plasmina. Ya que la capacidad de las MSCs para degradar un andamio se ha relacionado con su adhesión y diferenciación, el comportamiento diferencial de las MSCs empleadas en este estudio podría tener implicaciones clínicas en la ingeniería de tejidos y la terapia de reparación de heridas.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells that exhibit plasticity, immunosuppression properties, hematopoietic support capability, and the potential to modulate tissue repair. They have been used to treat several pathologies in preclinical and clinical studies and are good candidates for tissue engineering and regenerative medicine (TE & RM). MSCs accelerate tissue repair by differentiating into several lineages, and by its paracrine signaling.

MSCs from bone marrow (BM) continue to be the gold standard and the most studied in TE & RM as well as in three-dimensional (3D) culture, but extraembryonic tissues, such as placenta and Wharton's Jelly (WJ), offer a good alternative since quality and quantity of isolated cells are not restricted by donor age, and their isolation does not require an invasive procedure. According to the International Society for Cellular Therapy (ISCT), MSCs isolated from different tissues should share associated markers and the capability to differentiate to mesodermal lineages. However, their behavior varies in specific microenvironments.

Fibrin is the terminal product of the coagulation cascade in response to blood vessel injury and is the natural matrix in all cases of wounds, thus hydrogels prepared with fibrinogen offer an ideal system to better understand interactions between cells and a 3D microenvironment alike to the physiological. Herein, adhesion and fibrinolytic activity of MSCs from placenta (PL), bone marrow (BM) and Wharton's jelly (WJ) were evaluated in fibrin hydrogels prepared with nonpurified blood plasma and compared with two-dimensional (2D) cultures. Despite the source, MSCs adhered through focal adhesions (FAs) positive for vinculin and integrin αV in 2D, while FAs could not be detected in fibrin hydrogels. Moreover, some cells could not spread (or elongate) and stayed rounded. The

proportions of elongated and rounded phenotypes varied, with PL-MSCs having the lowest percentage of elongated cells (~10%). In all cases, MSCs degraded fibrin at distinct rates, where PL-MSCs had the strongest fibrinolytic activity, which was achieved principally through plasminogen-plasmin axis. Since MSCs capability to degrade a scaffold has been related to their adhesion and differentiation capabilities, the differential behavior of MSCs from distinct origins used in this work might have clinical implications in tissue engineering and wound healing therapy.

INTRODUCCIÓN

Células troncales mesenquimales

Las células troncales son células indiferenciadas con capacidad de autorrenovación y diferenciación hacia diferentes linajes celulares que se encuentran en todos los tejidos adultos con el fin de reemplazar a las células muertas por procesos fisiológicos o daño tisular [1]. En los animales, las células troncales se generan durante el desarrollo embrionario con distinta potencialidad, y con base en eso se dividen en pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Las células pluripotentes poseen la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales, ectodermo, mesodermo y endodermo, mientras que las multipotentes dan lugar a varios linajes de una sola capa germinal, y las unipotentes a un solo linaje de una capa germinal [1]. Las células troncales mesenquimales (MSCs) son células multipotentes adultas que pueden dar lugar a diferentes linajes del mesodermo, y que poseen características que las hacen atractivas para la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (IT y MR). Cabe mencionar que existe controversia acerca de la naturaleza troncal de las MSCs, ya que sigue en duda su capacidad de auto renovación *in vivo*. Por esta razón, algunos grupos de trabajo prefieren denominarlas células mesenquimales estromales, manteniendo el mismo acrónimo [1].

Las MSCs son células que presentan adherencia, morfología fibroblastoide y capacidad clonogénica *in vitro* que fueron aisladas por primera vez de médula ósea (BM), donde originan a las células del estroma, como adipocitos, osteoblastos y fibroblastos estromales [2]. En la actualidad, también se pueden obtener de tejidos extraembrionarios y otros tejidos adultos, como: placenta (PL), gelatina de Wharton (WJ) y sangre de cordón umbilical (UCB), tejido adiposo, (AT) y pulpa dental (DP), respectivamente [3-5]. Dado que no existe

un marcador específico que las identifique, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso que las MSCs aisladas de distintas fuentes deberían cumplir con las siguientes características *in vitro*: adhesión a un sustrato plástico y aspecto fibroblastoide, capacidad de diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condroblastos, y tener el siguiente inmunofenotipo: CD105+, CD90+, CD73+, CD45-, CD34-, CD14- ó CD11b-, CD79 α - o CD19-, y HLADR- [6]. En los años posteriores han surgido nuevos marcadores para su identificación a la par que se ha demostrado que poseen tres propiedades biológicas: plasticidad celular, capacidad de soporte hematopoyético, y propiedades inmunorreguladoras [7]. Asimismo, se ha reportado que las MSCs poseen la capacidad de modular la reparación de tejidos mediante señalización paracrina, principalmente [8, 9]. Por ello, han sido empleadas en estudios preclínicos y clínicos en el tratamiento de diferentes patologías, como la enfermedad trasplante versus huésped (GvHD), enfermedades autoinmunes y reparación de heridas cutáneas agudas y crónicas, entre otras [8-11].

Si bien las MSCs aisladas de diferentes tejidos suelen compartir las características anteriormente descritas, se ha observado que pueden comportarse de manera diferente en microambientes específicos. En un estudio comparativo de proteómica de MSCs de AT, BM y WJ se encontró que las WJ-MSCs secretan las concentraciones más altas de quimiocinas, proteínas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, mientras que las AT-MSCs exhiben el mejor perfil pro-angiogénico y de remodelación de tejidos [12]. Asimismo, con base en las variaciones que presentan las MSCs de BM y WJ en la secreción de factores tróficos y la regulación de queratinocitos y fibroblastos, se ha sugerido que poseen una participación preferencial por distintas fases del proceso de la reparación de heridas cutáneas [13]. De acuerdo con estos autores, las WJ-MSCs regularían de manera preferencial las etapas

iniciales, es decir, la hemostasia y la inflamación; mientras que las BM-MSCs lo harían en las etapas subsecuentes, abarcando la generación y remodelación del nuevo tejido. Por otro lado, Castro Manrreza y cols. (2014) demostraron que las MSCs aisladas de sangre de cordón umbilical (UCB) y BM poseen mejor capacidad inmunoreguladora *in vitro* que las PL-MSCs [14]. Las MSCs son buenas candidatas para IT y MR, pero el tejido de aislamiento podría influenciar el éxito de futuras terapias diseñadas con MSCs.

Importancia de las MSCs en la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa

La IT y MR es un campo interdisciplinario de investigación y aplicación clínica que se enfoca en la reparación, reemplazo o regeneración de células, tejidos u órganos para restablecer la función deteriorada por defectos congénitos, enfermedad, trauma y envejecimiento [15]. Para ello, conjuga células, andamios y factores biológicamente activos cuyas características son manipuladas de acuerdo con las necesidades que se deseen cubrir respecto a un determinado tejido u órgano. Las células empleadas pueden ser diferenciadas o troncales, de origen autólogo, alógeno o xenólogo. Debido a sus características, las MSCs han sido empleadas en estudios de IT y MR en la reparación de cartílago, riñón, corazón y piel, entre otros, sin embargo no están claros los eventos que median esta reparación [16], y los indicios que se tienen corresponden principalmente al tratamiento de heridas cutáneas, por lo que son los que se mencionarán en adelante.

La piel es el órgano más externo del organismo y cumple con diversas funciones, tales como: barrera mecánica contra agresiones físicas, químicas, radiaciones y microorganismos, mantiene la temperatura corporal y el balance hídrico, recibe y transmite estímulos sensoriales, y posee un sistema inmunológico propio, entre otras [17]. Cuando la

continuidad de la piel se ve interrumpida por incisión, escisión, quemaduras, etc., se desencadena un proceso complejo con el fin de repararla, el cual se ve afectado en heridas que abarcan varias capas de la piel y que son extensas y/o crónicas (Figura 1) [18]. El tratamiento de heridas cutáneas con MSCs se ha enfocado en quemaduras y heridas crónicas, como las úlceras diabéticas y venosas, y ha mostrado aceleración en la reparación acompañado de mejoría en la estética. En el año 2007, Falanga y cols. reportaron la aceleración del cierre de heridas agudas y crónicas, en modelos murinos y en pacientes, tratadas con BM-MSCs autólogas incluidas dentro de un “pegamento” de fibrina [19]. Durante este proceso, las MSCs inducen un estado de inmunosupresión, favorecen la reepitelización y el cierre de la dermis, y disminuyen la cicatrización [20-23].

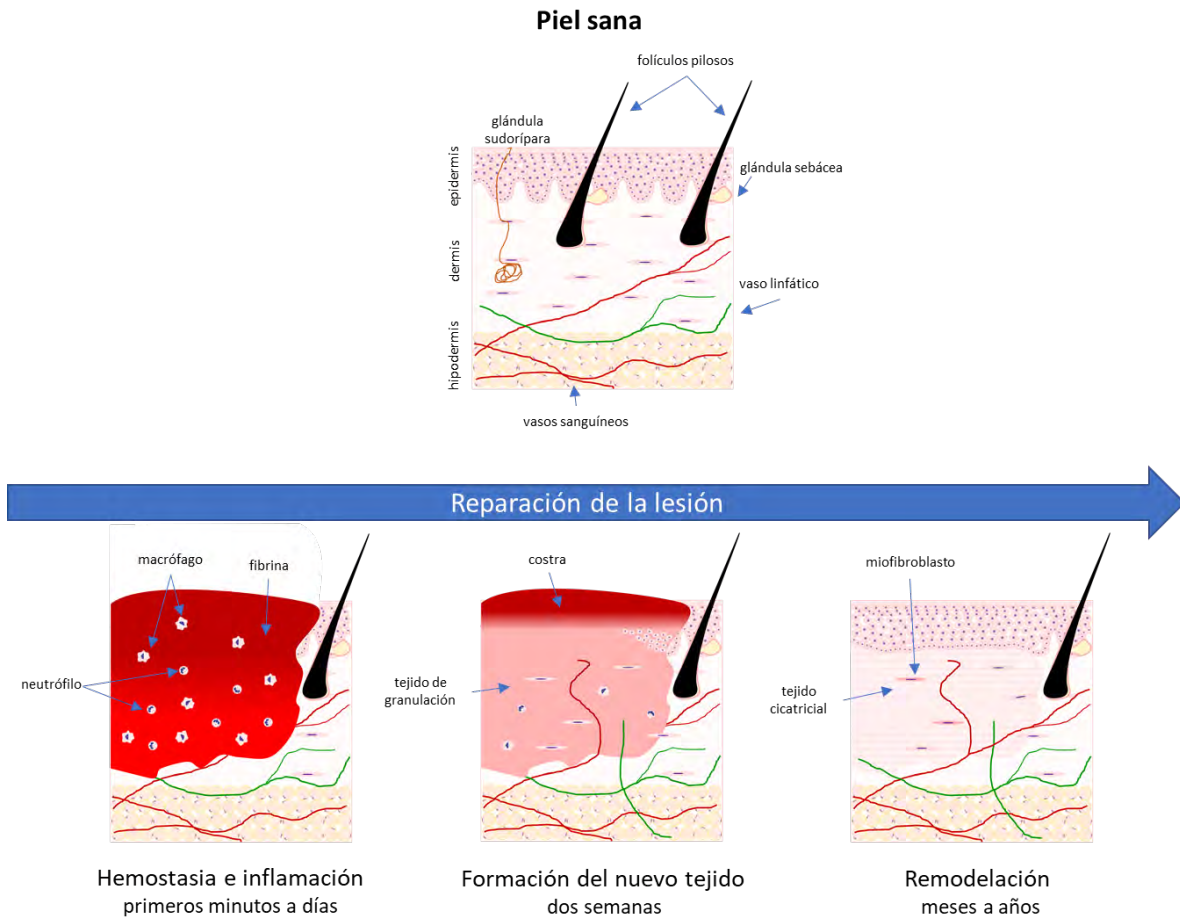


Figura 1. Proceso de reparación de la piel. La piel sana está constituida por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis es la capa más externa y está formada por un epitelio plano estratificado sin estrato córneo donde las células más abundantes son los queratinocitos, mientras que la dermis se compone de fibroblastos incluidos en una red de proteínas, glucoproteínas y proteoglicanos llamada matriz extracelular (MEC), y la hipodermis es la capa más interna y está compuesta de tejido adiposo vascularizado. Dependiendo de su localización se pueden encontrar anexos como: folículos pilosos, uñas, terminaciones nerviosas, y glándulas sebáceas y sudoríparas. Posterior a la lesión o ruptura en la continuidad, se desencadena un proceso formado por tres fases subsecuentes e interdependientes: 1) hemostasia e inflamación, en la cual se produce el infiltrado inflamatorio del sistema inmune innato proveniente de los vasos dañados, mientras que las plaquetas generan un coágulo de fibrina que fungirá como una cobertura temporal, 2) la formación del nuevo tejido, que implica la reepitelización y el cierre de la dermis, para lo cual las células de los bordes de la herida migran, proliferan y se diferencian, los fibroblastos secretan el tejido de granulación, y se restablece la vascularización, y 3) la remodelación del nuevo tejido por los fibroblastos y miofibroblastos. En las heridas que abarcan las dos primeras capas de la piel o las tres, el nuevo tejido carecerá de anexos cutáneos y se considerará tejido cicatricial.

Mecanismos de reparación de heridas por MSCs

Algunos años atrás se consideraba que el papel de las MSCs en el proceso de reparación era reemplazar a las células dañadas mediante su diferenciación y “transdiferenciación” a linajes meso-, ecto- y endodérmicos, respectivamente [8, 9, 16]. Sin embargo, estudios recientes demostraron que este fenómeno ocurre con baja frecuencia, y que las MSCs aceleran el cierre de herida principalmente a través de la secreción de factores tróficos [8, 9, 16]. El detalle de estos mecanismos se desconoce, no obstante, se ha caracterizado a los factores de crecimiento y citocinas que secretan las MSCs, y a qué poblaciones celulares afectan, como se describe a continuación.

Inflamación

El efecto de las MSCs sobre la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiado *in vitro* e *in vivo* dentro de diferentes contextos. Se ha establecido que las MSCs aisladas de distintos tejidos inhiben las actividades efectoras y secretoras de células dendríticas, linfocitos NK, -B, -T CD4+ y -T CD8+, e incrementan la población de linfocitos T reguladores (Tregs), *in vitro* y posterior al trasplante, como ya ha sido revisado antes [10, 11, 24]. Esta inmunosupresión es mediada por factores solubles como interleucina 10 (IL-10), prostanglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), el complejo de histocompatibilidad humano tipo I no clásico G5 (HLA-G5), y por contacto célula-célula. Por otra parte, se ha sugerido que las MSCs requieren ser estimuladas por un ambiente proinflamatorio para pasar de un estado de reposo a uno de activación en el cual modulen la respuesta inmune [10]. Algunas de las moléculas que forman parte del ambiente proinflamatorio son, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), y las interleucinas 1 (IL-1) y 17 (IL-17). Este campo de investigación aún está en desarrollo, por lo que se considera que es posible que

estos y otros mecanismos también estén presentes en la reparación de la piel efectuados por MSCs residentes y/o provenientes de otros tejidos o de un trasplante. Por lo pronto, se ha demostrado que el trasplante de MSCs en modelos murinos de heridas causadas por escisión o quemadura, modula la presencia de diversas citocinas y células del sistema inmunológico dando lugar a un ambiente antiinflamatorio en el lecho de la lesión. Por ejemplo, se ha observado disminución en los niveles de IL-1 β y TNF- α , así como incremento de IL-4, en heridas tratadas con BM-MSCs [25]. Asimismo, en quemaduras extensas se ha reportado una disminución de linfocitos T CD4+ y -T CD8+, y expresión dinámica del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), IL-10, IL-6 y la citocina quimioatrayente de neutrófilos inducida 1 (CINC-1) [22]. De manera similar, en quemaduras tras la administración sistémica de UC-MSCs, se ha encontrado disminución de la presencia de neutrófilos y macrófagos, de IL-1, IL-6 y TNF- α , y aumento de los niveles de IL-10 y del gen inducible por el factor de necrosis tumoral 6 (TSG-6) [21]. Por otro lado, la administración sistémica de MSCs de origen gingival, no solo modula los niveles de IL-10, IL-6 y TNF- α , sino que también disminuye la actividad de mieloperoxidasa e induce un fenotipo de remodelación de tejidos (M2) en los macrófagos, proceso mediado por IL-6 y GM-CSF *in vitro* [26]. Como se puede apreciar, los indicios que se tienen hasta el momento sobre la inmunosupresión en la reparación de heridas son limitados, por lo que no quedan claros los mecanismos moleculares que rigen este proceso. Queda también por definir si las MSCs aisladas de distintos tejidos modulan de la misma manera esta inmunosupresión.

Reepitelización, angiogénesis y cierre de la dermis

Aunque el papel de la (trans)diferenciación de las MSCs en la reparación es minoritario, cabe mencionar que en el lecho de la lesión son diferenciadas hacia queratinocitos, células endoteliales, macrófagos y pericitos con una frecuencia del 0.14, 13.2, 2.4 y 33%, respectivamente [27]. Por otro lado, las MSCs favorecen la reepitelización, la angiogénesis, y el cierre de la dermis a través de la secreción de factores tróficos que modulan las actividades efectoras y secretoras de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, y además participan en la remodelación del coágulo de fibrina. De manera específica, se ha observado que el medio condicionado, o sobrenadante, de MSCs de BM y WJ favorece la migración de queratinocitos, y la proliferación, migración y secreción de proteínas de MEC dérmica por parte de los fibroblastos *in vitro* [13, 20, 28]. Asimismo, el medio condicionado de WJ-MSCs incrementa la proliferación, migración y formación de estructuras tubulares por células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs) *in vitro*, mientras que el cocultivo directo favorece la generación de estructuras tubulares compuestas de endotelio recubierto por pericitos derivados de MSCs [29]. Se ha reportado que el medio condicionado de MSCs, aisladas de distintos tejidos, contiene diversos factores tróficos, como los siguientes: el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), TGF- β , el factor de crecimiento de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento hepático (HGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), angiogenina, IL-8, pentraxina 3 (PTX3), el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), trombospondina 1, angiopoyetina 1, y la proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP-1), entre otros [12, 13, 29, 30]. Cabe resaltar, que la expresión de estos factores podría incrementarse en un ambiente proinflamatorio, como

ya ha sido demostrado *in vitro* con el exudado de quemaduras [31]. De manera complementaria, se ha sugerido que las MSCs favorecen la regeneración de tejidos mediante la producción de vesículas extracelulares, como exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, y la formación de nanotubos membranales, los cuales participan en la comunicación célula-célula [16]. De hecho, los exosomas derivados de MSCs contienen FGF, VEGF, HGF, EGF e IL-8 [16], y se ha demostrado que inducen la proliferación y migración de fibroblastos, y la formación de estructuras tubulares por HUVECs *in vitro* [32].

Otro evento importante en la reparación de heridas es la remodelación del coágulo de fibrina, y las BM-MSCs participan mediante la degradación de éste [33]. En condiciones fisiológicas, la enzima fibrinolítica principal es la plasmina, que es un zimógeno secretado por el hígado. Las BM-MSCs no producen plasmina, pero sí otros componentes del sistema fibrinolítico que regulan su activación y actividad, como el activador del plasminógeno tisular (tPA), el activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA), el receptor del activador del plasminógeno urocinasa (uPAR) y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), lo cual se relaciona con una alta actividad fibrinolítica *in vitro*, mayor incluso a la que poseen los fibroblastos dérmicos [34]. Asimismo, se ha reportado que el tratamiento con PAI-1 recombinante disminuye la fibrinólisis de las BM-MSCs *in vitro* [33], mientras que su silenciamiento deriva en una mayor cantidad de células implantadas y angiogénesis tras el trasplante subcutáneo [35]. Es probable que la función de PAI-1 en la implantación de la herida esté relacionada no solo con fibrinólisis, sino con la capacidad de adhesión de las células [33, 35]. Al mismo tiempo, se ha demostrado que la deficiencia en la capacidad fibrinolítica de BM-MSCs (PTX3^{-/-}) disminuye su capacidad migratoria *in vitro* en hidrogeles de fibrina, mientras que su trasplante en el lecho de la herida favorece una excesiva

acumulación de fibrina que disminuye su invasión e implantación, y produce defectos en la reepitelización y el depósito del tejido de granulación [33]. PTX3 forma parte de la inmunidad humoral en contra de microorganismos, y en condiciones de reparación de heridas se cree que se une a fibrina/fibrinógeno y al plasminógeno favoreciendo la fibrinólisis, aunque se desconoce el mecanismo exacto. Por tanto, la remodelación del coágulo de fibrina les permite a las MSCs permanecer por más tiempo en el lecho de la herida.

Remodelación del tejido

Durante la última fase de la reparación, las MSCs presentan un efecto antifibrótico. Así, el tratamiento de cicatrices hipertróficas con AT-MSCs disminuyó la fibrosis, posiblemente como consecuencia de la sobrerregulación de TGF- β 3, HGF y la metaloproteasa 2 (MMP-2) en el tejido [36]. Cabe mencionar que TGF- β 3 y HGF regulan negativamente la generación de inflamación y tejido fibrótico, mientras que MMP-2 es una gelatinasa de la MEC [36, 37]. Asimismo, se ha observado *in vitro* disminución en la proliferación, migración, síntesis de MEC y expresión de genes profibróticos, como el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), PAI-1, TGF- β 1 y TGF- β 2, e incremento en la expresión de TGF- β 3 y decorina en fibroblastos queloides y aquellos provenientes de cicatrices hipertróficas [38]. También se ha observado que las BM-MSCs reducen la viabilidad, la expresión de alfa actina de músculo liso (α SMA) y la secreción de colágena por parte de fibroblastos queloides *in vitro* y en el lecho de la herida mediante la secreción de TGF- β 3, derivando en una reducción de la fibrosis y de la formación de tejido cicatricial [37].

Aunque las MSCs modulan la reparación de heridas sin importar el tejido del que fueron aisladas (Figura 2), también se han observado variaciones en los mecanismos que emplean de acuerdo con su origen. Con base en estudios realizados *in vitro*, Miranda y cols. (2015) establecieron que las WJ-MSCs inducirían el reclutamiento de plaquetas, células del infiltrado inflamatorio y BM-MSCs endógenas, además de la proliferación y la migración de queratinocitos, mientras que las BM-MSCs favorecerían la vasculogénesis/angiogénesis, la formación y remodelación del tejido de granulación, y la reepitelización [13]. Cabe destacar, que las WJ-MSCs inducen quimiotaxis de las BM-MSCs, *in vitro e in vivo*, mediante la secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) [13]. Otra diferencia relevante es que la expresión basal de PAI-1 varía, encontrándose alta en WJ-MSCs, y baja en MSCs de PL y BM, repercutiendo en su capacidad migratoria [39], y posiblemente en su capacidad fibrinolítica e implantación en el lecho de la herida. Finalmente, también se han observado diferencias sobre la fibrosis, ya que el medio condicionado de WJ-MSCs presentó un efecto profibrótico *in vitro* en fibroblastos queloides [20].

Es indudable que la terapia con MSCs es efectiva, pero la eficiencia en la implantación es baja incluso empleando dosis celulares altas, aproximadamente 1×10^6 células por animal tratado o cm^2 de área lesionada [19, 27]. Las MSCs se han trasplantado vía intravenosa, subcutánea, intradérmica, y local, ya sea en una suspensión de PBS, embebidas en un pegamento de fibrina o inoculadas en un andamio [22, 25, 27, 40]. Se ha demostrado que su administración intravenosa deriva en el 0.074% de implantación [27], mientras que la intradérmica en el 1.65% [22], y su administración local en un andamio de submucosa de intestino delgado (SIS), en el 27.6% [25]. Por otro lado, Yeum y cols. (2013) concluyeron que, a pesar de incrementarse la eficiencia de la implantación con el andamio de submucosa

de intestino delgado (SIS), es necesario realizar inyecciones celulares posteriores para mantener la cantidad mínima requerida para reparar la herida (aprox. 2×10^5 células) [25]. Por ello, para implementar terapias exitosas con MSCs es importante no solo emplear métodos de cultivo y trasplante con características óptimas, sino también elegir la fuente de MSCs que sea adecuada para reparar un daño tisular particular.

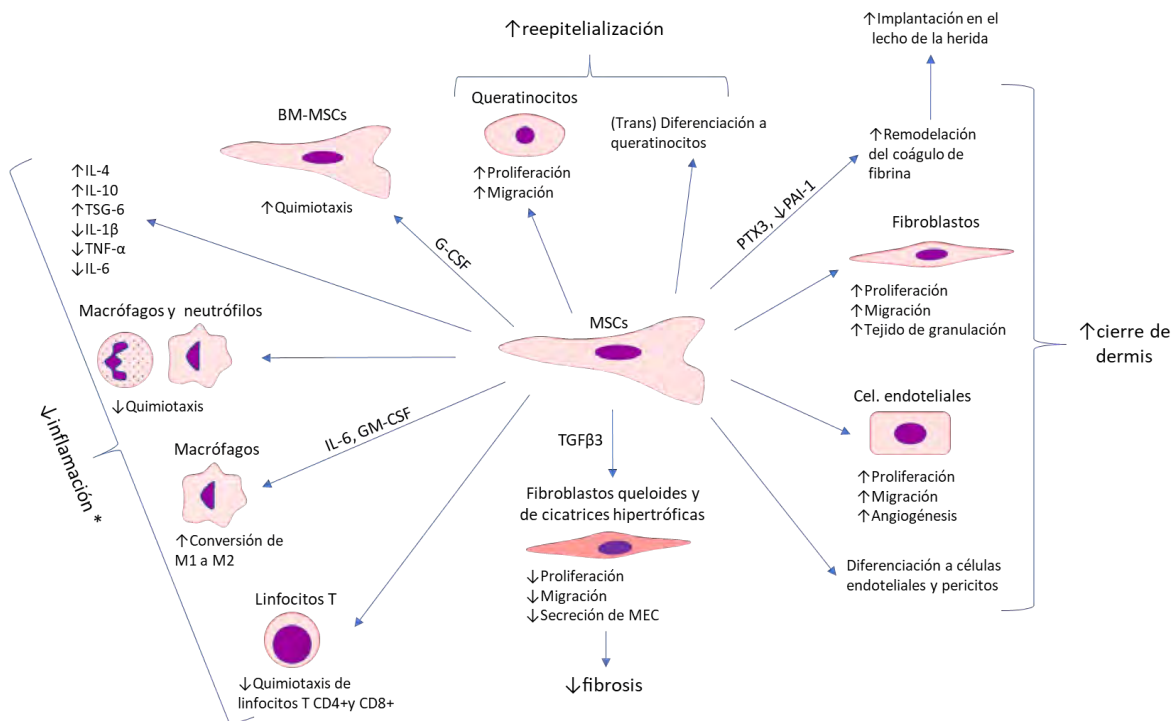


Figura 2. Mecanismos de acción de las MSCs durante el proceso de reparación de heridas. Las MSCs aceleran la reparación de heridas mediante su (trans)diferenciación, y la secreción de factores tróficos que regulan las actividades de las células cutáneas, disminuyendo la inflamación, favoreciendo la reepitelización y el cierre de la dermis, y modulando la fibrosis durante la remodelación del tejido. A pesar de que se conoce qué factores secretados por las MSCs podrían estar participando en estos eventos, en el diagrama únicamente aparecen aquellos que se han relacionado de manera directa. *Se colocan los indicios reportados en reparación de heridas, para mayores detalles sobre la inmunosupresión revisar [10].

ANTECEDENTES

Considerando los hallazgos anteriores, las MSCs podrían ser de gran utilidad en la IT y MR. El cultivo en dos dimensiones (2D) ha permitido sentar precedentes acerca de su biología en contextos específicos, sin embargo, en condiciones fisiológicas, se encuentran en un microambiente tridimensional (3D) o nicho, donde interactúan con otras células, factores de crecimiento y MEC. El nicho regula química y mecánicamente el comportamiento de las células troncales con relación a su adhesión, elongamiento, migración, división, auto-renovación, quiescencia, y diferenciación [41]. Por ello, algunos grupos de trabajo se han enfocado en evaluar algunas de estas actividades en diversos tipos de andamios. A continuación, se detalla la influencia de los cultivos 2D y 3D en el fenotipo de las MSCs, entendiendo como 2D al cultivo sobre la superficie de un sustrato, y 3D, en el interior de un andamio. Posteriormente, se hará hincapié en el hidrogel de fibrina, un andamio de origen fisiológico presente en cualquier tipo de herida.

Fenotipo de las MSCs en cultivos 2D

Las MSCs han sido cultivadas en 2D sobre sustratos naturales, sintéticos o biopolímeros, y se ha demostrado que su comportamiento es afectado por las propiedades del sustrato.

Adhesión

Los mecanismos de adhesión que emplean han sido estudiados únicamente para BM-MSCs, las cuales de manera consistente generan adhesiones focales (AFs) sobre distintos tipos de sustratos, incluyendo hidrogeles de materiales sintéticos (dextrano metacrilado, policaprolactona, PAAm-col, PAA-fb) o naturales (colágena, fibrina), y redes fibrilares electrohiladas (dextrano modificado) [42-45]. Las AFs son estructuras que median la

adhesión de diferentes tipos de células a la MEC (Figura 3), y se ha observado que en cultivos 2D comienzan como complejos focales transitorios que al madurar conectan al citoesqueleto con la MEC o sustrato a través de integrinas y proteínas de andamiaje, como vinculina y talina. [46]. Asimismo, las AFs permiten la comunicación entre la célula y su microambiente mediante mecanotransducción, transmitiendo las señales mecánicas generadas por el citoesqueleto de actina a la MEC, y viceversa. Aunque las MSCs adheridas sobre distintos sustratos muestran una forma elongada similar, durante las primeras 24 h toman caminos de adaptación diferentes en cuanto a morfología y expresión génica, que influyen no solo en la adhesión sino también en su capacidad de diferenciación [44]. Algunas de las características de los sustratos que influyen en la adhesión son la microarquitectura, la rigidez, y la presencia de sitios de adhesión. Se ha demostrado que los sustratos que no pueden ser deformados por las células de forma permanente, como los hidrogeles de materiales sintéticos, favorecen la extensión rápida y radial de las MSCs, mientras que en las redes fibrilares requieren remodelar su microambiente para posteriormente elongarse [44]. Esta remodelación incluye el reacomodo de las fibras que facilita el agrupamiento de sitios adhesivos cerca de la membrana celular, induciendo la generación de AFs [43]. Asimismo, la remodelación de las fibras favorece la elongación, proliferación y migración [43, 45]. Con relación a la rigidez, su incremento en hidrogeles de materiales sintéticos aumenta la capacidad de adhesión [42], mientras que en redes fibrilares limita su remodelación y por tanto, la adhesión [43, 45]. Más adelante, se detallarán los componentes de las AFs y como son afectados por las características del sustrato.

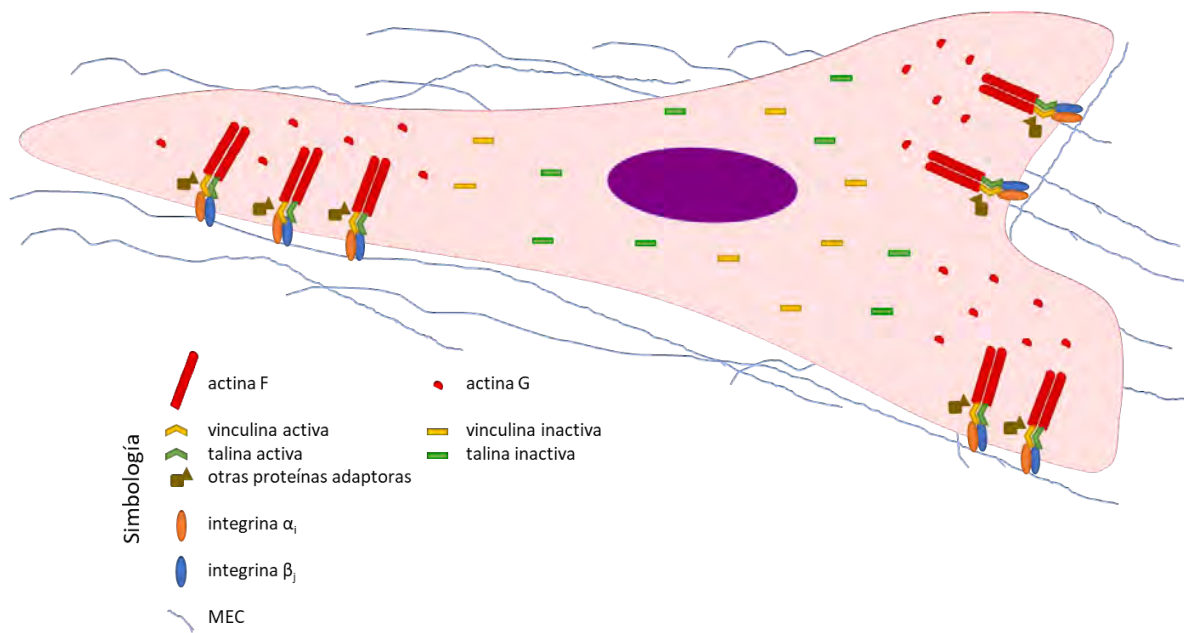


Figura 3. Adhesión en cultivos 2D mediante AFs. Las AFs son complejos multiprotéicos que conectan el citoesqueleto de actina con la MEC/sustrato a través de integrinas y proteínas de andamiaje, facilitando la comunicación entre la célula y la MEC. El reconocimiento del sustrato por alguna integrina $\alpha_i\beta_j$ induce el reclutamiento y activación de vinculina y talina, quienes unen a la integrina con actina F, favoreciendo la formación de fibras de estrés. Paxilina y la cinasa de adhesión focal (FAK) son otras proteínas de andamiaje.

Integrinas

Las integrinas son receptores transmembranales que reconocen secuencias en las proteínas de la MEC [47]. Son heterodímeros constituidos por subunidades α y β , y existen 24 combinaciones diferentes [47, 48]. Las integrinas pueden tener tres conformaciones distintas relacionadas con su estado de activación y afinidad por su ligando: “plegada” o inactiva, “extendida cerrada” o activa intermedia, y “extendida abierta” o activa [49]. Las integrinas en estado inactivo presentan baja afinidad y se encuentran en adhesiones nascentes, en las cuales se produce el reclutamiento de diversas proteínas de AFs; estas estructuras son transitorias y poseen $<0.2 \mu\text{m}^2$ [50]. Para activarse, las integrinas requieren reconocer a su ligando, interactuar con las proteínas de andamiaje, y “sensar” una fuerza mecánica proveniente del citoesqueleto de actina o del sustrato. Cuando esto sucede, la

adhesión madura y se convierte en AF, la cual se mantiene estable por 10 – 20 min antes de desensamblarse [51]. De manera excepcional, la AF puede madurar aún más y convertirse en adhesión fibrilar cuando la adhesión a fibronectina es mediada por la integrina $\alpha 5\beta 1$ [50]. Las integrinas son expresadas y activadas diferencialmente entre células no-adherentes y adherentes, de acuerdo con su funcionalidad [51]. Por ejemplo, la activación de la integrina $\alpha 11\beta 3$ en las plaquetas se produce cuando éstas generan y se adhieren al coágulo de fibrina. Por otro lado, las células adherentes, como las MSCs, regulan a las integrinas para migrar o invadir. Una de las secuencias de aminoácidos que más frecuentemente reconocen las integrinas es arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), ya que se localiza en fibronectina, fibrina, trombospondina, fibrilina, vitronectina, tenascina, osteopontina, etc., y es reconocida por las integrinas $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$, $\alpha 11\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, y $\alpha 8\beta 1$ [47]. La expresión génica de las subunidades de éstas y otras integrinas por MSCs es modulada en la presencia de diferentes sustratos, como colágena, fibrina, e hidrogeles de poliacrilamida modificados con colágena (PAAm-col) o fibrina (PAAm-fb), generándose patrones de expresión similares entre fibrina y colágena, y entre PAAm-col y PAAm-fb durante las primeras 24 h de cultivo [44]. De acuerdo con los autores, estos patrones de expresión, así como la adhesión y la elongación, se relacionan con los caminos de adaptación que las células eligen. Es decir, la laxitud en los hidrogeles de colágena y fibrina (<1 kPa) hace necesario que las células reacomoden las fibras para que lentamente generen protrusiones y se elonguen. Por otro lado, los andamios de PAAm-fb y PAAm-col son más rígidos (23 kPa), lo cual limita el reacomodo de las fibras, y facilita la elongación celular rápida e isotrópica. A las 24 h, las células adquieren una morfología en huso similar

sobre los 4 sustratos, aunque la presencia de integrina $\beta 1$ en AFs fue mayor sobre PAAm-fb y PAAm-col debido a su rigidez [44].

Vinculina

Vinculina es una proteína mecanosensitiva que enlaza a las integrinas con los filamentos de actina. Asimismo, posee sitios de unión para otras proteínas presentes en AFs, como talina, α -catenina, α -actinina, paxilina, fosfatidilinositol bifosfato, entre otras [49]. Vinculina está constituida por tres regiones: una porción globular, otra fibrilar, y una secuencia rica en prolina que une a las regiones anteriores [49]. En su estado inactivo las porciones globular y fibrilar interactúan directamente, y para activarse, la proteína debe sufrir un cambio conformacional que interrumpa esta interacción. Se encuentra inactiva en el citoplasma, y es activada al ser reclutada a las AFs estabilizando la adhesión, lo cual sucede preferencialmente sobre sustratos rígidos; por ejemplo, se ha reportado con una rigidez ≥ 34 kPa para las MSCs [50]. En las AFs, la porción globular de vinculina se une a las integrinas, y la fibrilar a los filamentos de actina [52], lo cual favorece el reclutamiento de talina y la elongación celular en MSCs [50]. A su vez, la microarquitectura también influye en la localización de vinculina. Por ejemplo, se ha demostrado que los sustratos rígidos no deformables, como los hidrogeles sintéticos de 19 kPa a 133 MPa, promueven la formación de AFs de mayor tamaño y presencia de vinculina que los laxos (<3 kPa) [42, 43]. En contraste, el aumento en la rigidez de los sustratos fibrilares disminuye la presencia de vinculina en AFs. En redes fibrilares de dextrano metacrilado modificado con secuencias RGD, la localización de vinculina en AFs, y la cantidad y área de éstas, disminuyeron cuando las fibras eran rígidas (3.1 GPa), en comparación con fibras más laxas (140 MPa) [43]. Esto se debe a que la rigidez en las fibras no permite que las células las recluten, impidiendo el

contacto entre las integrinas y sus ligandos [43]. Algo similar ha sido reportado para hidrogeles de colágena, los cuales también están compuestos de fibras [45]. En contraste, la disminución en la presencia de RGD en el sustrato limita la capacidad de remodelación de las fibras y la presencia de AFs ricas en vinculina, y este efecto es más pronunciado sobre fibras laxas [53].

Talina, paxilina y FAK

Talina es otra proteína mecanosensitiva que interactúa con vinculina, actina y las integrinas. Está conformada por una región globular, y una región flexible fibrilar [49]. También posee dos conformaciones con respecto a su actividad, aunque en su conformación inactiva la molécula se encuentra comprimida, y para activarse, debe ser “estirada”. Se ha reportado que su “estiramiento” depende de la rigidez del sustrato o del citoesqueleto de actina, y su asociación con vinculina [50]. Se ha sugerido que una de las funciones de talina consiste en reclutar a vinculina a las AFs [52], aunque también se ha reportado que estas dos proteínas son reclutadas por separado [50]. En conjunto con vinculina, talina conecta al citoesqueleto de actina con las integrinas, y participa en la mecanotransducción [49]. Por otro lado, paxilina interactúa con vinculina, talina y cinasas de tirosina, como la cinasa de adhesión focal (FAK). Paxilina y FAK participan en las cascadas de señalización que regulan, en parte, la maduración y formación de nuevas adhesiones [52]. Al igual que vinculina, el reclutamiento de estas proteínas a las AFs se ve favorecido por sustratos rígidos, como los de policaprolactona (0.9 – 133 mPa) [42] y poliacrilamida recubierta de colágena (34 kPa), aunque no necesariamente colocalizan [50].

Filamentos de actina

Actina es una proteína constituyente del citoesqueleto, y existe en monómeros (G-actina) o formando filamentos (F-actina), en citoplasma y núcleo [49]. G-actina tiene actividad de ATPasa, y polimeriza espontáneamente para generar a F-actina, y la regulación entre ambos estados por proteínas de unión a actina permite que se forme una red compleja denominada citoesqueleto de actina [49]. El citoesqueleto de actina contribuye a la forma de las células, participa en el transporte intracelular, produce fuerzas mecánicas y permite la motilidad celular. En las células mesenquimales, los filamentos de actina se organizan en fibras de estrés, las cuales generan contracción dependiente de miosina IIb [54]. Asimismo, el aparato de actomiosina participa en la mecanotransducción transmitiendo las señales recibidas desde la MEC/sustrato hasta el núcleo [55]. Se ha observado que sobre sustratos rígidos, las MSCs tienden a generar fibras de estrés que interactúan con proteínas de AF, observándose más numerosas, gruesas y largas, en comparación con los laxos, y las redes fibrilares [43]. La morfología celular se adapta a la formación de fibras de estrés, y por tanto el área de mayor extensión se produce sobre sustratos rígidos no fibrilares.

Resumiendo, desde un punto de vista estructural, las AFs consisten en: 1) la unión de las integrinas $\alpha_i\beta_j$ a su ligando en la MEC/sustrato a través de su ectodominio, 2) la interacción entre la porción citoplásmica de las integrinas con talina y vinculina, y otras proteínas de andamiaje, y 3) la interacción de vinculina y talina con los filamentos de actina (Figura 3). A través de esta estructura, la célula transmite las fuerzas de contracción generadas por el citoesqueleto hacia el exterior, y reacciona ante la “sensación” de la rigidez de la MEC/sustrato.

Proliferación y migración

La migración y la proliferación se ven incrementadas sobre sustratos rígidos no deformables, y redes fibrilares laxas [43-45].

Diferenciación

La capacidad de diferenciación de las MSCs a distintos linajes ha sido llevada a cabo en cultivos 2D con eficiencia variable, debido en parte a las propiedades mecánicas del sustrato y la morfología celular. La diferenciación a un determinado linaje se ve favorecida en sustratos con propiedades mecánicas similares a las del tejido blanco, por lo que, los linajes adipogénico, condrogénico, miogénico y neurogénico se producen preferencialmente sobre sustratos laxos, y el osteogénico, sobre sustratos rígidos [56]. Durante este proceso, el citoesqueleto también sufre cambios que afectan tanto la comunicación con su microambiente, como la morfología celular, la cual se ha podido controlar y evaluar mediante micropatrones de forma geométrica y tamaño específicos. Se ha demostrado que la diferenciación osteogénica requiere de la formación de fibras de estrés largas y gruesas, tal cual ocurre cuando se permite la elongación celular y/o la morfología es limitada a un rectángulo o estrella, mientras que la adipogénesis y la condrogénesis se favorecen con un citoesqueleto inestable, donde actina se encuentre dispersa sin formar fibras de estrés, elongación mínima o nula y/o una morfología redonda o cuadrada [57]. Esto se debe a que las células generan tensión en las curvaturas más agudas, lo cual deriva en la sobreexpresión de AFs y formación de filamentos de actina [41], además, la osteogénesis requiere generar fuerzas de tracción, al mismo tiempo que la condrogénesis y la adipogénesis disminuyen en la presencia de AFs [57]. De igual forma, los sustratos que

impiden la remodelación favorecen la osteogénesis, en comparación con aquellos que sí la permiten [44]. Por otro lado, Van Tam y cols. (2012) lograron la diferenciación a linajes osteogénico, adipogénico, y condrogénico en grados similares sobre hidrogeles de policaprolactona sin micropatrones, y rigidez en un rango de 0.9 a 133 MPa [42]. Por tanto, la rigidez y la microarquitectura del sustrato optimizan la diferenciación a determinados linajes, aunque las fuerzas mecánicas externas aplicadas al sustrato también participan, y además requieren, principalmente, de la presencia de inductores químicos [56, 57].

Fenotipo de las MSCs en cultivos 3D

Las MSCs han sido cultivadas en diferentes tipos de andamios con el fin primario de reparar o sustituir algún tejido u órgano, aunque también se ha evaluado su comportamiento, como viabilidad, migración/invasión, y degradación/remodelación del andamio, además de las actividades mencionadas previamente.

Adhesión

Tradicionalmente, el cultivo 3D se ha valido del análisis de la viabilidad y la elongación celular como indicadores indirectos de la adhesión [58, 59], aunque también se ha indagado en los mecanismos involucrados. Para ello, se ha recurrido a la identificación de las proteínas de AF, encontrándose que las estructuras involucradas varían en composición y tamaño, y que las AFs podrían no existir tal cual se conocen en cultivos 2D [60]. Hay tres aspectos generales del andamio que influyen en la adhesión: 1) la presencia de sitios bioactivos, 2) la rigidez, y 3) la degradación/remodelación. La adición de sitios bioactivos ha permitido evaluar la adhesión dependiente de integrinas, por ejemplo, se ha demostrado que en hidrogeles de ácido hialurónico modificado con secuencias RGD la adhesión y la

elongación se encuentran limitadas cuando la densidad del ligando es baja, originando una morfología celular redonda, expresión disminuida de las integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$, e incrementada de la integrina $\alpha 2$ [58]. Asimismo, en ausencia de RGD en hidrogeles de agarosa, las células no lograron elongarse y la proteína vinculina no fue detectada [61]. En cuanto a la rigidez, se ha observado que MSCs cultivadas sobre matrigel se elongaron e invadieron sin generar AFs ricas en vinculina, paxilina o talina [42]. A pesar de que es un evento que genera más preguntas que respuestas, la ausencia de algunas proteínas de AF en andamios laxos, no implica que la adhesión sea independiente de integrinas [60]. Hakkinen y cols. (2011) reportaron que fibroblastos incluidos en hidrogeles de colágena o matrigel exhibieron AFs positivas a integrina $\beta 1$, aunque la expresión de vinculina fue baja y nula, respectivamente [62]. Algunos reportes sugieren que la presencia de RGD predomina sobre la rigidez en influenciar la elongación celular y la formación de AFs en cultivos 3D. Por ejemplo, en andamios electrohilados de ácido hialurónico, las MSCs exhibieron un área de elongación mayor, y se observó una mayor cantidad y tamaño de AFs positivas a vinculina al incrementarse la presencia de secuencias RGD en las fibras, sin observarse variación al incrementarse la rigidez fibrilar (1 vs. 8 GPa) [53]. Igualmente, en hidrogeles de ácido hialurónico de la misma rigidez, la elongación celular fue favorecida al incrementar la densidad de secuencias RGD agrupadas [58]. Por último, se ha demostrado que en 3D las MSCs requieren degradar y/o remodelar el andamio para poder elongarse y formar AFs ricas en vinculina, lo que nuevamente, no dependió de la rigidez del andamio [63].

Asimismo, las AFs en 3D son importantes para la migración, ya que el silenciamiento de vinculina disminuyó la capacidad de generar fuerzas de tracción, y posterior invasión, de los fibroblastos en hidrogeles de colágena [64].

Remodelación/degradación

A diferencia del cultivo en 2D, en 3D las células se enfrentan al reto físico que representa el andamio. En el caso de algunas células troncales, el andamio limita el elongamiento celular, el mantenimiento de la potencialidad y/o la capacidad de diferenciación hacia un linaje específico [63, 65]. Khetan y cols. (2013) demostraron que la capacidad de las MSCs para degradar y remodelar el andamio determina la adhesión, la generación de fuerzas de tracción, y la preferencia de diferenciación hacia un linaje osteogénico o adipogénico, siendo todo esto afectado por el entrecruzamiento covalente del andamio más no por su rigidez o la morfología celular [63].

Proliferación y migración/invasión

Aparentemente, la proliferación de las MSCs es regulada por la presencia de sitios bioactivos, y no por la rigidez [53, 58] o degradabilidad del andamio [63], incrementándose al aumentar la densidad de RGD. Por otro lado, la migración solo es posible si las células degradan su microambiente [39, 66], y en el caso de matrigel, la migración está relacionada con una alta expresión de las catepsinas B y D, y baja de PAI-1 [39], que probablemente correlacione con su actividad enzimática.

Diferenciación

La diferenciación de las células en 3D está mediada por la morfología celular, la presencia de sitios bioactivos, la degradabilidad del andamio, y la aplicación de fuerzas externas. Recientemente, el empleo de micronichos 3D recubiertos de fibronectina ha permitido evaluar el efecto del cultivo en espacios confinados con formas y volúmenes específicos, de

tal suerte que se ha demostrado que las MSCs en forma de prisma triangular o rectangular tienden a generar fibras de estrés y AFs, y a diferenciarse a osteoblastos, mientras que aquellas que asemejan cilindros o cubos, presentan marcas difusas de vinculina, actina y otras proteínas que participan en la tracción celular, predisponiendo a una diferenciación adipogénica [67]. De igual forma, MSCs diferenciadas a condroblastos en geles de agarosa adquieren una morfología redonda o esférica con marcas difusas de vimentina, tubulina, actina y vinculina, derivando en la inestabilidad de filamentos intermedios, microtúbulos y microfilamentos, y ausencia de AFs [68, 69]. La falta de adhesión mediada por la unión integrinas-RGD favorece la formación de matriz pericelular, necesaria para la respuesta ante estímulos externos que favorecen la condrogénesis, como la presión hidrostática y la compresión dinámica [68]. Asimismo, la condrogénesis disminuyó al incrementar la presencia de secuencias RGD, cuyo reconocimiento es mediado por la integrina $\alpha\beta3$ y la formación de fibras de estrés [61]. El papel de la rigidez durante la condrogénesis es incierto [68, 69] y, aparentemente, predomina la influencia de RGD [53], por lo que el conocimiento acerca de la importancia de ambos aspectos durante la diferenciación sigue siendo deficiente. En relación con la remodelación del andamio, el entrecruzamiento covalente inhibe su degradación y la generación de fuerzas de tracción, y se favorece la diferenciación adipogénica frente a la osteogénica [63]. La influencia de la aplicación de fuerzas externas no es tema de esta tesis, y puede ser revisada en [56, 57].

Fenotipo de las MSCs en hidrogeles de fibrina

La fibrina ha sido empleada por largo tiempo en la IT y MR, en parte como vehículo en el trasplante de células [70]. Los hidrogeles de fibrina son redes fibrilares viscoelásticas preparadas a partir de fibrinógeno purificado polimerizado, generalmente, con una solución de trombina, y que representan la última parte de la cascada de coagulación (Figura 4). Usualmente, poseen una concentración de fibrinógeno cercana a la fisiológica (~3 mg/ml), con una rigidez total y fibrilar de: <1 kPa [44] y ~5 MPa para fibras de ~130 nm [71]. El incremento en la concentración de fibrinógeno y/o trombina o en el pH acelera la polimerización, lo que inhibe el crecimiento lateral de las fibras, originando que éstas sean más delgadas y rígidas [72, 73]. Asimismo, la generación de fibras más delgadas va acompañada del incremento en la densidad fibrilar [72, 73]. La modificación de las propiedades mecánicas del andamio, incluyendo la rigidez total y fibrilar, y el diámetro y densidad de las fibras, altera el comportamiento de las MSCs cultivadas en 2D y 3D, aunque todavía no se ha podido mostrar la influencia de la mayoría de estos criterios por separado [59, 74].

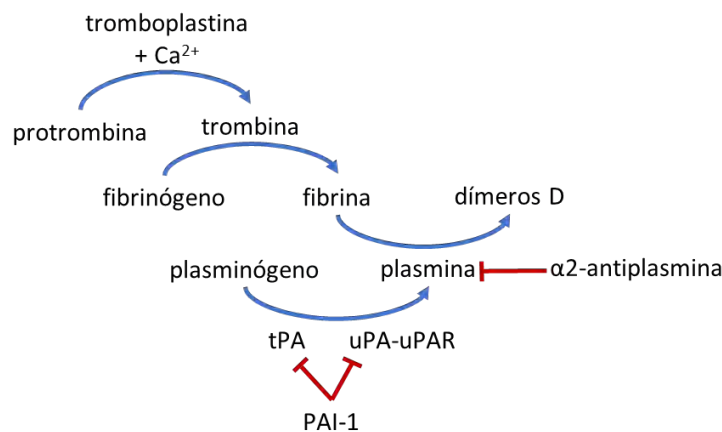


Figura 4. Diagrama de la síntesis y degradación de fibrina. Se observan las enzimas que participan en la formación y disolución de la fibrina (flechas azules), y los principales inhibidores de su degradación (flechas rojas). uPA, activador del plasminógeno tipo uracilo; uPAR, receptor del activador del plasminógeno tipo uracilo; tPA, activador del plasminógeno tisular; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno 1.

Adhesión

Las MSCs cultivadas sobre hidrogeles de fibrina (2 mg/ml) con una rigidez total <1kPa, requieren remodelar las fibras para elongarse hasta alcanzar su área de mayor extensión, en un proceso de adaptación que dura 24 h [44]. Al finalizar, se observan AFs positivas a vinculina y, principalmente, a integrina $\beta 1$. Por otro lado, este comportamiento presenta variaciones cuando se altera la rigidez o el diámetro fibrilar. Por ejemplo, el incremento en la rigidez a 23 kPa limita el desplazamiento de las fibras, lo que acelera la elongación celular e induce una mayor presencia de vinculina en las AFs [44]. Cabe mencionar que, para observar únicamente el efecto de la rigidez, los autores polimerizaron el fibrinógeno en la misma concentración previa (2 mg/ml) sobre hidrogeles de poliacrilamida, por lo que son andamios compuestos. Asimismo, el diámetro de las fibras altera la morfología celular, ya que las MSCs son más delgadas y ramificadas sobre fibras gruesas [74], acorde a lo reportado para otros tipos de células, que generaron morfologías de mayor extensión y área de contacto sobre fibras de 81 ± 30 nm que sobre las de 211 ± 60 nm [73]. Por otro lado, dentro del hidrogel, las MSCs adquieren una morfología fibroblástica, aunque el incremento en la concentración de fibrinógeno de 5 a 50 mg/ml induce disminución en la proliferación y la elongación hasta el punto en que las células se observan redondas, lo cual se asoció con poros de tamaño heterogéneo y más cerrados en los geles de 50 mg/ml [59]. No se sabe si dentro del hidrogel de fibrina las MSCs generan AFs, aunque se ha reportado que fibroblastos sí y que están formados, en parte, por integrina $\beta 1$ y vinculina [62].

Fibrinólisis

Las BM-MSCs generan suficiente hidrólisis a las 36 h de cultivo en hidrogeles de 2.5 mg/ml de fibrinógeno a una densidad de 3×10^3 células/ml, la cual es dependiente del eje plasminógeno-plasmina [33]. La degradación del andamio permite que las BM-MSCs invadan y migren en los hidrogeles de fibrina [33, 34]. Como se mencionó en la introducción, las BM-MSCs no secretan plasmina, pero sí a las proteínas que regulan su actividad, como tPA, uPA, uPAR, y PAI-1, además de otras enzimas hidrolíticas, como las metaloproteasas (MMPs) y las catepsinas B y D [34, 39, 75]. Aunque no se ha evaluado la actividad fibrinolítica de MSCs de WJ y PL, se ha encontrado que también secretan a las proteínas PAI-1, catepsinas B y D, y MMPs [39, 76]. Entre las MMPs, MT1-MMP, MT2-MMP y MT3-MMP poseen la mayor actividad fibrinolítica, y su sobreexpresión en células epiteliales permite la invasión en hidrogeles de fibrina sin importar el grosor de la fibra [73].

Diferenciación

La presencia de fibrina sobrerregula la expresión génica de los linajes endotelial, miogénico, neurogénico, condrogénico, osteogénico y adipogénico [77] y se ha observado diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica [44, 74, 78, 79]. Cabe mencionar, que la diferenciación osteogénica disminuye al incrementar el diámetro de la fibra o al limitarse su remodelación [44, 74]. En cuanto a la diferenciación condrogénica, aunque las MSCs secretaron proteoglicanos y colágena II, la formación de matriz pericelular condrogénica fue menor en comparación con los hidrogeles de agarosa, posiblemente a consecuencia de la presencia de secuencias RGD en fibrina [79]. Asimismo, la presencia de

inhibidores fibrinolíticos en el hidrogel favoreció la condrogénesis de las MSCs *in vitro* [80], lo que podría ser a causa de una actividad fibrinolítica reducida.

Las diferencias encontradas en las MSCs provenientes de distintas fuentes en la remodelación de tejidos son indicios de que el tejido del que son aisladas influye, y que la forma en la que interactúan con su microambiente, incluyendo otras células, factores de crecimiento, citocinas y MEC, también podría ser distinta, lo que al final podría impactar en la generación de sustitutos tisulares mediante la IT y MR. Por otro lado, el trasplante clínico de MSCs con alteraciones en la actividad fibrinolítica podría generar trombosis no deseadas [81], o disminuir la implantación de las células en el lecho de la herida [33]. Por otra parte, los hidrogeles generados a partir de fibrinógeno purificado carecen de factores de crecimiento y otras proteínas presentes en el plasma [71], por lo que los hidrogeles preparados con plasma no purificado representan un microambiente más parecido al fisiológico, y por tanto, más fidedigno para la evaluación del comportamiento de las MSCs. A pesar de que existe diversidad genética entre humanos, la composición y concentración de los factores de coagulación en muestras de donadores sanos es similar [82], lo que ha favorecido la obtención de resultados confiables *in vivo* en IT y MR [83, 84].

JUSTIFICACIÓN

Las MSCs han sido empleadas para tratar diversas patologías, y se han aislado de varios tejidos adultos y extraembrionarios bajo la premisa de que comparten las características estipuladas por la ISCT. Aunque las BM-MSCs siguen siendo el estándar de oro, la obtención de MSCs de PL y de la WJ podría tener varias ventajas prácticas, incluyendo: la procuración de las muestras de tejido, daño reducido al donador y la facilidad de almacenar grandes cantidades de MSCs con fines de IT y MR. Por otro lado, hay indicios de que su comportamiento en determinados microambientes depende del tejido fuente. La evaluación de la viabilidad, adhesión y fibrinólisis de las MSCs de placenta, médula ósea y cordón umbilical embebidas en un hidrogel de fibrina preparado a partir de plasma no purificado permitirá conocer mejor las interacciones diferenciales entre éstas y un andamio fisiológico presente en cualquier tipo de herida.

HIPÓTESIS

Si se colocan células troncales mesenquimales de humano de médula ósea, cordón umbilical y placenta en un andamio de fibrina, entonces tendrán diferente actividad de adhesión y fibrinólisis.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar la adhesión y la capacidad fibrinolítica de MSCs de humano aisladas de BM, PL y WJ embebidas en un andamio de fibrina.

Objetivos particulares

1. Realizar la caracterización del inmunofenotipo y de la capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos de las MSCs aisladas de médula ósea, placenta y gelatina de Wharton.
2. Evaluar en BM-MSCs, PL-MSCs y WJ-MSCs cultivadas en andamios de fibrina:
 - 2.1 Viabilidad
 - 2.2 Presencia de vinculina e integrina αV en adhesiones focales
 - 2.3 Capacidad hidrolítica en presencia y ausencia de inhibidores fibrinolíticos

METODOLOGÍA

Aislamiento de MSCs

Las MSCs fueron aisladas de médula ósea, placenta y gelatina de Wharton de cordón umbilical humanos colectados mediante donación bajo consentimiento informado por escrito. Las muestras de médula ósea (n=3), placenta (n=3) y cordón umbilical (n=3) fueron obtenidas bajo los lineamientos éticos de los hospitales Bernardo Sepúlveda, y Francisco del Paso y Troncoso del Instituto Mexicano del Seguro Social, y del Hospital General de México Eduardo Liceaga, respectivamente.

Aislamiento de BM-MSCs

Las MSCs de médula ósea fueron aisladas mediante gradiente de densidad, y posterior adherencia de células mononucleares al sustrato plástico, de acuerdo con un protocolo previamente descrito [3]. Un mL de aspirado de BM fue incubado con 50 mL de un coctel de enriquecimiento de células mesenquimales (RosetteSep™ system, StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canadá) a temperatura ambiente por 20 min. Este coctel contiene anticuerpos monoclonales para los marcadores CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b y glicoforina A. Posteriormente, la suspensión se diluyó con una solución de fosfatos (PBS) adicionada con suero fetal bovino (FBS) 2% y ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 1 nM, y se colocó sobre medio Ficoll (Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia). Se centrifugó a 1200 rpm por 25 min, y la interfase obtenida fue lavada con PBS – FBS 2% - EDTA 1 nM. La suspensión se centrifugó nuevamente, y el pellet celular fue resuspendido en medio DMEM-LG suplementado con 10% de FBS, 4mM de L-glutamina, y antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina y 100 mg/mL de gentamicina), todos obtenidos de Gibco BRL (Rockville, MD, EUA). Las células fueron sembradas a una densidad de 2×10^5

células/cm²; al cuarto día las células no adherentes fueron removidas y medio fresco fue adicionado. Al llegar al 80% de confluencia, la monocapa celular fue cosechada (tripsina 0.05% - EDTA 0.02%) y resembrada a una densidad de 2 x 10³ células/cm².

Aislamiento de PL-MSCs

Las MSCs de placenta se obtuvieron a través de disgregación mecánica y enzimática [3]. Para ello, una muestra de ~ 3 cm³, obtenida del área interna de los lóbulos placentarios centrales, fue lavada con PBS y disectada en fragmentos de ~ 3 mm de longitud. Estos fragmentos fueron digeridos con tripsina 0.05% - EDTA 0.02% en agitación constante a 37 °C por 30 min. Posteriormente, esta suspensión fue filtrada a través de un filtro de nylon 100-m (Falcon, BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), y colectada en DMEM-LG suplementado con 10% de FBS. La suspensión fue centrifugada a 1400 rpm por 10 min, y el pellet resultante fue resuspendido en medio DMEM-LG suplementado con 10% de FBS, 4mM de L-glutamina, y antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina y 100 mg/mL de gentamicina). Las células fueron sembradas a una densidad de 2 x 10⁵ células/cm²; al cuarto día las células no adherentes fueron removidas y medio fresco fue adicionado. Al llegar al 80% de confluencia, la monocapa celular fue cosechada (tripsina 0.05% - EDTA 0.02%) y resembrada a una densidad de 2 x 10³ células/cm².

Aislamiento de WJ-MSCs

Las MSCs del cordón umbilical fueron obtenidas de la gelatina de Wharton empleando un método de explantes modificado para este trabajo [85]. La muestra de ~10 cm de longitud se lavó en repetidas ocasiones con PBS, y se seccionó longitudinalmente para retirar los vasos sanguíneos. La muestra se seccionó nuevamente para obtener fragmentos de ~1 cm², los cuales se colocaron en cajas Petri con la gelatina de Wharton en contacto con el sustrato

plástico. Los explantes fueron cultivados en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS, 4mM de L-glutamina y antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina y 100 mg/mL de gentamicina), todos obtenidos de Gibco BRL. Se hicieron cambios de medio cada tercer día, y al cabo de dos semanas se retiraron los explantes. Al llegar al 80% de confluencia, la monocapa celular fue cosechada (tripsina 0.05% - EDTA 0.02%) y resembrada a una densidad de 2×10^3 células/cm².

Criopreservación de MSCs

La monocapa celular fue colectada después de incubarla con una solución de tripsina 0.05% - EDTA 0.02% a 37 °C por 5 min. La suspensión obtenida fue lavada con PBS – FBS 10%, y centrifugada a 1200 rpm por 5 min. Tras descartar el sobrenadante, el pellet celular fue resuspendido en medio de congelación, DMEM-LG o DMEM-F12 suplementado con 50% de FBS, 10% de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), L-glutamina y antibióticos, a una densidad de 1×10^6 células/mL. Posteriormente, las células fueron congeladas con disminución gradual de la temperatura (1 °C/min) en un ultracongelador (-80 °C) durante la noche. Al día siguiente se cambió el almacenamiento a nitrógeno líquido para su criopreservación a largo plazo. Por otro lado, el descongelamiento se realizó a 37 °C en menos de 5 min, tras lo cual la suspensión celular se sembró en medio suplementado DMEM-F12 o DMEM-LG, según correspondiera. Al llegar al 80% de confluencia, la monocapa celular fue cosechada y resembrada. Los experimentos se realizaron con células provenientes de resiembras jóvenes (1 – 4).

Caracterización de MSCs

La caracterización inmunofenotípica y las diferenciaciones mesodérmicas se realizaron de acuerdo con lo previamente descrito [3]. Brevemente, la presencia de los marcadores CD105, CD90, CD73, CD45, CD34, CD31, CD14 CD13, HLA-ABC y HLA-DR se detectó mediante análisis de citometría de flujo empleando anticuerpos monoclonales acoplados a FITC, PE y APC, todos de BD Biosciences. Las células marcadas se analizaron con el Citómetro de Flujo FACS CANTO II (BD Biosciences) con al menos 10,000 eventos por muestra, y los datos se analizaron con el programa FlowJo 10 (FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA).

La diferenciación adipogénica fue inducida empleando el kit comercial MesenCult Adipogenic Differentiation adicionado con los suplementos estimuladores correspondientes (Stemcell Technologies Inc.) por 14 días, y confirmada mediante la tinción de rojo oleoso (Sigma-Aldrich), contrastada con la tinción de hematoxilina para permitir la visualización de núcleos. La diferenciación osteogénica fue inducida empleando el kit comercial MesenCult Osteogenic Differentiation suplementado con dexametasona 10^{-8} M, ácido ascórbico 0.2 mM y β -glicerolfosfato 10 mM (Stemcell Technologies Inc.) por 21 días, y confirmada mediante la tinción de fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich). Por otro lado, la diferenciación condrogénica fue inducida con el kit comercial Chondrocyte Differentiation Medium Bullet, consistente en medio basal de diferenciación condrogénica suplementado con SingleQuots de dexametasona, ascorbato, solución de insulina-transferrina-selenio (ITS), piruvato de sodio, prolina y L-glutamina (Cambrex-Lonza Bio Science Walkersville Inc., Walkersville, MD, EUA), adicionado con 10 ng/mL de TGF- β 3 (Cambrex-Lonza Bio Science Inc.) por 28 días. La condrogénesis fue confirmada mediante la tinción de azul alciano (Sigma-Aldrich).

Cultivo de MSCs en hidrogeles de fibrina

Muestras de plasma humano provenientes de donadores sanos fueron proporcionadas por el banco de sangre del Hospital General de Iguala, Guerrero, del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. El plasma se obtuvo a partir del fraccionamiento primario de sangre total, y se cuantificó el contenido de fibrinógeno mediante coagulometría automatizada. La concentración promedio de fibrinógeno por plasma fue de 2.925 ± 0.15 mg/mL. Posteriormente, se utilizó plasma no purificado de donadores individuales en la preparación de los hidrogeles de fibrina. A partir de un método modificado para este trabajo [86], se obtuvo una suspensión de 200 μ L de fibrina mezclando 136 μ L de plasma, 24 μ L de NaCl 0.9%, 40 μ L de CaCl₂ 1% y 2500 células. El CaCl₂ 1% se adicionó al final, ya que es el agente entrecruzante, y se incubó la suspensión a 37°C por 30 min para inducir la polimerización de la fibrina. Finalmente, se adicionó medio suplementado DMEM-LG a los geles de PL-MSCs y BM-MSCs, y DMEM-F12 suplementado a los geles de WJ-MSCs. Como control del cultivo, 7500 células/cm² fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich).

Tinciones de inmunofluorescencia

Ensayo de viabilidad

La viabilidad fue analizada en hidrogeles y monocapas cultivados por 3 días empleando la tinción de calceína y homodímero de etidio (kit LIVE/DEAD, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En ambas condiciones, el control positivo de muerte se obtuvo tras la incubación en etanol por 30 min previo a la tinción. Se tomaron imágenes panorámicas (100x) con un microscopio Nikon Eclipse 80i

usando el programa NIS-Elements F4 (Nikon, Sinagawa, Tokio, Japón). La estimación de la viabilidad se realizó mediante conteo manual, debido a la imposibilidad de delimitar con un programa los bordes de las células cultivadas en los hidrogeles de fibrina.

Análisis de vinculina e integrina α V

Las proteínas de vinculina e integrina α V fueron detectadas en los hidrogeles y en las monocapas cultivadas por 0.5, 12, 24, 48 y 72 h. Las células fueron fijadas con formaldehído 4% por 10 h (hidrogeles) o 30 min (monocapas). Los hidrogeles fueron embebidos en medio de inclusión de tejido Tissue Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) y congelados a -80 °C para su crio-seccionamiento. Las monocapas y las crio-secciones fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0.1% por 10 o 15 min, respectivamente, e incubadas con PBS-albúmina 5% por 30 min. Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario anti-vinculina 1:100 (kit FAK100, Merck-Millipore, Burlington, MA, EUA) y su anticuerpo secundario anti-mouse-CY5 1:200 (Seracare, Milford, MA, EUA). Adicionalmente, las muestras de los cultivos de 2 días fueron incubadas con el anticuerpo anti-CD51 1:75 (Enzo Biochem, Farmingdale, NY, EUA) y su secundario anti-conejo-FITC 1:200 (Merck-Millipore). Las muestras se incubaron con cada anticuerpo por separado a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, se incubaron con faloidina-TRITC 1:1000 (kit FAK-100, Merck-Millipore) por 30 min, y con DAPI 1:1000 (kit FAK-100, Merck-Millipore) por 10 (monocapa) o 15 min (crio-secciones). Finalmente, las muestras fueron montadas con solución DAKO (Agilent Technologies, Sta. Clara, CA, EUA). Algunas crio-secciones fueron teñidas con el anticuerpo primario anti-CD105 1:200 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) en un cuádruple marcaje con anti-vinculina, faloidina-TRITC, y DAPI. El anticuerpo secundario empleado para anti-CD105 fue anti-ratón-FITC 1:100 (Merck-Millipore). Se

tomaron imágenes panorámicas (200x) con un microscopio Nikon Eclipse 80i, mientras que las proyecciones en Z (630x, 400x) fueron adquiridas en los microscopios confocales Leica TCS SP5 – Leica TCS SP8 con el programa LASX (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

Evaluación de la degradación enzimática del hidrogel

Las MSCs generaron fibrinólisis en los ensayos de adhesión y viabilidad a una densidad de 12,500 células/mL. Con el fin de observar si el efecto se conservaba a una densidad celular menor, se realizó el ensayo de degradación enzimática con 1,500 células/mL. La degradación del hidrogel fue evaluada tras 7 días de cultivo en presencia o ausencia de los siguientes inhibidores fibrinolíticos: BB-94 5 μ M (Abcam, Cambridge, Reino Unido) [73], ácido tranexámico 400 μ g/mL (Sigma-Aldrich) [86], aprotinina 200 μ g/mL (Sigma-Aldrich) [73], BB-94/ácido tranexámico, BB-94/aprotinina, y aprotinina/ácido tranexámico. La preparación de los hidrogeles se realizó acorde a lo anteriormente descrito, adicionando los inhibidores a la suspensión de fibrina previo a su polimerización. Al término del cultivo, los hidrogeles fueron fijados con formaldehído 4%, y las zonas degradadas fueron visualizadas en un microscopio estereoscópico Olympus SZX7 (Shinjuku, Tokio, Japón). Alternativamente, algunos hidrogeles sembrados en ausencia de los inhibidores fueron cultivados por 12 días, al cabo del cual fueron fijados y teñidos con H y E.

Procesamiento de imagen

El procesamiento de imagen de las micrografías se realizó mediante el programa Fiji-ImageJ 1.51h (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Las micrografías fueron editadas

para ajustar brillo, contraste y color usando las mismas magnitudes para cada ensayo. Las proyecciones en Z fueron proyectadas al máximo para crear imágenes en 2D (reconstrucciones 3D). El análisis morfológico fue realizado bajo el criterio de una forma celular redonda o elongada, y los porcentajes fueron calculados a partir de imágenes panorámicas inmunofluorescentes de los hidrogeles. En promedio, 75 células fueron analizadas por cada muestra. El área degradada total, obtenida en el ensayo de fibrinólisis, fue cuantificada mediante la herramienta de análisis de partículas empleando imágenes panorámicas (8x). Los contornos de las zonas degradadas fueron delineados con el mismo programa (Figura 13).

Análisis estadístico

La estadística de los datos provenientes del análisis morfológico, y del ensayo de fibrinólisis fue generada mediante el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Ambos análisis intergrupales fueron realizados con la ANOVA de dos vías seguida por el Tukey test. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Asimismo, el análisis estadístico de la viabilidad fue realizado con la ANOVA de una vía seguida por el Tukey test.

RESULTADOS

Inmunofenotipo y diferenciaciones mesodérmicas de PL-MSCs, BM-MSCs y WJ-MSCs

En este estudio se evaluó el comportamiento de las MSCs de PL, BM y WJ cultivadas en hidrogeles de fibrina mediante ensayos de viabilidad, adhesión y fibrinólisis. Previamente, las células fueron caracterizadas mediante el análisis de la expresión de marcadores asociados con MSCs, y su diferenciación a linajes mesodérmicos. Como ya ha sido reportado antes [3, 4], las células presentaron una alta expresión de CD105, CD90, CD73 y CD13, expresión moderada o baja de HLA-ABC, y expresión nula o baja de CD45, CD34, CD31, CD14 y HLA-DR (Tabla 1, Figura 5a). Por otro lado, la capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos fue similar entre las distintas fuentes de MSCs, confirmado mediante las tinciones correspondientes (Figura 5b). En la diferenciación osteoblástica, las células fueron teñidas para evidenciar fosfatasa alcalina, mientras que en la diferenciación condroblástica los glicosaminoglicanos fueron teñidos con azul alciano, y en la diferenciación adipoblástica las vacuolas lipídicas se tiñeron con rojo oleoso.

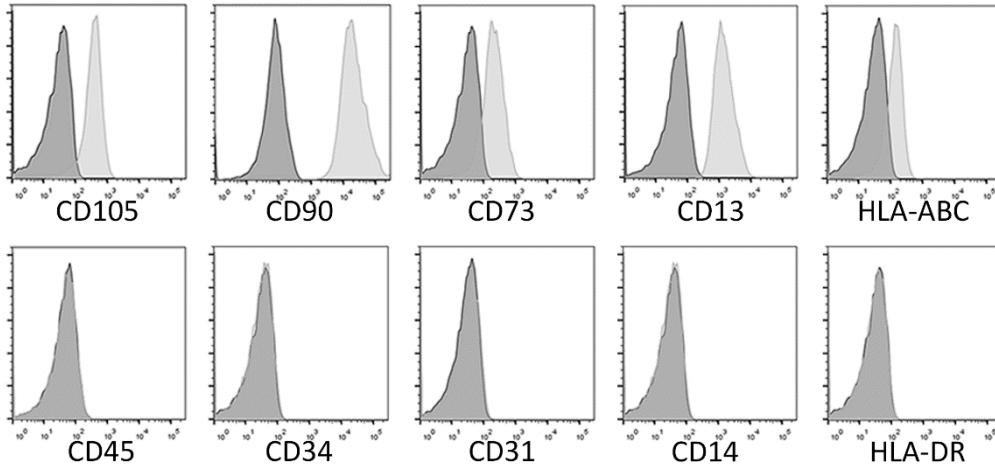
Tabla 1. Inmunofenotipo de PL-MSCs, BM-MSCs y WJ-MSCs.

| Marcador | PL-MSCs (% ± DE) | BM-MSCs (% ± DE) | WJ-MSCs (% ± DE) |
|----------|------------------|------------------|------------------|
| CD105 | 96 ± 3 | 90 ± 13 | 99.8 ± 0.1 |
| CD90 | 72.7 ± 27 | 85 ± 15 | 100 |
| CD73 | 88 ± 9 | 97 ± 3 | 95.5 ± 6.6 |
| CD13 | 98 ± 3 | 98 ± 1 | 97.8 ± 2.7 |
| HLA-ABC | 68 ± 30 | 94 ± 9 | 56.6 ± 32.1 |
| CD45 | 2 ± 3 | 1 ± 1 | 0.1 ± 0.1 |
| CD34 | 0 | 0 | 0.9 ± 0.8 |
| CD31 | 1 ± 1 | 1 ± 1 | 6.6 ± 6.3 |
| CD14 | 1 ± 1 | 2 ± 2 | 0.4 ± 0.3 |
| HLA-DR | 1 ± 1 | 3 ± 3 | 3.6 ± 4.9 |

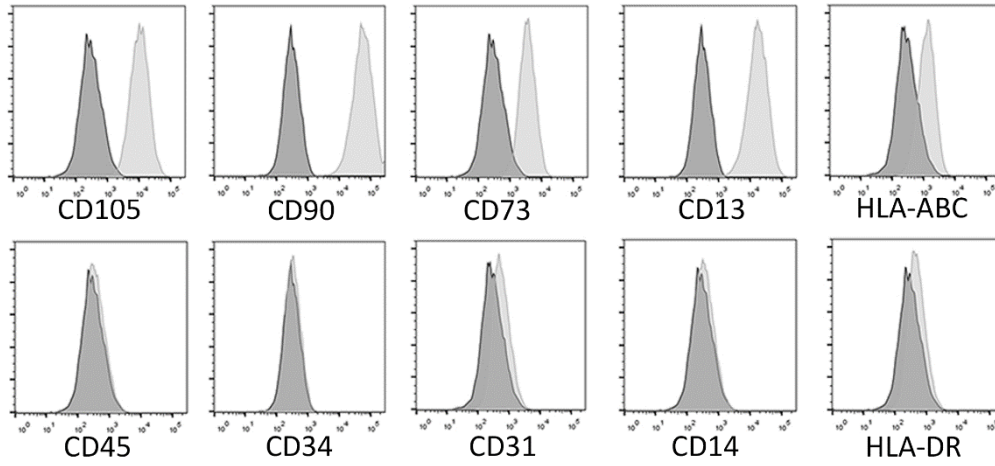
Los resultados están expresados en porcentaje de células positivas. Desviación estándar (DE) de tres experimentos, donde al menos >10,000 eventos por muestra fueron contados (n=3)

a)

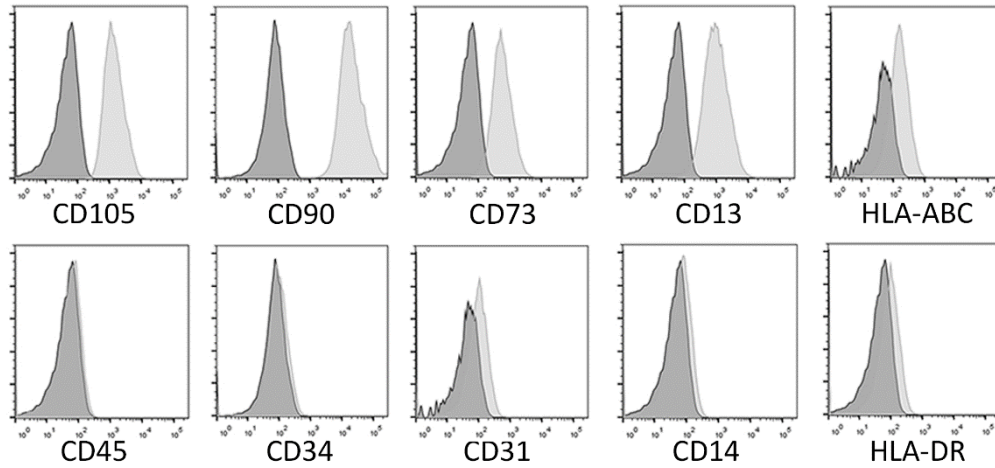
PL-MSCs



BM-MSCs



WJ-MSCs



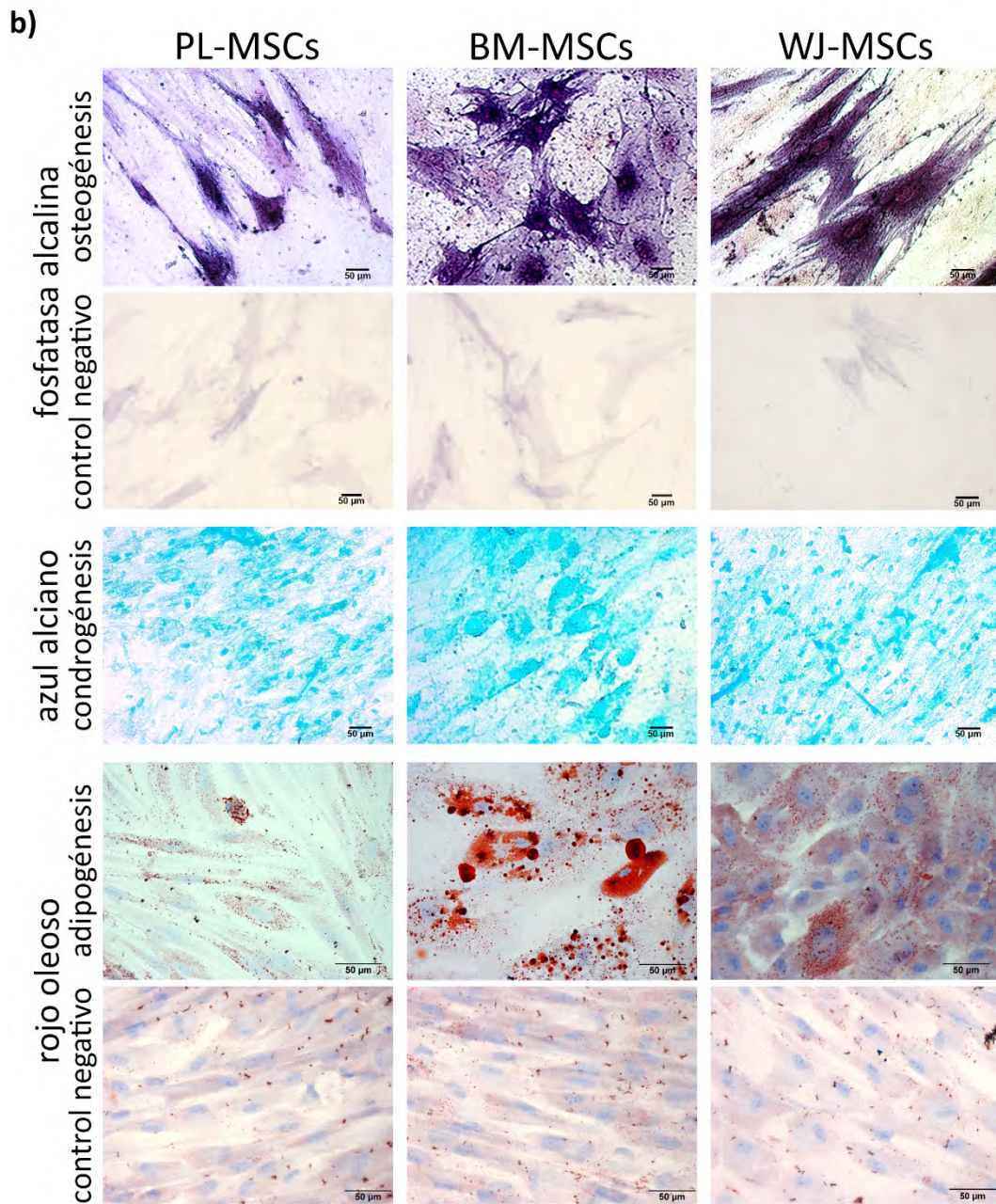


Figura 5. Inmunofenotipo y diferenciación a linajes mesodérmicos de las MSCs. (a) Las células fueron incubadas con anticuerpos marcados para CD105, CD90, CD73, CD13, HLA-ABC, CD45, CD34, CD31, CD13 y HLA-DR, y analizadas mediante citometría de flujo. Se observan las poblaciones control (histogramas coloreados en gris oscuro) y las positivas (histogramas coloreados en gris claro). (b) La diferenciación osteoblástica fue confirmada mediante la tinción de fosfatasa alcalina, los glicosaminoglicanos en la diferenciación condroblástica fueron teñidos con azul alciano, y las vacuolas lipídicas de la diferenciación adipoblástica con rojo oleoso. No se muestran los controles negativos de la condrogénesis debido a que las monocapas de las células indiferenciadas se desprendían antes del término de la inducción, la cual dura 28 días. Se muestra un experimento representativo.

Viabilidad de PL-MSCs, BM-MSCs y WJ-MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina

La viabilidad fue evaluada a través de la tinción LIVE/DEAD [59, 87], encontrando que las MSCs de los tres tejidos mantuvieron alta viabilidad en el hidrogel tras 72 h de cultivo (> 90 %), en un porcentaje similar a la observada en el cultivo control en 2D (~100 %) (Figura 6). Adicionalmente, otros aspectos pueden ser apreciados con este ensayo. En primera, aunque la morfología de las células cultivadas en monocapa tiende a ser en huso, aquellas embebidas en el hidrogel exhibieron una forma redonda o elongada. En segunda, únicamente las PL-MSCs demostraron una alta actividad fibrinolítica, ya que degradaron completamente el hidrogel al 3er o 4to día de cultivo y crecieron en monocapa sobre el sustrato plástico del pocillo (Figura 9). Ambos fenómenos fueron evaluados con mayor detalle.

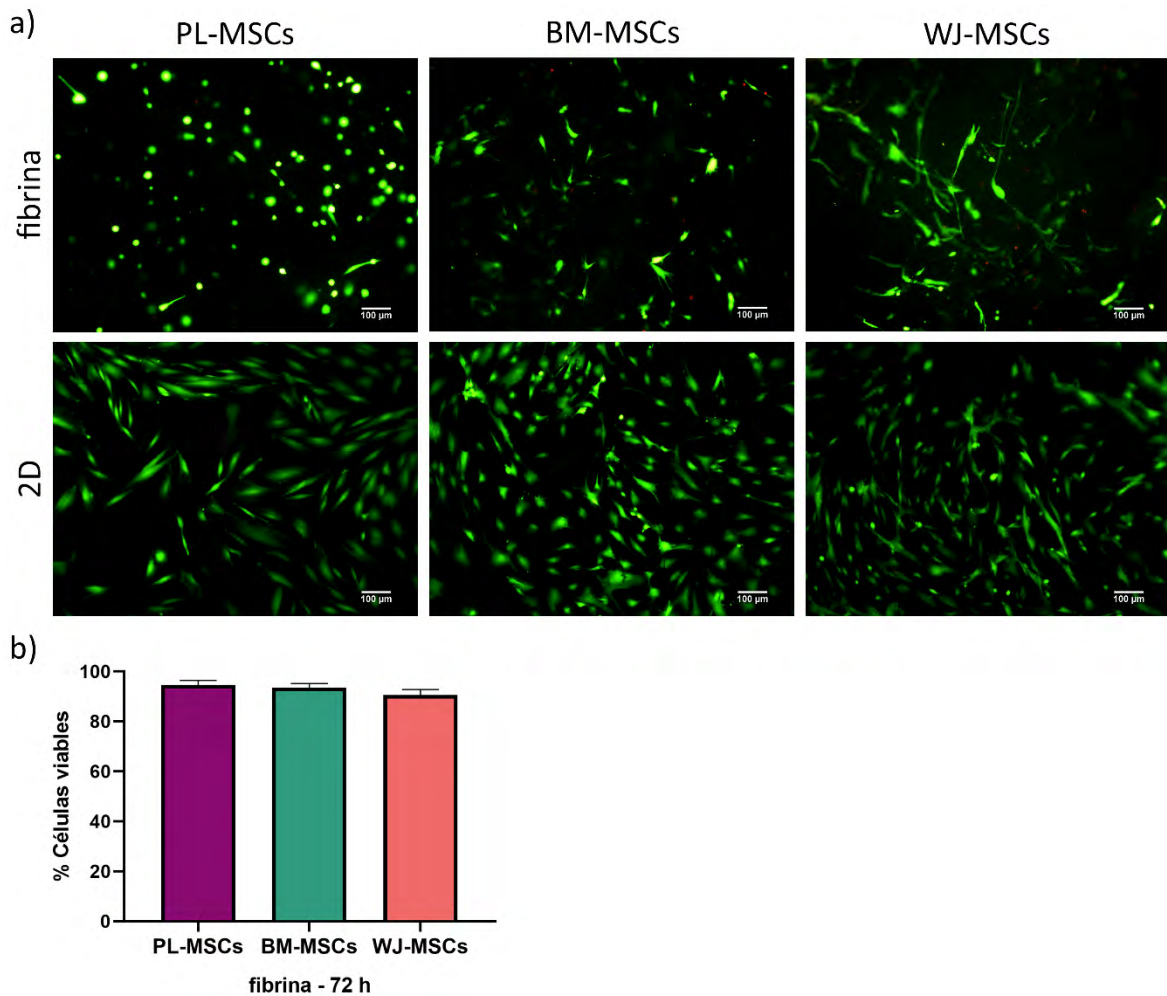


Figura 6. Viabilidad de las MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina y en 2D. (a) Las células fueron teñidas con el kit LIVE/DEAD, observándose las células viables en verde, y las muertas en rojo. Las MSCs provenientes de distintos tejidos mostraron una viabilidad mayor al 90% en hidrogeles de fibrina a 3 días de cultivo, y casi el 100% en 2D sobre cubreobjetos de vidrio. Se muestran imágenes de un experimento representativo tomadas con un microscopio de epifluorescencia. (b) La gráfica muestra los porcentajes de células viables en los hidrogeles de fibrina a 3 días de cultivo. Las barras indican error estándar de la media de tres experimentos. No hubo diferencias significativas entre las MSCs ($p < 0.05$) ($n=3$).

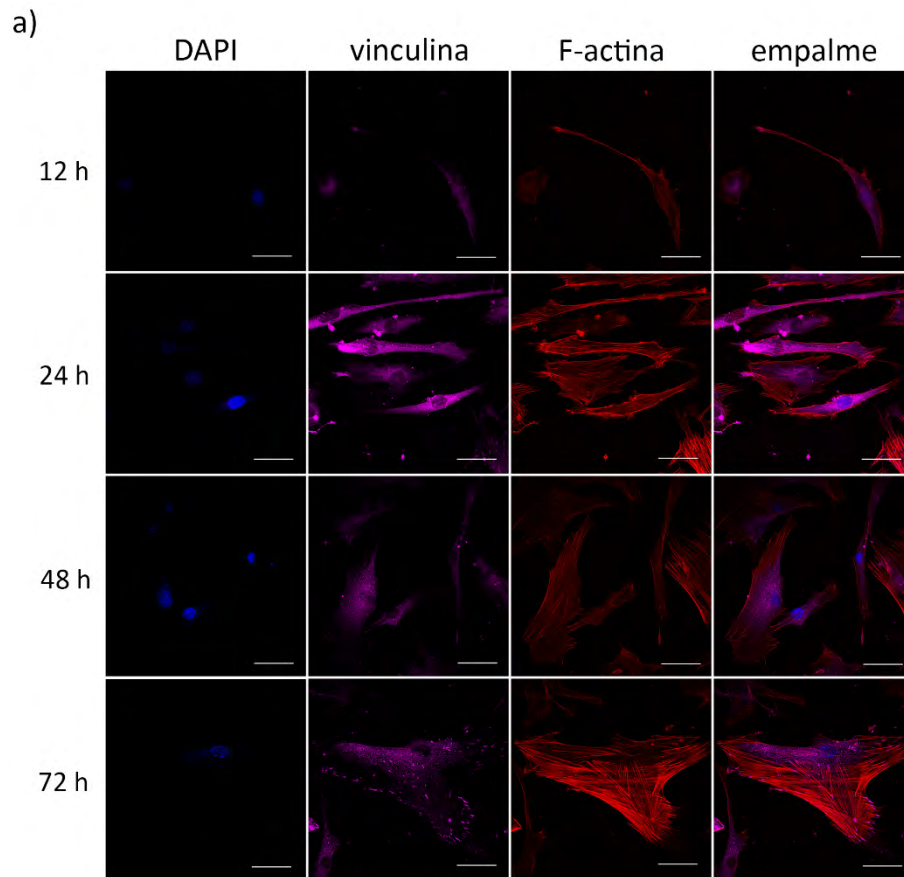
Las PL-MSCs, BM-MSCs y WJ-MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina carecen de la capacidad de formar AFs ricas en vinculina e integrina α V

La capacidad de adhesión de las MSCs en cultivos en 2D y en hidrogeles de fibrina fue evaluada mediante la presencia de vinculina e integrina α V (proteínas de AFs), y la formación de fibras de estrés. Primero se analizó la presencia de vinculina en AFs tras el cultivo sobre cubreobjetos de vidrio por 12, 24, 48 y 72 h, y en hidrogeles de fibrina por 0.5, 24, 48 y 72 h.

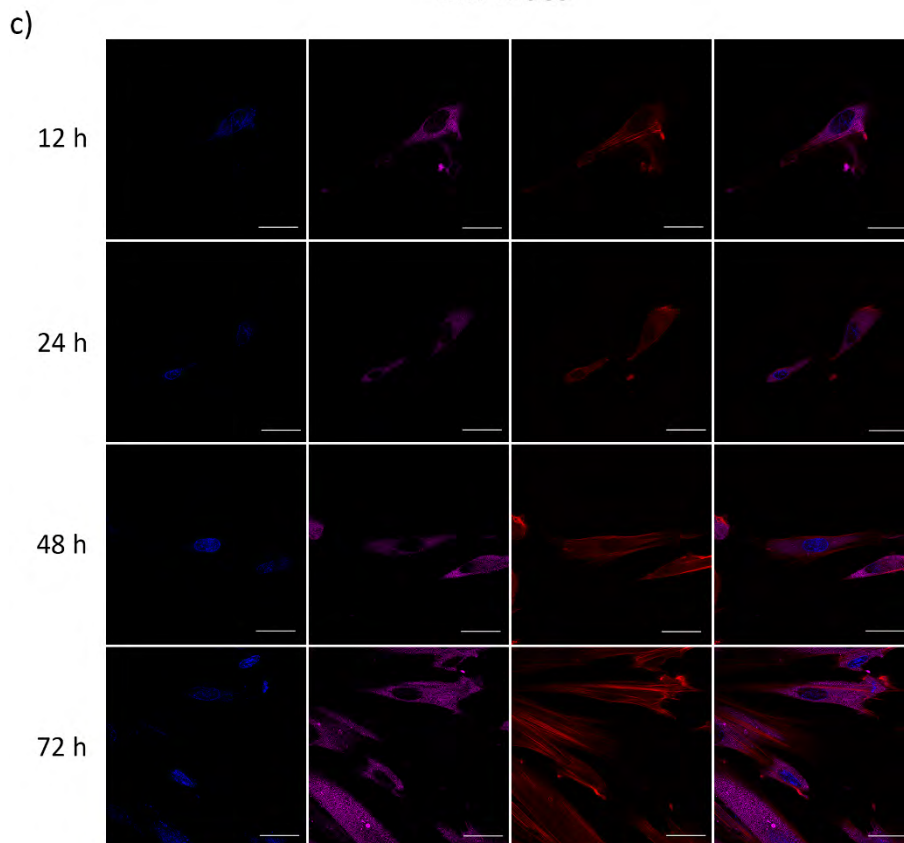
El cultivo en monocapa evidenció adhesión celular desde las 12 h, aunque la elongación y la formación de fibras de estrés fueron más notorias a las 24 h (Figura 7). En cada condición de cultivo, vinculina fue detectada y su presencia en AFs se incrementó conforme al paso del tiempo. Cabe destacar que las BM-MSCs exhibieron fibras de estrés aparentemente más gruesas y largas, y AFs con mayor detección de vinculina en comparación con las MSCs de PL y WJ, en todos los tiempos evaluados.

Como se esperaba, la adhesión de las MSCs en los hidrogeles de fibrina fue diferente respecto de lo observado en los cultivos en 2D. Desde el primer día, las MSCs exhibieron dos formas: redonda o elongada, aunque ambas con F-actina (Figura 8a). Debe considerarse como F-actina porque faloidina identifica únicamente actina en filamentos. La percepción de que se trataba de dos morfologías separadas se hizo más evidente a las 48 h, y sus proporciones variaron entre las MSCs de los tres tejidos. Después de 2 días de cultivo, el 91.12 ± 1.92 % de las PL-MSCs mostraron morfología redonda, lo cual representa aproximadamente 2 y 1.2 veces más que lo encontrado en las MSCs de BM y WJ (44.44 ± 7.74 % y 76.84 ± 0.01 %) respectivamente, con diferencia significativa en comparación con las BM-MSCs ($p=0.0007$) (Figura 8b). Notablemente, las células elongadas en los hidrogeles

de fibrina fueron observadas con menor extensión que las células sembradas sobre cubreobjetos de vidrio, aunque las BM-MSCs tendieron a apreciarse más ramificadas en los hidrogeles de fibrina que PL-MSCs y WJ-MSCs. A pesar de las diferencias entre las células elongadas y redondas de los tres tipos de MSCs, éstas fueron positivas a CD105 sin importar morfología y/o expresión de otros marcadores, como se muestra para WJ-MSCs en la figura 10c. En primera instancia, las células elongadas de BM-MSCs y WJ-MSCs desarrollaron fibras de estrés más gruesas que las PL-MSCs, aunque aparentemente, vinculina no estuvo presente en ninguna de ellas (Figura 8a). En segunda, las células redondas de los tres tipos de MSCs presentaron F-actina en agregados, y vinculina con localización submembranal, y únicamente algunas PL-MSCs exhibieron lamelipodios con detección nula o baja de vinculina (Figuras 8a y 10b). Además, la intensidad de vinculina se incrementó conforme al tiempo de cultivo, y aunque colocalizó parcialmente con actina no hubo formación aparente de AFs. Cabe mencionar que la tenue coloración del núcleo con DAPI en algunas células redondas no es resultado de una falla en la tinción, ya que este reactivo identifica preferentemente heterocromatina. Por tanto, la tenue coloración de DAPI indica menor presencia de cromatina inactiva. Como se mencionó previamente, sólo las PL-MSCs degradaron por completo el hidrogel de fibrina entre el tercer y cuarto día de cultivo (Figura 9a), descendiendo al fondo del pocillo y generando una monocapa. Estas células fueron teñidas para evaluar vinculina y actina, demostrando que seguían siendo capaces de formar fibras de estrés y AFs en cultivos 2D (Figura 9b).



BM-MSCs



PL-MSCs

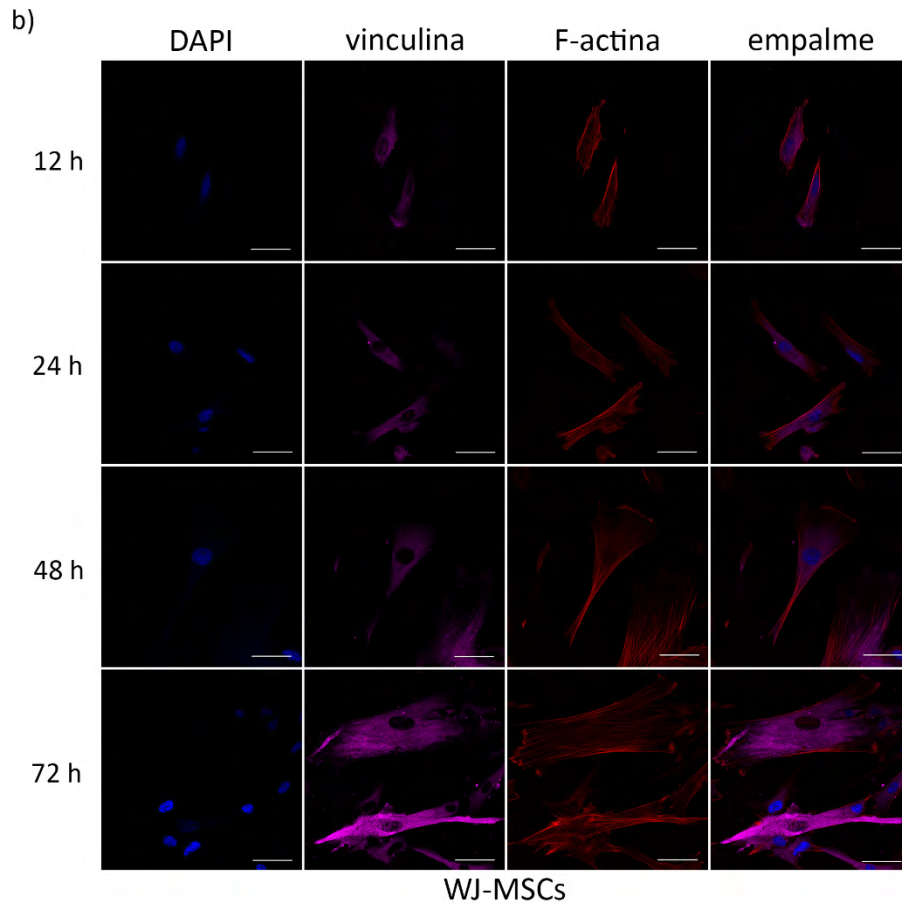
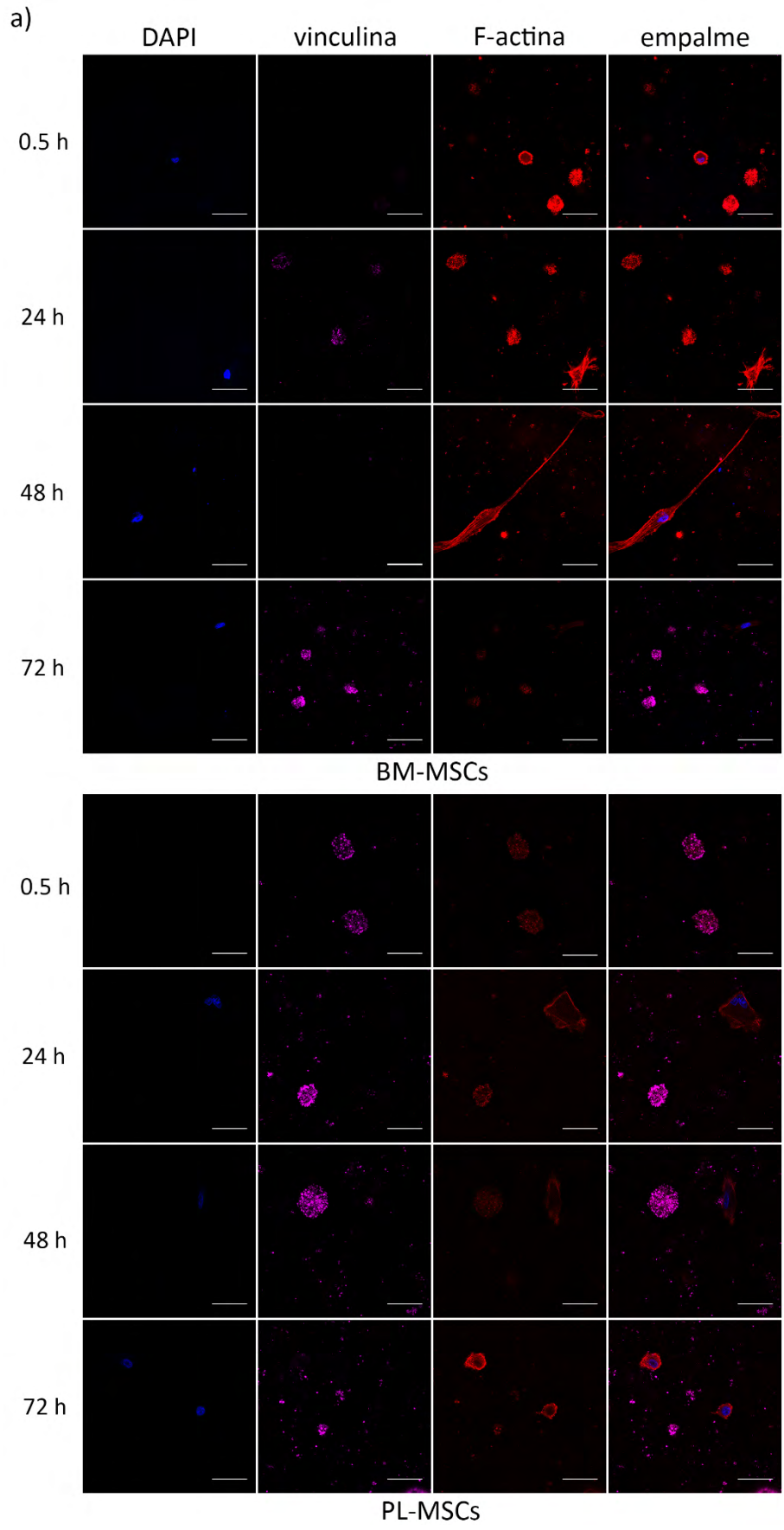


Figura 7. Curso temporal de la distribución de vinculina y actina en MSCs cultivadas en 2D. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio por 12, 24, 48 y 72 h, fijadas y teñidas para identificar núcleos (azul), F-actina (rojo) y vinculina (magenta). Los paneles mostrados corresponden a: (a) BM-MSCs, (b) PL-MSCs, y (c) WJ-MSCs. En cada caso, la detección de vinculina en adhesiones focales se intensificó al incrementarse el tiempo en cultivo. Se muestran micrografías confocales representativas. Las barras representan 50 μm .



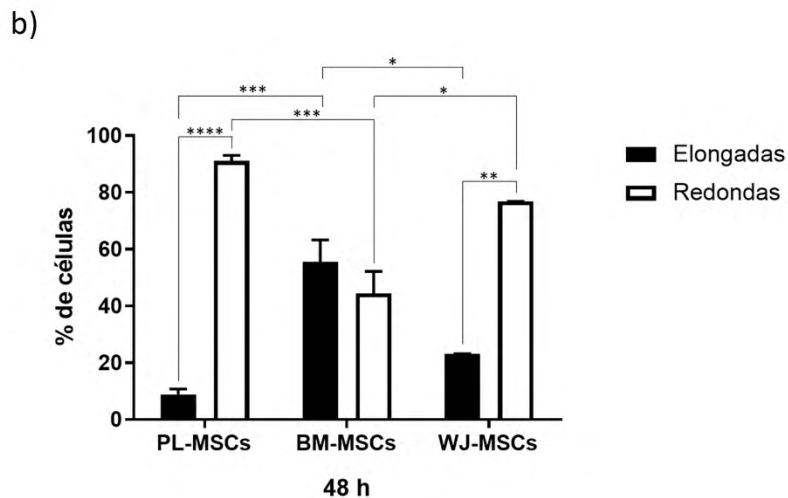
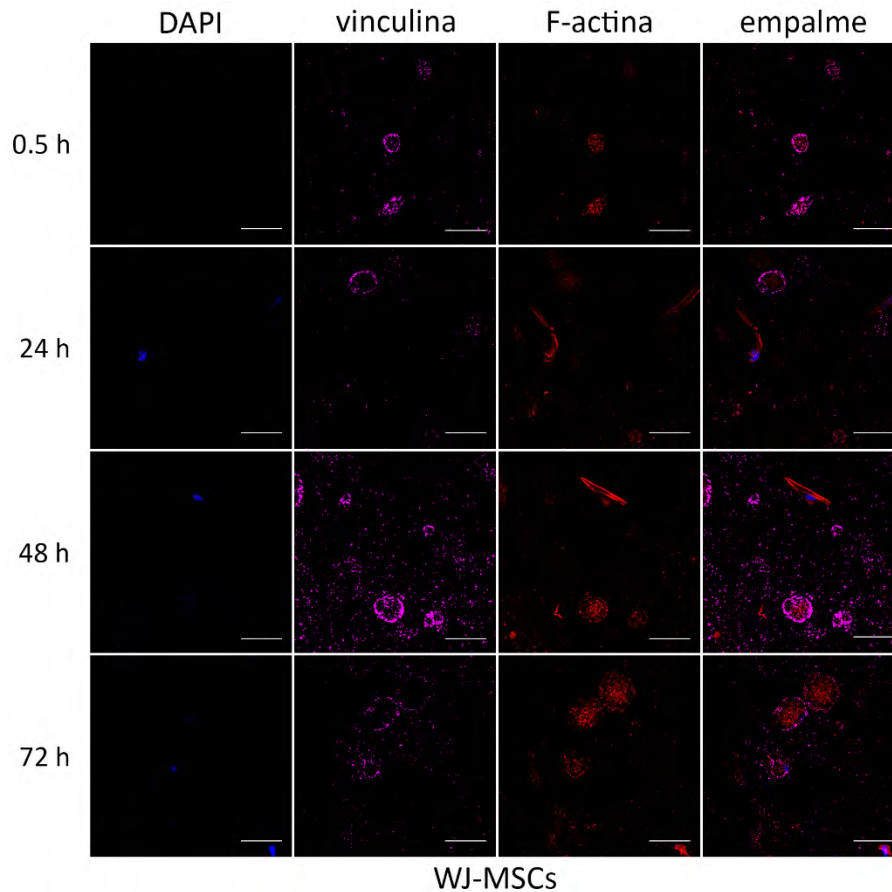


Figura 8. Curso temporal de la distribución de vinculina y actina en MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina. (a) Las células fueron cultivadas en hidrogeles de fibrina por 0.5, 24, 48 y 72 h, fijadas y teñidas para identificar núcleos (azul), F-actina (rojo) y vinculina (magenta). En cada caso, se observan dos fenotipos: células redondas positivas a vinculina, y células elongadas negativas al marcador. Se muestran micrografías confocales representativas. Las barras representan 50 μ m. (b) Gráfica mostrando los porcentajes de células elongadas y redondas en MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina por 48 h. Las barras indican el error estándar de la media de tres experimentos, y 75 células en promedio por muestra fueron contadas (n=3). **** $p < 0.0001$, *** $p = 0.0007$, ** $p = 0.0011$, y * $p = 0.0204$.

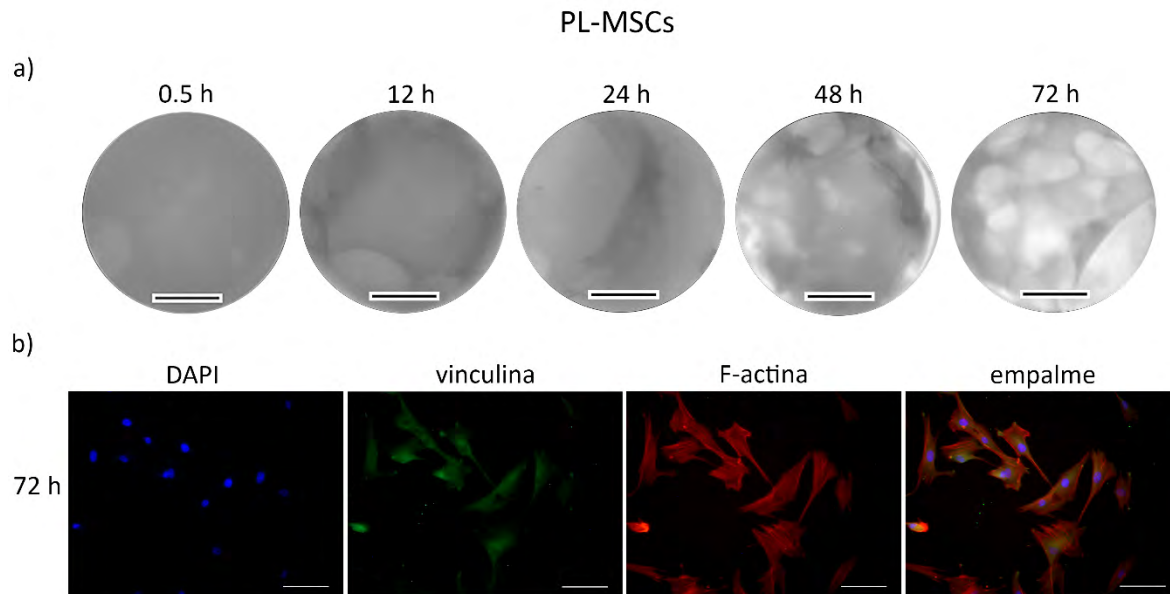


Figura 9. Curso temporal de la degradación de fibrina por PL-MSCs y detección de AFs posterior a la fibrinólisis. (a) Evaluación macroscópica de la fibrinólisis de PL-MSCs en un curso temporal. Notar que las zonas degradadas (áreas más claras) eran más aparentes a las 72 h. Las barras representan 2 mm. (b) Las células fueron cultivadas en hidrogeles de fibrina por 3 días, fijadas y teñidas para identificar núcleos (azul), F-actina (rojo), y vinculina (verde). Las PL-MSCs degradaron a la fibrina y descendieron al fondo del pocillo, donde generaron una monocapa sobre el sustrato plástico. Estas células presentaron fibras de estrés y expresaron vinculina en AFs. Se muestran micrografías de epifluorescencia representativas. Las barras representan 100 μm .

La adhesión de PL-MSCs, BM-MSCs y WJ-MSCs en hidrogeles de fibrina fue independiente de vinculina e integrina αV

Posteriormente, se evaluó la presencia de la integrina αV en las MSCs cultivadas tanto en monocapa como en hidrogeles de fibrina por 2 días. Como se muestra en la Figura 10a, los cultivos de MSCs en 2D expresaron integrina αV en AFs, donde colocalizó con vinculina y actina. En los hidrogeles de fibrina, la integrina αV fue encontrada en algunas células redondas y elongadas de PL-MSCs y BM-MSCs, pero su detección fue nula en casi todas las células de los cultivos de WJ-MSCs (Figuras 10b y 11). En todos los casos, la detección de la integrina αV en AFs fue débil. Como se mencionó previamente, sólo algunas PL-MSCs redondas presentaron lamelipodios, con tinción difusa de vinculina e integrina αV (Figura 10b). Los resultados obtenidos con los ensayos de adhesión sugieren que a diferencia de lo observado en los cultivos de 2D, vinculina e integrina αV son innecesarias para la adhesión de MSCs de PL, BM y WJ en hidrogeles de fibrina.

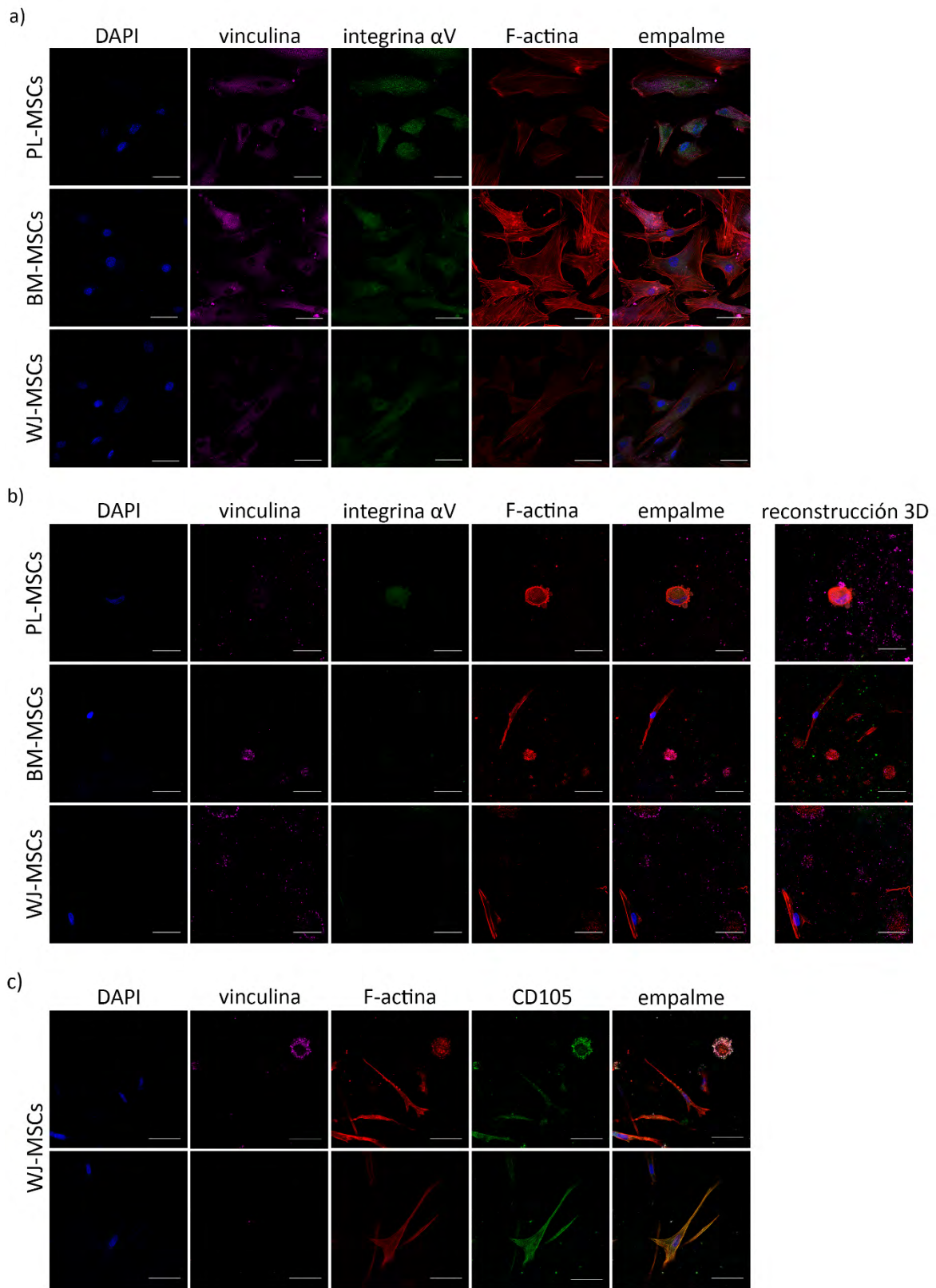


Figura 10. Presencia de integrina αV en MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina y en 2D. (a) Detección de integrina αV en MSCs cultivadas en monocapa por 48 h. Las células fueron fijadas y teñidas para identificar núcleos (azul), F-actina (rojo), vinculina (magenta), e integrina αV (verde). En cada caso, la marca de la integrina αV fue detectada en AFs, donde colocalizó parcialmente con F-actina y vinculina. (b) Detección de integrina αV en MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina por 48 h. Las células fueron fijadas y teñidas para identificar núcleos (azul), F-actina (rojo), vinculina (magenta), e integrina αV (verde). La integrina αV fue detectada en algunas células elongadas y redondas; se muestran las reconstrucciones 3D. (c) Marcador CD105 en WJ-MSCs cultivadas en fibrina. Las células fueron fijadas y teñidas para identificar núcleos (azul), F-actina (rojo), vinculina (magenta), y CD105 (verde). CD105 fue detectada en células elongadas y redondas, lo cual también fue observado en MSCs de PL y BM (datos no mostrados). (a), (b) y (c) Se muestran micrografías confocales representativas. Las barras representan 50 μm .

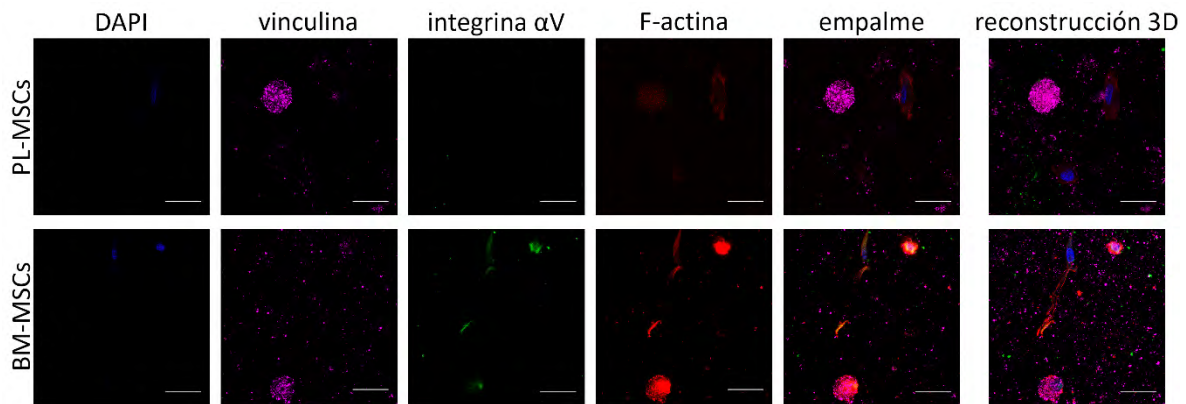


Figura 11. Detección de integrina αV en PL-MSCs y BM-MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina por 48 h. Las células fueron fijadas y teñidas para identificar núcleos (azul), F-actina (rojo), vinculina (magenta), e integrina αV (verde). Notar que en adición a lo observado en la figura 10, integrina αV fue detectada en algunas BM-MSCs y no en PL-MSCs. Se muestran micrografías confocales representativas. Las barras representan 50 μm .

Las PL-MSCs, BM-MSCs y WJ-MSCs poseen la capacidad de degradar el hidrogel de fibrina a diferentes tasas

La actividad fibrinolítica de las MSCs de los tres tejidos cultivadas en hidrogeles de fibrina se evaluó en ausencia y presencia de inhibidores del eje plasminógeno-plasmina y de MMPs. Las MSCs fueron cultivadas por 7 días a una densidad celular baja (1500 células/mL) en presencia o ausencia de aprotinina, ácido tranexámico, BB-94 y sus combinaciones, después de lo cual se realizó el análisis de la degradación (Figura 12b,c). Con la ayuda de un programa de análisis de imágenes, las zonas degradadas de cada hidrogel se seleccionaron y numeraron, y sus áreas fueron calculadas como se describe en métodos (Figura 13). Los porcentajes de las áreas degradadas totales se muestran en la Figura 12c.

En cultivos de dos días y en ausencia de inhibidores, las MSCs de los tres tejidos fueron capaces de generar zonas de lisis, las cuales a los 7 días se reflejaron en porcentajes diferentes de área degradada (Figura 12). En ausencia de inhibidores, las PL-MSCs hidrolizaron al gel casi en su totalidad (90.81 ± 1.88 %) dejando sólo trazas, mientras que las MSCs de BM y WJ generaron lisis limitada (BM-MSCs, 17.72 ± 0.67 %, WJ-MSCs, 22.1 ± 2.58 % $p < 0.0001$), y estas diferencias fueron significativas (Figura 12b,c). Por otro lado, la alta hidrólisis generada por las PL-MSCs no pudo ser disminuida por BB-94, ya que el área degradada fue aproximadamente del 88.04 ± 0.97 %, mientras que ácido tranexámico y aprotinina la redujeron hasta 58.98 ± 6.79 % y 16.19 ± 0.33 %, respectivamente (AT vs. control sin inhibidores, y Ap vs. control sin inhibidores, $p < 0.0001$) (Figura 12c). Por tanto, aprotinina fue el inhibidor más eficiente y BB-94 el menor. Estas observaciones se repitieron con los hidrogeles sembrados con MSCs de BM y WJ, aunque las diferencias con respecto a los hidrogeles sin inhibidores no fueron significativas. Entre las tres combinaciones de

inhibidores empleadas, la que tuvo el efecto más fuerte fue aprotinina/ácido tranexámico (PL-MSCs, 8.69 ± 2.19 %; BM-MSCs, 7.81 ± 0.47 %; WJ-MSCs, 14.44 ± 1.85 %).

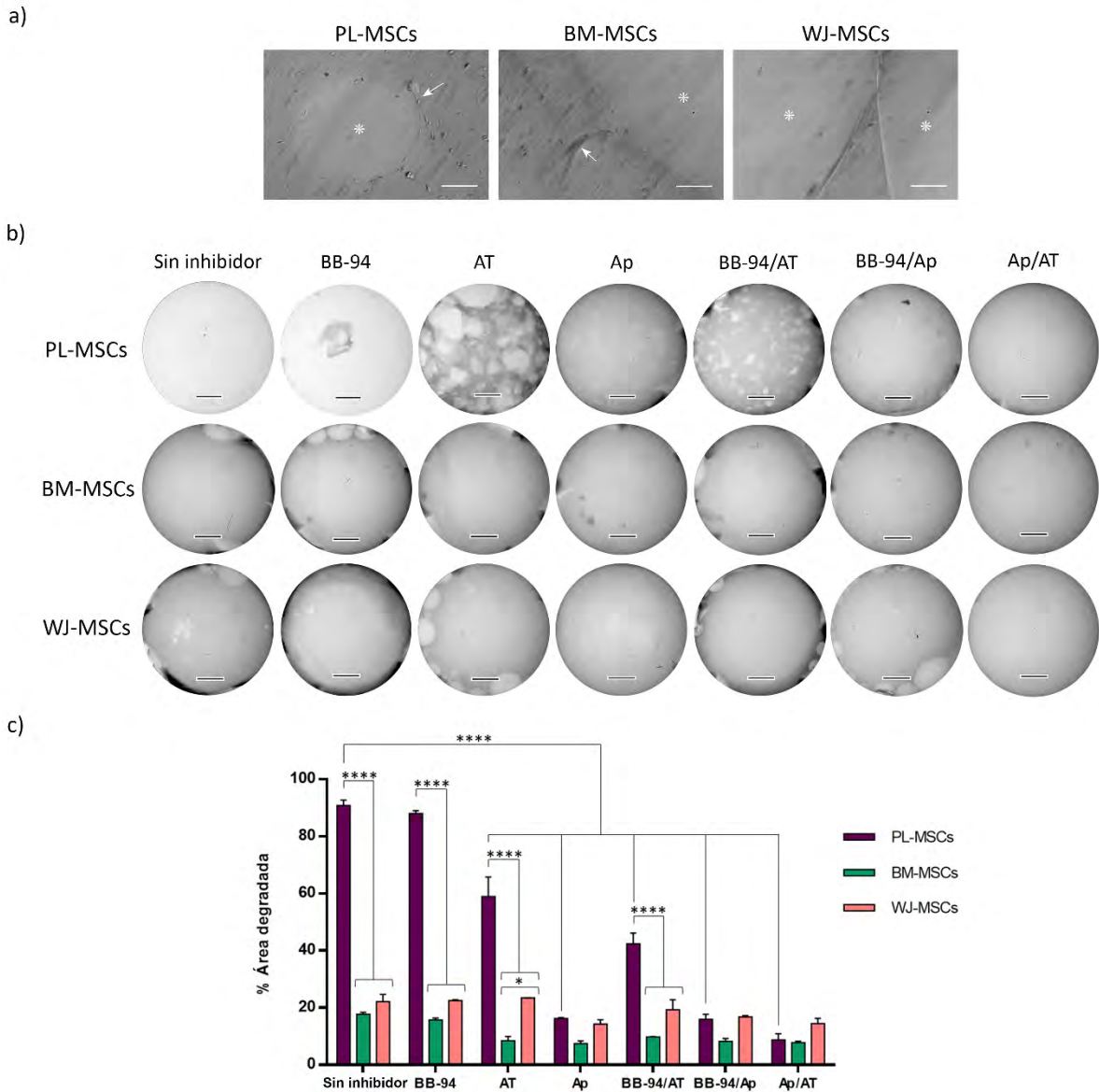


Figura 12. Fibrinólisis generada por las MSCs. (a) Las células sembradas en hidrogeles de fibrina generaron hidrólisis a las 48 h de cultivo. Las imágenes muestran zonas degradadas (*) y células (flechas). Las barras representan 50 μ m. (b) Las células sembradas en hidrogeles de fibrina en presencia o ausencia de los inhibidores aprotinina (200 μ g/mL), ácido tranexámico (400 μ g/mL), BB-94 (5 μ M) y sus combinaciones, produjeron distintos niveles de hidrólisis a los 7 días de cultivo. Las barras representan 3 mm. (c) Semi cuantificación del área total de las zonas degradadas por las MSCs en presencia o ausencia de los inhibidores. Las barras indican error estándar de dos experimentos (n=2). **** p<0.0001 y * p=0.0104. AT, ácido tranexámico; Ap, aprotinina; BB-94, batimastat.

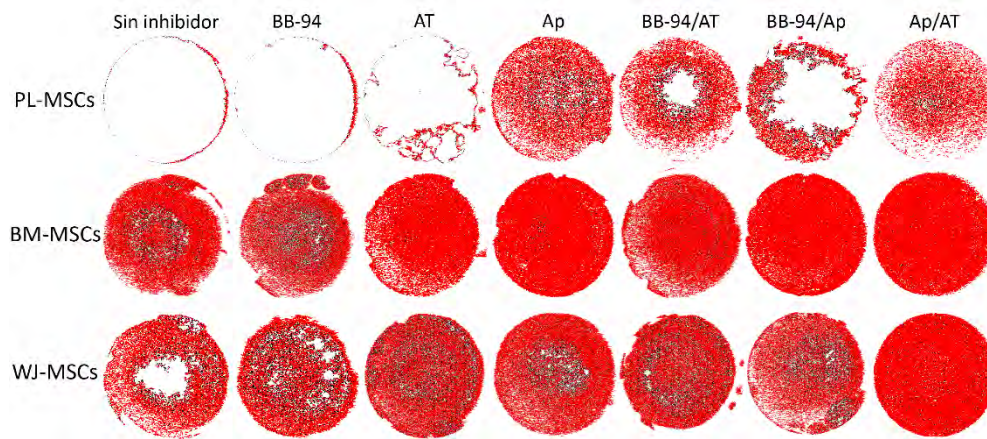


Figura 13. Contornos de las zonas degradadas en los hidrogel de fibrina. El área degradada total obtenida en el ensayo de fibrinólisis fue cuantificada mediante la herramienta “análisis de partículas” del programa Fiji-ImageJ 1.51h empleando imágenes panorámicas (8x). Las líneas negras delimitan las zonas lisadas, mientras que los puntos rojos representan los números respectivos que identifican a estas zonas. AT, ácido tranexámico; Ap, aprotinina; BB-94, batimastat.

Finalmente, la degradación generada por las MSCs de WJ y PL (1500 células/mL) fue analizada a 2, 4 y 12 días mediante fotomicrografías obtenidas con microscopio invertido. Al final del cultivo se aprecia que: 1) a diferencia de las PL-MSCs, las WJ-MSCs producen lisis limitada, 2) las WJ-MSCs exhiben morfología redonda o elongada, y 3) las zonas líticas se observan alrededor de ambos morfotipos (Figura 14). Con este experimento se reafirma la idea de que la fibrinólisis es una característica predominante en las PL-MSCs.

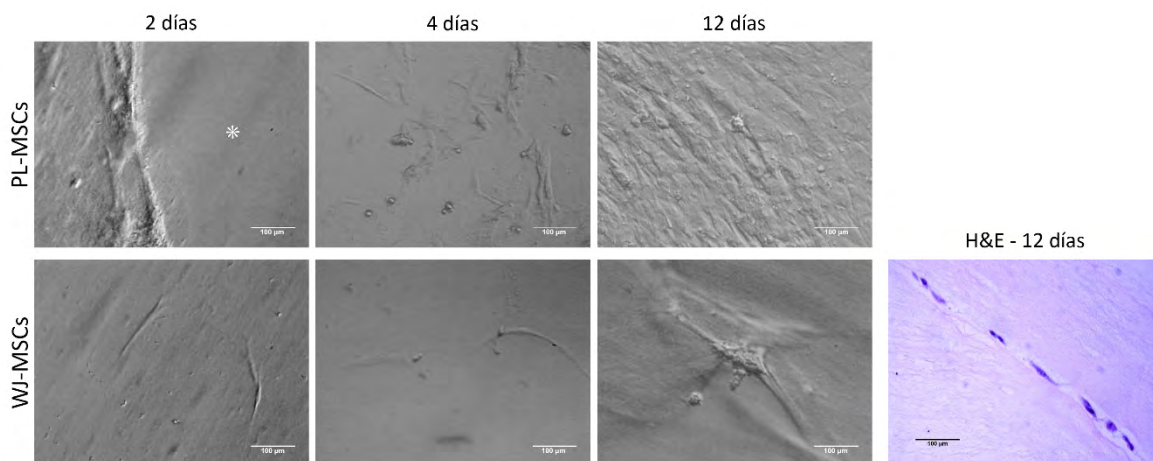


Figura 14. Curso temporal de la degradación del hidrogel de fibrina por PL-MSCs y WJ-MSCs. Se cultivaron MSCs de PL y WJ en hidrogel de fibrina por 2, 4 y 12 días. Las PL-MSCs degradaron el hidrogel en su totalidad y generaron una monocapa que a los 12 días alcanzó más del 100 % de confluencia, mientras que las WJ-MSCs continuaban embebidas en el hidrogel. El * identifica una zona degradada. n=1

DISCUSIÓN

En el 2006, la ISCT estableció los criterios mínimos para la identidad de MSCs, principalmente para BM-MSCs [6]. Acorde a éstos, las MSCs deben presentar adhesión al sustrato plástico en condiciones de cultivo estándar, diferenciación a linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, y exhibir el inmunofenotipo CD105+, CD90+, CD73+, CD13+, HLA-ABC+, CD45-, CD34-, CD31-, CD14- y HLA-DR-. Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que pueden poseer otras características, incluyendo plasticidad celular, capacidad de soporte hematopoyético, propiedades inmunorreguladoras y capacidad de modulación de la reparación de tejidos [7, 9]. A la par, las MSCs se han aislado de otros tejidos, entre ellos, PL, cordón umbilical, AT, y DP, aunque BM sigue siendo considerada el estándar de oro para los criterios que deben cumplir las MSCs. A pesar de que la investigación en IT y MR se ha realizado principalmente con BM-MSCs, hay un alto potencial de considerar otras fuentes debido a la accesibilidad para su aislamiento.

Algunos estudios han planteado que MSCs aisladas de diversos tejidos pueden comportarse de forma diferente en contextos específicos [13, 14, 39], y esto es importante si se tiene la intención de emplearlas en terapia celular. Un ejemplo es que las BM-MSCs inducen la generación de un mayor volumen de hueso reparado que las AT-MSCs después de su trasplante *in situ* en un modelo murino de defecto crítico de calvarias [88]. La finalidad de este trabajo fue esclarecer la influencia del tejido de aislamiento en la interacción de las MSCs con su microambiente, comparando viabilidad, adhesión y actividad fibrinolítica de PL-MSCs, BM-MSCs, y WJ-MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina preparados con plasma no purificado. Los resultados obtenidos nos permitieron conocer más acerca de su comportamiento en un microambiente fisiológico, y ésta es la primera vez que la adhesión

y la actividad fibrinolítica de MSCs provenientes de tres diferentes tejidos son comparadas en hidrogeles de fibrina.

Las MSCs de PL, BM, y WJ estudiadas compartieron el inmunofenotipo esperado y la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia linajes mesodérmicos, así como de adherirse al sustrato plástico. Por otro lado, las MSCs presentaron diferencias en la adhesión y la actividad fibrinolítica en el hidrogel con respecto al tejido de aislamiento, mismas que serán discutidas por separado. Las MSCs, al igual que otras células adherentes, requieren de la adhesión a un sustrato para sobrevivir y elongarse. Por tanto, las morfologías adoptadas por las MSCs en el hidrogel de fibrina, y en los cultivos control en 2D, están relacionadas con la adhesión celular. Como era de esperarse, las MSCs de PL, WJ y BM presentaron una capacidad similar para formar fibras de estrés y AFs positivas a vinculina e integrina αV en cultivos 2D. En contraste, aquellas cultivadas en los hidrogeles de fibrina exhibieron morfología elongada o redonda con adhesión independiente de AFs positivas a vinculina e integrina αV . La ausencia de ambas proteínas en AFs concuerda en parte con lo reportado antes, ya que la composición de las AFs en cultivos 3D varía entre diferentes sustratos [62]. Por ejemplo, la detección de vinculina en BM-MSCs elongadas ha sido baja o nula en andamios laxos o blandos, como los hidrogeles de colágena o matrigel [42, 60], y algo similar sucede con talina y paxilina [42]. La falta de rigidez de los hidrogeles de fibrina podría explicar que las células se elonguen sin expresar vinculina, ya que se ha reportado una fuerza mecánica pobre para hidrogeles preparados con fibrinógeno purificado (< 1 kPa) [44]. Aunque no se ha evaluado la presencia de AFs en MSCs cultivadas en fibrina, sí se ha reportado para una población estromal similar, los fibroblastos dérmicos. En este caso, nuestros resultados contrastan con los obtenidos por Hakkinen y cols. (2011), quienes

observaron AFs positivas a vinculina en fibroblastos cultivados en hidrogeles de fibrina (fibrinógeno purificado), y en otras matrices [62]. Cabe destacar que los fibroblastos dérmicos que ellos emplearon podrían comportarse de un modo diferente a las MSCs en un mismo microambiente, y que el hidrogel de fibrina que usaron y el nuestro representan dos andamios distintos. Por ejemplo, las fibras formadas en los hidrogeles preparados con plasma no purificado poseen mayor grosor y laxitud que las encontradas en hidrogeles de fibrinógeno purificado [71]. Asimismo, la rigidez de nuestro hidrogel también depende de la fibrinólisis realizada por las MSCs, especialmente por PL-MSCs, lo cual será discutido más adelante. Debe de considerarse que la falta de detección de vinculina y la integrina αV no descarta la existencia de AFs, ya que otras proteínas como paxilina, talina y la integrina $\alpha 5\beta 1$ podrían estar presentes, aspecto que requiere de más investigación. También es posible que las células interactúen con el andamio a través de otro mecanismo de adhesión, como el reconocimiento de háptidos [89].

Las células redondas encontradas en nuestro sistema ya han sido reportadas anteriormente para MSCs indiferenciadas. Ho y cols. (2006) publicaron que BM-MSCs cultivadas en hidrogeles de fibrina preparados con altas concentraciones de fibrinógeno adoptaron una morfología redonda, aunque no estudiaron la presencia de proteínas de AFs [59]. Asimismo, la inestabilidad del citoesqueleto en MSCs ha sido asociada con la adipogénesis y la condrogénesis [53, 57, 63]. Específicamente, el fenotipo de las células redondas cultivadas en el hidrogel de fibrina coincide con lo reportado para BM-MSCs durante la condrogénesis *in vitro* [69]. En ese trabajo, y tras el cultivo en hidrogeles de agarosa en presencia de un medio inductor, las MSCs adquirieron morfología redonda y marcas difusas de las proteínas vinculina, actina, vimentina y tubulina [69]. Ya que la agarosa carece de sitios RGD, los

autores sugieren que las MSCs no pueden adherirse al hidrogel, por lo que no se elongan y generan su matriz pericelular, rica en colágena y proteoglicanos. Asimismo, la condrogénesis de BM-MSCs en hidrogeles de agarosa se ha inhibido a través de la adhesión RGD-integrina, dependiente de la organización del citoesqueleto [61]. Cabe mencionar que se ha demostrado que los hidrogeles de fibrinógeno no purificado favorecen el mantenimiento *in vitro* del fenotipo de los condrocitos [90]. Por lo anterior, las células redondas encontradas en el presente estudio podrían utilizarse posteriormente para una diferenciación condrogénica bajo el estímulo químico adecuado, lo que requiere de más estudio. Considerando que las PL-MSCs también presentaron algunas células redondas que no cumplen con el fenotipo condrogénico anteriormente descrito (formación de lamelipodios), se reafirma la idea de que la fuente de MSCs afecta la interacción con el hidrogel de fibrina.

La variación en los porcentajes de células redondas y elongadas entre las MSCs provenientes de distintos tejidos podría reflejar el tipo de actividad que están desempeñando en el hidrogel. Puede sugerirse que las células sembradas en los hidrogeles de fibrina se adhieren, remodelan las fibras, generan fuerzas de tracción y se elongan [43, 45], mientras que aquellas que no pueden hacerlo se mantienen redondas, aunque sí interactúan con el andamio. Asimismo, las tasas de degradación de las MSCs de BM y WJ son muy bajas, lo que permite que algunas células se adhieran y elonguen. Por otro lado, la alta fibrinólisis generada por las PL-MSCs provoca la distensión del hidrogel y limita los sitios de adhesión disponibles, lo que posiblemente favorezca una elongación celular restringida y el mantenimiento de la morfología redonda en la mayoría de las células. La importancia de la presencia de estos fenotipos radica en el destino final que las células podrían adquirir.

Por ejemplo, Khetan y cols. (2013) demostraron que la degradación de un hidrogel de ácido hialurónico y la posterior generación de fuerzas de tracción por BM-MSCs fue necesaria para su diferenciación a un linaje osteogénico [63]. Por el contrario, la imposibilidad de hidrolizar el gel derivó en una diferenciación adipogénica [63].

En este trabajo, las MSCs de BM, PL y WJ hidrolizaron a la fibrina a diferentes tasas, y esta actividad fue inhibida de forma más eficiente en cada caso por la combinación de aprotinina y ácido tranexámico. Esto podría ser resultado de la expresión y actividad diferencial de enzimas fibrinolíticas y sus reguladores involucrados, lo que coincide en parte con la literatura. La fibrinólisis ha sido demostrada para MSCs de BM y AT, pero no para WJ y PL [33, 34, 81, 91]. En esos reportes se encontró que las BM-MSCs no expresan plasmina [34], la principal enzima fibrinolítica *in vivo*, pero al menos, las MSCs de BM y AT sí expresan a sus activadores tPA y uPA, y su inhibidor PAI-1 [33, 34, 81, 91]. Asimismo, se ha observado una disminución importante de la fibrinólisis de BM-MSCs en presencia de PAI-1 y aprotinina [33]. Por otro lado, se ha reportado que la expresión basal alta de PAI-1, y baja de las catepsinas B y D en WJ-MSCs disminuye su capacidad para migrar a través de matrigel, de forma contraria a lo que sucede con las MSCs de PL y BM [39]. Aunque la composición de la fibrina difiere de la del matrigel, la expresión de PAI-1 fue directamente responsable de la capacidad migratoria disminuida de las MSCs, lo cual está relacionado indirectamente con una menor degradación del hidrogel. Además de plasmina, las enzimas MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-13, MT1-MMP, MT2-MMP y MT3-MMP también degradan a la fibrina [73], y son secretadas por las MSCs de BM, AT y músculo traumatizado (TM) [75].

BB-94 es un inhibidor general de MMPs, mientras que aprotinina y ácido tranexámico inhiben al eje plasminógeno-plasmina. De manera específica, el ácido tranexámico es un análogo de la lisina que se une a los sitios de unión del plasminógeno/plasmina a la fibrina, en tanto que la aprotinina inhibe a la plasmina y a otras proteasas de serina. Ya que BB-94 fue el inhibidor menos eficiente de la fibrinólisis, podría sugerirse que las MMPs tienen un efecto mínimo o nulo y que el eje plasminógeno-plasmina es el principal responsable del proceso en este modelo en particular. Considerando que la aprotinina disminuyó la fibrinólisis más que el ácido tranexámico, entonces es posible que otras enzimas además de plasmina estén participando. En este trabajo, la tasa fibrinolítica diferencial de MSCs obtenidas de distintas fuentes podría ser consecuencia de la regulación diferencial del eje plasminógeno-plasmina y de la expresión de otras enzimas fibrinolíticas, como MMPs y las catepsinas B y D, lo cual debe ser investigado con más detalle.

El plasma sanguíneo contiene proteínas diversas, incluyendo: factores de coagulación, proteínas del complemento, citocinas, lipoproteínas, albúmina, hemoglobina, fibronectina y factores de crecimiento, como PDGF [92, 93]. En contraste con los hidrogeles preparados con fibrinógeno, el plasma no purificado podría contener varias de estas proteínas. Aunque se desconoce qué factores de crecimiento o citocinas inducen los fenotipos observados en el presente estudio, PDGF podría tener un papel en la fibrinólisis. Se ha reportado que las AT-MSCs terapéuticamente no efectivas obtenidas de pacientes diabéticos presentaron disminución en su proliferación, migración y desplazamiento al lecho de la herida, además de un incremento general en el fenotipo profibrótico, todos restituidos tras la exposición a PDGF-BB [91]. Específicamente, PDGF-BB incrementó la actividad fibrinolítica de AT-MSCs aisladas de pacientes diabéticos y donadores sanos, observándose menor sensibilidad al

tratamiento en las células provenientes de los pacientes [91]. Sin embargo, esto debe ser confirmado en MSCs de otros tejidos, como los utilizados en este trabajo.

Aunque se desconoce porqué las MSCs de diferentes tejidos cultivadas en hidrogeles de fibrina muestran variaciones en morfología, adhesión y tasas de fibrinólisis, esto podría tener implicaciones terapéuticas. Por un lado, las células redondas con el citoesqueleto inestable sin formación de lamelipodios tuvieron un fenotipo similar al observado en MSCs inducidas a condrogénesis [69, 79], y éstas fueron más prevalentes en WJ-MSCs. Por otro, BM-MSCs deficientes en remodelación de fibrina (MSCs $PTX3^{-/-}$) presentaron una implantación disminuida en el lecho de heridas cutáneas, y por tanto un retraso en la reparación de éstas [33]. Ya que poseen la actividad fibrinolítica más robusta, las PL-MSCs podrían ser buenas candidatas para la terapia de heridas cutáneas. Adicionalmente, se ha reportado que el autotrasplante de AT-MSCs, que presentan defectos en su actividad fibrinolítica, favorece el desarrollo de microtrombosis distales en pacientes diabéticos [81]. Por otro lado, se debe considerar que *in vivo* las WJ-MSCs se encuentran incluidas en un tejido conjuntivo fetal rodeando y protegiendo a los vasos sanguíneos del cordón umbilical, mientras que las MSCs de BM y PL soportan la hematopoyesis y la vasculogénesis [94]. Las diferencias en sus papeles fisiológicos pueden estar relacionadas con su comportamiento en este trabajo, aunque su participación en la trombosis o fibrinólisis *in vivo* no ha sido estudiada [95, 96].

En conjunto, nuestros resultados mostraron que las MSCs de PL, BM y WJ compartieron las características establecidas que acreditan su identidad como MSCs, que formaron AFs ricas en vinculina e integrina αV en cultivos en 2D, y que su comportamiento fue diferente al ser cultivadas en hidrogeles de fibrina de plasma no purificado. Al parecer, la elongación celular

fue un evento independiente de vinculina, y no está claro si esta proteína está participando en la adhesión de células redondas, aunque no requirieron de la presencia de integrina αV . Además, las PL-MSCs degradaron el hidrogel de fibrina más que las MSCs de BM y WJ. Esta es la primera vez que se reporta la comparación de la adhesión y la fibrinólisis para MSCs de tres distintas fuentes, y las diferencias observadas son notables. La desregulación del sistema fibrinolítico de las MSCs podría originar una trombosis o una hemorragia tras el trasplante. Como tema de futuros estudios, queda por determinar si existe alguna relación entre los fenotipos desplegados por las MSCs en un ambiente natural con comportamientos específicos que puedan ser dirigidos a la ingeniería de tejidos de cartílago y hueso, o a la reparación de heridas crónicas cutáneas de acuerdo con su tejido de obtención.

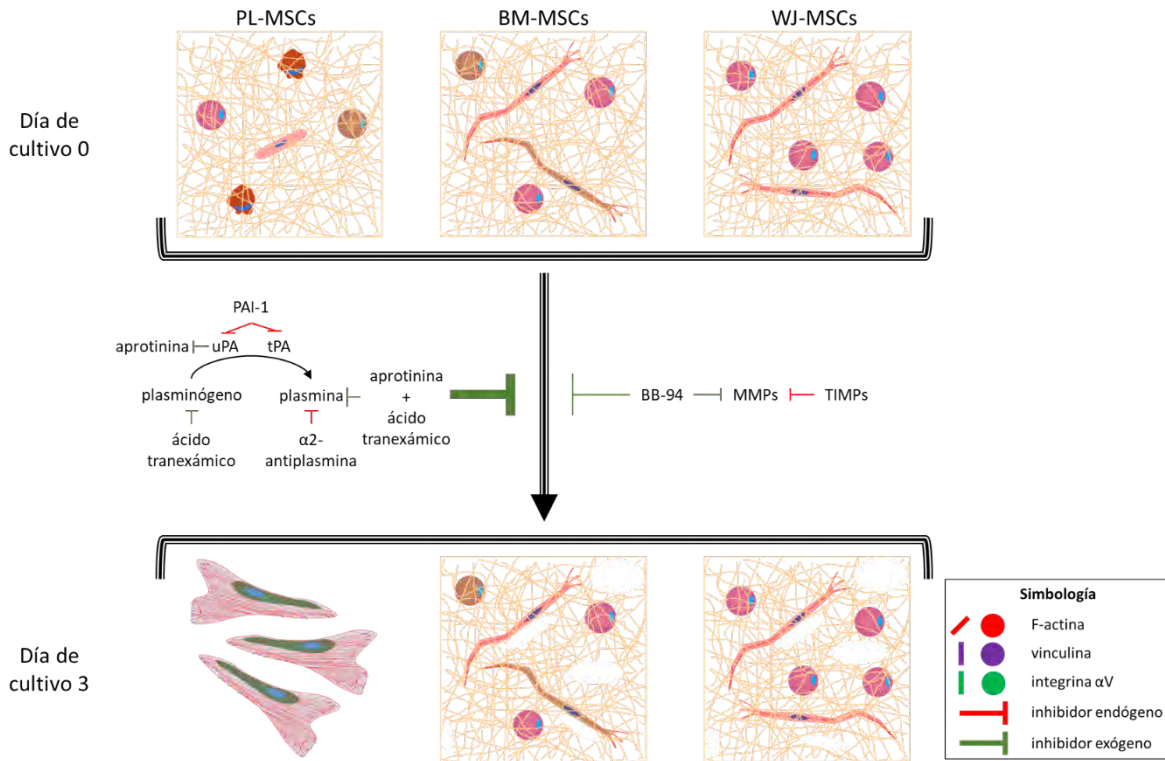


Figura 15. Adhesión de las MSCs en hidrogeles de fibrina y su efecto fibrinolítico. Las MSCs de los tres tejidos cultivadas en los hidrogeles de fibrina exhibieron fenotipos elongado y redondo, con actina en filamentos o agregados, respectivamente. Vinculina e integrina αV fueron innecesarias para la adhesión, ya que estuvieron ausentes en AFs y solo algunas células fueron positivas a ambas proteínas. Por otro lado, las proporciones de células elongadas y redondas variaron entre los tres tipos de MSCs de acuerdo con sus capacidades para degradar el hidrogel de fibrina. Así, las PL-MSCs fueron redondas en $>90\%$, degradaron el hidrogel en su totalidad y generaron una monocapa con AFs ricas en vinculina (Figura 9), y que posiblemente serían positivas a la integrina αV (como se observó en los cultivos en 2D, Figura 10a). Las BM-MSCs y WJ-MSCs degradaron el hidrogel de fibrina de forma limitada, y después de tres días continuaban embebidas. En todos los casos, aprotinina y ácido tranexámico inhibieron la fibrinólisis más que BB-94, lo que indica que la fibrinólisis fue realizada principalmente vía el eje plasminógeno-plasmina. uPA, activador del plasminógeno tipo uracilo; tPA, activador del plasminógeno tisular; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno 1; MMPs, metaloproteasas; TIMPs, inhibidores tisulares de metaloproteasas.

CONCLUSIONES

Las MSCs provenientes de PL, BM y WJ compartieron características similares en cuanto a inmunofenotipo, capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos, y adherencia a sustrato plástico en condiciones de cultivo estándar, lo que acredita su identidad. Asimismo, las MSCs presentaron morfología en huso y adhesión dependiente de AFs positivas a vinculina e integrina αV , como era de esperarse para un cultivo en 2D. En contraste, las MSCs cultivadas en los hidrogeles de fibrina exhibieron adhesión independiente de vinculina e integrina αV , y diferentes proporciones de morfologías celulares redonda y elongada. Las BM-MSCs presentaron la proporción más alta de células elongadas (~50 %), y las PL-MSCs, la menor (<10 %). Por otro lado, las MSCs generaron fibrinólisis dependiente del eje plasminógeno-plasmina, aunque a diferente tasa. De forma inusitada, las PL-MSCs degradaron completamente al hidrogel, mientras que las MSCs de BM y WJ sólo produjeron algunas zonas de lisis. La capacidad de adhesión en el hidrogel de fibrina y la actividad fibrinolítica se encuentran relacionadas, y representan la interacción entre las MSCs y un microambiente 3D parecido al fisiológico durante la reparación de cualquier tipo de herida. Las MSCs de BM y WJ mostraron un fenotipo que les permitiría remodelar a la fibrina, y posiblemente, ser diferenciadas hacia un linaje condrogénico u osteogénico bajo un estímulo químico adecuado, mientras que la alta hidrólisis generada por PL-MSCs imposibilita su elongación, y permanencia en la fibrina por más de 4 días. En conjunto, estos resultados indican que el tejido de aislamiento influye en su comportamiento, lo cual es necesario de tomar en consideración al momento de incluirlas en terapias celulares, y de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

PERSPECTIVAS

- Evaluar en MSCs aisladas de PL, BM y WJ cultivadas en hidrogeles de fibrina:
 - la presencia de otras proteínas de AFs (ej. paxilina, talina, FAK);
 - la composición del secretoma;
 - y la influencia de la inhibición de la fibrinólisis en la adhesión y capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos
- Comparar la capacidad de reparación de las MSCs de PL, BM y WJ en un modelo animal de herida cutánea.
- Construir un andamio de fibrina no purificada con otro polímero que mejore las capacidades mecánicas del andamio con el fin de que pueda ser empleado en la reparación de heridas.

LITERATURA CITADA

1. Marín-Llera, J. and J. Chimal-Monroy, *Capítulo 1 Conceptos básicos de la biología de células troncales*, in *Células Troncales: Biología y Aplicaciones en Biomedicina*, M.A. Chávez-González, et al., Editors. 2017, Grupo Editorial Porrúa Garñén, LitoGrapo S.A. de C.V.: Ciudad de México. p. 15-41.
2. Friedenstein, A.J., et al., *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method*. *Experimental Hematology*, 1974. **2**: p. 83-92.
3. Montesinos, J.J., et al., *Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression*. *Cytotherapy*, 2009. **11**(2): p. 163-76.
4. Li, X., et al., *Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation*. *Int J Mol Med*, 2014. **34**(3): p. 695-704.
5. Iohara, K., et al., *Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis*. *Stem Cells*, 2006. **24**(11): p. 2493-503.
6. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
7. Castro-Manrreza, M., et al., *Capítulo 9 Células troncales mesenquimales*, in *Células Troncales: Biología y Aplicaciones en Biomedicina*, M.A. Chávez-González, et al., Editors. 2017, Grupo Editorial Porrúa Garñén, LitoGrapo S.A. de C.V.: Ciudad de México. p. 239-259.
8. Li, H. and X. Fu, *Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration*. *Cell and Tissue Research*, 2012. **348**: p. 371-377.
9. Maxson, S., et al., *Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair*. *Stem Cells Translational Medicine*, 2012. **1**: p. 142-149.
10. Castro-Manrreza, M.E. and J.J. Montesinos, *Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications*. *Journal of Immunology Research*, 2015. **2015**: p. 394917.
11. Gao, F., et al., *Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects*. *Cell Death and Disease*, 2016. **2016**: p. 7.
12. Amable, P.R., et al., *Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly*. *Stem Cell Research and Therapy*, 2014. **5**: p. 53.
13. Miranda, J.P., et al., *The Human Umbilical Cord Tissue-Derived MSC Population UCX((R)) Promotes Early Motogenic Effects on Keratinocytes and Fibroblasts and G-*

- CSF-Mediated Mobilization of BM-MSCs When Transplanted In Vivo*. Cell Transplant, 2015. **24**(5): p. 865-77.
14. Castro-Manrreza, M.E., et al., *Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(11): p. 1217-32.
 15. Jayarama-Reddy, V., et al., *Nanofibrous structured biomimetic strategies for skin tissue regeneration*. Wound Repair and Regeneration, 2013. **21**: p. 1-16.
 16. Fu, Y., et al., *Trophic effects of mesenchymal stem cells in tissue regeneration*. Tissue Engineering: Part B, 2017. **23**: p. 515-528.
 17. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Histología. Texto y Atlas Correlación con Biología Molecular y Celular*. 2015, Madrid: Lippincot Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health.
 18. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Sistema Tegumentario*, in *Histología. Texto y Atlas Correlación con Biología Molecular y Celular*. 2015, Lippincot Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health.: Madrid.
 19. Falanga, V., et al., *Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds*. Tissue Eng, 2007. **13**(6): p. 1299-312.
 20. Arno, A.I., et al., *Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling*. Stem Cell Res Ther, 2014. **5**(1): p. 28.
 21. Liu, L., et al., *Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88348.
 22. Caliari-Oliveira, C., et al., *Xenogeneic mesenchymal stromal cells improve wound healing and modulate the immune response in an extensive burn model*. Cell Transplantation, 2016. **25**: p. 201-215.
 23. Guo, X., et al., *Grafting of mesenchymal stem cell-seeded small intestinal submucosa to repair the deep partial-thickness burns*. Connective Tissue Research, 2016. **57**: p. 388-397.
 24. Hass, R., et al., *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Communication and Signaling, 2011. **9**: p. 12.
 25. Yeum, C.E., et al., *Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2013. **7**: p. 279-291.
 26. Zhang, Q.Z., et al., *Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing*. Stem Cells, 2010. **28**: p. 1856-1868.

27. Sasaki, M., et al., *Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2581-7.
28. Fong, C.Y., et al., *Human Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds*. 2014. **115**: p. 290-302.
29. Choi, M., et al., *Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2013. **45**: p. 560-570.
30. Chen, L., et al., *Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1886.
31. van den Broek, L.J., et al., *Differential response of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, dermal fibroblasts, and keratinocytes to burn wound exudates: potential role of skin-specific chemokine CCL27*. Tissue Engineering Part A, 2014. **20**: p. 197-209.
32. Shabbir, A., et al., *Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro*. Stem Cells and Development, 2015. **24**: p. 1635-1647.
33. Cappuzzello, C., et al., *Mesenchymal Stromal Cell-Derived PTX3 Promotes Wound Healing via Fibrin Remodeling*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(1): p. 293-300.
34. Neuss, S., et al., *Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots*. Cells Tissues Organs, 2010. **191**(1): p. 36-46.
35. Copland, I.B., et al., *Improved autograft survival of mesenchymal stromal cells by plasminogen activator inhibitor 1 inhibition*. Stem Cells, 2009. **27**(2): p. 467-77.
36. Domergue, S., et al., *Comparison between stromal vascular fraction and adipose mesenchymal stem cells in remodeling hypertrophic scars*. PLoS One, 2016. **11**: p. e0156161.
37. Wu, Y., et al., *Mesenchymal stem cells suppress fibroblast proliferation and reduce skin fibrosis through a TGF- β 3-dependent activation*. The International Journal of Lower Extremity Wounds, 2015. **14**: p. 50-62.
38. Fang, F., et al., *Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit the proliferative and profibrotic phenotype of hypertrophic scar fibroblasts and keloid fibroblasts through paracrine signaling*. 2016. **83**: p. 95-105.
39. Li, G., et al., *Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: implication in the migration*. Proteomics, 2009. **9**(1): p. 20-30.
40. Rasulov, M.F., et al., *First experience in the use of bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns*. Cell Technologies in Biology and Medicine, 2005. **1**: p. 42-46.

41. Bao, M., J. Xie, and W.T.S. Huck, *Recent advances in engineering the stem cell microniche in 3D*. *Advanced Science*, 2018. **5**: p. 1800448.
42. Van Tam, J.K., et al., *Mesenchymal stem cell adhesion but not plasticity is affected by high substrate stiffness*. *Sci Technol Adv Mater*, 2012. **13**(6): p. 064205.
43. Baker, B.M., et al., *Cell-mediated fibre recruitment drives extracellular matrix mechanosensing in engineered fibrillar microenvironments*. *Nature Materials*, 2015. **14**: p. 1262-1268.
44. Bruekers, S.M.C., et al., *Adaptation trajectories during adhesion and spreading affect future cell states*. *Scientific Reports*, 2017. **7**: p. 12308.
45. Xie, J., et al., *Collagen Gels with Different Fibrillar Microarchitectures Elicit Different Cellular Responses*. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2017. **9**: p. 19630-19637.
46. Li, Z., H. Lee, and C. Zhu, *Molecular mechanisms of mechanotransduction in integrin-mediated cell-matrix adhesion*. *Experimental Cell Research*, 2016. **349**: p. 85-94.
47. Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries, *Integrin ligands at glance*. *Cell Science at a Glance*, 2006. **119**: p. 3901-3903.
48. Kapp, T.G., et al., *A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 39805.
49. Li, Z., H. Lee, and C. Zhu, *Molecular mechanisms of mechanotransduction in integrin-mediated cell-matrix adhesion*. *Experimental Cell Research*, 2016. **349**: p. 85 - 94.
50. Liu, Z., et al., *Vinculin head-tail interaction defines multiple early mechanisms for cell substrate rigidity sensing*. *Integr Biol (Camb)*, 2016. **8**(6): p. 693-703.
51. Margadant, C., et al., *Mechanisms of integrin activation and trafficking*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2011. **23**: p. 607 - 614.
52. Atherton, P., et al., *Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin*. *Experimental Cell Research*, 2016. **243**: p. 21 - 27.
53. Kim, I.L., et al., *Fibrous hyaluronic acid hydrogels that direct MSC chondrogenesis through mechanical and adhesive cues*. *Biomaterials*, 2013. **34**(22): p. 5571-80.
54. Vallenius, T., *Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells*. *Open Biology*, 2013. **3**: p. 1 - 10.
55. Ivanovska, I.L., et al., *Stem cell mechanobiology: diverse lessons from bone marrow*. *Trends in Cell Biology*, 2015. **25**: p. 523 - 532.
56. Steward, A.J. and D.J. Kelly, *Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation*. *Journal of Anatomy*, 2015. **227**: p. 717-731.
57. Mathieu, P.S. and E.G. Lobo, *Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2012. **18**(6): p. 436-44.
58. Lam, J. and T. Segura, *The modulation of MSC integrin expression by RGD presentation*. *Biomaterials*, 2013. **34**(16): p. 3938-47.

59. Ho, W., et al., *The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure*. Tissue Eng, 2006. **12**(6): p. 1587-95.
60. Harunaga, J.S. and K.M. Yamada, *Cell-matrix adhesions in 3D*. Matrix Biol, 2011. **30**(7-8): p. 363-8.
61. Connelly, J.T., A.J. Garcia, and M.E. Levenston, *Interactions between integrin ligand density and cytoskeletal integrity regulate BMSC chondrogenesis*. J Cell Physiol, 2008. **217**(1): p. 145-54.
62. Hakkinen, K.M., et al., *Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(5-6): p. 713-24.
63. Khetan, S., et al., *Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels*. Nat Mater, 2013. **12**(5): p. 458-65.
64. Mierke, C.T., et al., *Vinculin facilitates cell invasion into three-dimensional collagen matrices*. The Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**: p. 13121-13130.
65. Madl, C.M., et al., *Maintenance of neural progenitor cell stemness in 3D hydrogels requires matrix remodelling*. Nature Materials, 2017. **16**: p. 1233-1242.
66. Schultz, K.M., K.A. Kyburz, and K.S. Anseth, *Measuring dynamic cell-material interactions and remodeling during 3D human mesenchymal stem cell migration in hydrogels*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **2015**: p. e3757-e3764.
67. Bao, M., et al., *3D microniches reveal the importance of cell size and shape*. Nature Communications, 2017. **8**: p. 1962.
68. Steward, A.J., D.R. Wagner, and D.J. Kelly, *Exploring the roles of integrin binding and cytoskeletal reorganization during mesenchymal stem cell mechanotransduction in soft and stiff hydrogels subjected to dynamic compression*. J Mech Behav Biomed Mater, 2014. **38**: p. 174-82.
69. Steward, A.J., D.R. Wagner, and D.J. Kelly, *The pericellular environment regulates cytoskeletal development and the differentiation of mesenchymal stem cells and determines their response to hydrostatic pressure*. Eur Cell Mater, 2013. **25**: p. 167-78.
70. Li, Y., et al., *Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering*. ScientificWorldJournal, 2015. **2015**: p. 685690.
71. Li, W., et al., *Fibrin Fiber Stiffness Is Strongly Affected by Fiber Diameter, but Not by Fibrinogen Glycation*. Biophys J, 2016. **110**(6): p. 1400-10.
72. Janmey, P.A., J.P. Winer, and J.W. Weisel, *Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications*. J R Soc Interface, 2009. **6**(30): p. 1-10.

73. Hotary, K.B., et al., *Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 295-308.
74. Bruekers, S.M., et al., *Fibrin-fiber architecture influences cell spreading and differentiation*. Cell Adh Migr, 2016. **10**(5): p. 495-504.
75. Lozito, T.P., et al., *Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs*. Matrix Biol, 2014. **34**: p. 132-43.
76. Dabrowski, F.A., et al., *Comparison of the paracrine activity of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord, amniotic membrane and adipose tissue*. The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2017. **43**: p. 1758 - 1768.
77. Huang, N.F., et al., *Biophysical and chemical effects of fibrin on mesenchymal stromal cell gene expression*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**: p. 3947-3956.
78. Baba, K., et al., *Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived fibrin: A preliminary study*. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2013. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**: p. 775 - 782.
79. Steward, A.J., et al., *Cell-matrix interactions regulate mesenchymal stem cell response to hydrostatic pressure*. Acta Biomater, 2012. **8**(6): p. 2153-9.
80. Huang, C.Y.C., M.A. Deitzer, and H.S. Cheung, *Effects of fibrinolytic inhibitors on chondrogenesis of bone-marrow derived mesenchymal stem cells in fibrin gels*. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 2006. **6**: p. 5 - 11.
81. Acosta, L., et al., *Adipose mesenchymal stromal cells isolated from type 2 diabetic patients display reduced fibrinolytic activity*. Diabetes, 2013. **62**: p. 4266-4269.
82. Calzada-Contreras, A., et al., *Valores de referencia para las pruebas de coagulación en México: utilidad de la mezcla de plasma de donadores de sangre*. Revista de Investigación Clínica, 2012. **64**: p. 437-443.
83. Llames, S., et al., *Human plasma as a dermal scaffold for the generation as a completely autologous bionengineered skin*. Transplantation, 2004. **7**: p. 350-355.
84. Barreda, L., et al., *Human plasma gels: their preparation and rheological characterization for cell culture applications in tissue engineering*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2019. **89**: p. 107-113.
85. Salehinejad, P., et al., *Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly*. In vitro Cell. Dev. Biol., 2012. **48**: p. 75 - 83.
86. Llames, S., et al., *Clinical results of an autologous engineered skin*. Cell and Tissue Banking, 2006. **7**: p. 47 - 53.
87. Kohli, N., et al., *An in vitro comparison of the incorporation, growth, and chondrogenic potential of human bone marrow versus adipose tissue mesenchymal*

- stem cells in clinically relevant cell scaffolds used for cartilage repair*. Cartilage, 2015. **6**: p. 252-263.
88. Xu, L., et al., *Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue*. Stem Cell Research and Therapy, 2017. **8**: p. 275.
 89. Levy-Beladev, L., et al., *A family of cell-adhering peptides homologous to fibrinogen C-termini*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **401**(1): p. 124-30.
 90. Arora, A., A. Kothari, and D.S. Katti, *Pericellular plasma clot negates the influence of scaffold stiffness on chondrogenic differentiation*. 2016. **46**: p. 68 - 78.
 91. Capilla-González, V., et al., *PDGF Restores the Defective Phenotype of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Diabetic Patients*. 2018. **26**: p. 2696 - 2709.
 92. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**: p. 845 - 867.
 93. Tahara, A., et al., *Plasma levels of platelet-derived growth factor in normal subjects and patients with ischemic heart disease*. American Heart Journal, 1991. **122**: p. 986 - 992.
 94. Bongso , A. and C.-Y. Fong, *The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cell Rev and Rep, 2013. **9**: p. 226-240.
 95. Fajardo-Orduña, G.R., H. Mayani, and J.J. Montesinos, *Hematopoietic support capacity of mesenchymal stem cells: Biology and clinical potential*. Arch Med Res, 2015. **46**: p. 589-596.
 96. Wang, Y. and S. Zhao, *Vascular biology of the placenta*. 2010, San Rafael, CA, USA: Morgan & Claypool Life Sciences.

APÉNDICE

(Artículo requisito para la obtención del grado)

Chaires-Rosas CP, Ambriz X, Montesinos JJ, Hernández-Téllez B, Piñón-Zárate G, Herrera-Enríquez M, Hernández-Estévez E, Ambrosio JR, Castell-Rodríguez A. Differential adhesion and fibrinolytic activity of mesenchymal stem cells from human bone marrow, placenta, and Wharton's jelly cultured in a fibrin hydrogel. *J Tissue Eng*, 2019, 10:1-17, Doi: 10.1177/2041731419840622.

Differential adhesion and fibrinolytic activity of mesenchymal stem cells from human bone marrow, placenta, and Wharton's jelly cultured in a fibrin hydrogel

Journal of Tissue Engineering
Volume 10: 1–17
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/2041731419840622
journals.sagepub.com/home/tej



Cassandra P Chaires-Rosas¹, Xóchitl Ambriz², Juan J Montesinos³,
Beatriz Hernández-Téllez¹, Gabriela Piñón-Zárate¹,
Miguel Herrera-Enríquez¹, Érika Hernández-Estévez³,
Javier R Ambrosio²  and Andrés Castell-Rodríguez¹ 

Abstract

Mesenchymal stem cells isolated from different tissues should share associated markers and the capability to differentiate to mesodermal lineages. However, their behavior varies in specific microenvironments. Herein, adhesion and fibrinolytic activity of mesenchymal stem cells from placenta, bone marrow, and Wharton's jelly were evaluated in fibrin hydrogels prepared with nonpurified blood plasma and compared with two-dimensional cultures. Despite the source, mesenchymal stem cells adhered through focal adhesions positive for vinculin and integrin α V in two dimensions, while focal adhesions could not be detected in fibrin hydrogels. Moreover, some cells could not spread and stay rounded. The proportions of elongated and round phenotypes varied, with placenta mesenchymal stem cells having the lowest percentage of elongated cells (~10%). Mesenchymal stem cells degraded fibrin at distinct rates, and placenta mesenchymal stem cells had the strongest fibrinolytic activity, which was achieved principally through the plasminogen–plasmin axis. These findings might have clinical implications in tissue engineering and wound healing therapy.

Keywords

Human mesenchymal stem cells, fibrin, adhesion, fibrinolysis

Received: 13 December 2018; accepted: 8 March 2019

Introduction

Tissue engineering and regenerative medicine is an evolving field with the aim of repairing the structure and functions of tissues and organs by generating tissue substitutes. These substitutes are formed by cells, chemical signals, and scaffolds.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are good candidates for this purpose because they can accelerate tissue repair.^{1–3} To accomplish this goal, they may be able to differentiate into mesodermal, ectodermal, and endodermal lineages, and modulate repair processes by paracrine signaling.^{4–8}

MSCs were first isolated from bone marrow (BM), and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) established the criteria that MSCs must fulfill.⁹ MSCs should adhere to plastic substrates and exhibit a spindle or

fibroblastoid shape; differentiate in vitro to osteoblasts, adipocytes, and chondroblasts; and have the following phenotypes: CD105+, CD90+, CD73+, CD45–, CD34–, CD14 or CD11b–, CD79 α or CD19–, and HLA-DR–.

¹Department of Cellular and Tissue Biology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

²Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

³Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, Mexican Social Security Institute, Mexico City, Mexico

Corresponding author:

Andrés Castell-Rodríguez, Department of Cellular and Tissue Biology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad 3000, 04510 Ciudad de México, Mexico.
Email: castell@unam.mx



Since then, they have been isolated from different tissues, and many other markers and characteristics have emerged. They have been obtained from adipose tissue (AT), dental pulp, placenta (PL), and umbilical cord, and it is assumed that they possess similar characteristics.^{10–12}

BM-MSCs are the most studied MSCs in tissue engineering and regenerative medicine as well as in three-dimensional (3D) culture. The isolation of MSCs from PL and Wharton's jelly (WJ) tissue would have several practical advantages over BM, including procurement of tissue samples, reduced donor damage, and feasibility of storing large quantities of MSCs for future stem cell-based therapy and tissue engineering. This work explores whether MSCs isolated from BM, PL, and WJ share the same behavior in a 3D context using fibrin hydrogels. Fibrin is the terminal product of the coagulation cascade in response to blood vessel injury and is the natural matrix in all cases of wounds; thus, it has been long used as a scaffold for tissue engineering.^{13,14} Fibrin hydrogel has been used as a delivery system for autologous BM-MSCs to accelerate chronic and acute cutaneous wound healing in both murine models and clinical cases.¹ Today, fibrin hydrogels are generated with purified fibrinogen from blood plasma, as it is the best way to control fibrinogen and thrombin concentrations, hydrogel polymerization, and structure.^{15,16} Different groups have reported that MSCs embedded in this system can adhere, proliferate, migrate, and differentiate.^{15–18} Nevertheless, it lacks other plasma constituents, making it necessary to use nonpurified plasma to better understand the interactions between cells and this natural scaffold. Despite existing genetic diversity among humans, the composition and concentration of coagulation factors in samples from healthy donors is similar,¹⁹ which aids in obtaining reliable results *in vivo* in tissue engineering and regenerative medicine.^{20,21}

Cellular adhesion in two-dimensional (2D) models has been well studied, and structures such as focal adhesions (FAs) have been characterized. Nonetheless, these structures might not be the same in composition and functionality in 3D,²² as adhesion is affected by scaffold mechanics and chemical components. FAs permit communication between cells and their extracellular matrix (ECM)/scaffold through mechanotransduction. Vinculin is a vital protein for mechanotransduction in 2D and participates in the linkage between the actin cytoskeleton and specific receptors, such as integrins, after adhesion to a substrate. The vinculin presence in FAs regulates direction and cell polarity during migration in 2D and 3D cultures.²³ Because fibrin has arginine–glycine–aspartic acid (RGD) sequences, it is expected that MSCs adhere to it via FAs. Hakkinen et al.²⁴ demonstrated that fibroblasts seeded in fibrin hydrogels expressed vinculin and $\beta 1$ integrin in FA, a situation that has not been evaluated in different types of MSCs.

MSCs ability to degrade a scaffold has been related to their adhesion and differentiation. Khetan et al.²⁵ observed

that BM-MSCs needed to hydrolyze methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel to generate cellular traction and to be able to differentiate toward an osteoblastic lineage rather than an adipocytic one. Plasmin is the major fibrinolytic enzyme, and BM-MSCs express the enzymes that regulate its activity, such as tissue and urokinase plasminogen activators (tPA, uPA), urokinase plasminogen activator receptor (uPAR), and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1).^{26,27} PAI-1 expression is related to the migratory capability of BM-MSCs, WJ-MSCs, and PL-MSCs.²⁸ Nevertheless, their fibrinolytic activities were not compared.

In this work, BM-MSCs, PL-MSCs, and WJ-MSCs were seeded in fibrin hydrogels from nonpurified blood plasma, and their adhesion was evaluated through the analysis of the presence of FA proteins (vinculin and integrin αV) and their fibrinolytic capability in the presence of specific inhibitors.

Materials and methods

Isolation of MSCs

MSCs were isolated from human BM, PL, and WJ, which were collected by donation under written informed consent. Tissue samples from BM ($n=3$), PL ($n=3$), and WJ from umbilical cord ($n=3$) were obtained under ethical guidelines from Hospitals Bernardo Sepúlveda, National Medical Center (NMC), Francisco del Paso y Troncoso of the Mexican Social Security Institute (IMSS), and Eduardo Liceaga General Hospital, respectively.

MSCs from PL and BM were isolated in accordance to protocols previously described elsewhere.²⁹ Briefly, BM-MSCs were obtained by density gradient and posterior plastic adherence of mononuclear cells. PL-MSCs were obtained by mechanical and enzymatic digestion with trypsin for 30 min at 37°C. Isolated cell pellets were resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose (DMEM-LG) supplemented with fetal bovine serum (FBS) 10%, L-glutamine 4 mM, and antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 mg/mL and gentamicin 100 mg/mL), all from Gibco BRL (Rockville, MD, USA). Cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/cm². Four days after isolation, nonadherent cells were removed, and fresh medium was added. When cells reached 80% confluence, the cell monolayer was detached (trypsin 0.05%, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.02%) and reseeded to a density of 2×10^3 cells/cm².

MSCs from umbilical cord were obtained from WJ using an explant protocol-modified from a previous one.³⁰ Blood vessels were removed from the sample, and it was sectioned in final fragments of 1 cm². Explants were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F12 (DMEM-F12) supplemented with FBS 10%, L-glutamine 4 mM, and antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 mg/mL, and gentamicin 100 mg/mL), all from Gibco

BRL. Media were changed every third day up to 2 weeks, when the explants were removed. When cells reached 80% confluence, the cell monolayer was detached (trypsin 0.05%, EDTA 0.02%) and reseeded to a density of 2×10^3 cells/cm².

Characterization of MSCs

Immunophenotypic characterization and mesodermal differentiations were performed as previously described.²⁹ The presence of MSCs markers (CD105, CD90, CD73, CD13, and HLA-ABC) and absence of CD34, CD45, CD14, CD31, and HLA-DR were detected by flow cytometry analysis with monoclonal antibodies coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), and allophycocyanin (APC) from BD Biosciences (San Diego, CA, USA) in cell passages 1 to 4. Stained cells were evaluated with a FACS CANTO II Flow Cytometer (BD Biosciences) with at least 10,000 events per sample, and the data were analyzed with FlowJo 10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

Adipogenic differentiation was induced by the stem cell commercial kit MesenCult Adipogenic Differentiation Kit, supplemented with stimulatory supplements (Stemcell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada) for 14 days, and confirmed by Oil Red O Staining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), counterstained with hematoxylin to allow visualization of nuclei. Osteogenic differentiation was induced by the stem cell commercial kit MesenCult Osteogenic Differentiation Kit, supplemented with 10^{-8} M dexamethasone, 0.2 mM ascorbic acid, and 10 mM β -glycerol phosphate (Stemcell Technologies, Inc.) for 21 days, and confirmed by alkaline phosphatase staining (Sigma-Aldrich). Chondrogenic differentiation was induced with the commercial kit Chondrocyte Differentiation Medium BulletKit consisting of chondrogenic differentiation basal medium supplemented with SingleQuots of dexamethasone, ascorbate, Insulin–Transferrin–Selenium (ITS) supplement, sodium pyruvate, proline, and L-glutamine (Cambrex-Lonza BioScience, Walkersville, MD, USA) supplemented with 10 ng/mL TGF- β 3 (Cambrex-Lonza BioScience) for 28 days. Chondrogenesis was confirmed through Alcian blue staining (Sigma-Aldrich).

MSCs culture in fibrin hydrogels

Samples of human plasma from healthy donors were provided by the blood bank of General Hospital of Iguala, Guerrero, Mexico from the Institute for Social Security and Services for State Workers (ISSSTE). Plasma was obtained by primary fractioning of total blood. Fibrin hydrogels were prepared from nonpurified plasma of individual donors. A fibrin suspension of 200 μ L was prepared with 136 μ L of plasma, 24 μ L of NaCl 0.9%, 40 μ L of CaCl₂ 1%, and 2500 cells, and then incubated at 37°C for 30 min to induce polymerization. Subsequently, DMEM-LG

supplemented medium was added to PL-MSCs and BM-MSCs fibrin gels, and DMEM-F12 supplemented medium was added to WJ-MSCs gels. As controls, 7500 cells/cm² were seeded on glass coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich).

Immunofluorescence staining

Viability was analyzed in hydrogels and monolayers cultured for 3 days through calcein and ethidium homodimer stains (LIVE/DEAD Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the instructions of the manufacturer. Death control was achieved by treating cells of both conditions with ethanol for 30 min before staining. Panoramic images (100 \times) were taken using a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Shinagawa, Tokyo, Japan) with NIS-Elements F4 software (Nikon). For viability estimation, cells were counted manually, since it was difficult to delimitate cell boundaries in fibrin hydrogel cultures with a software.

Vinculin and integrin α V proteins were detected after culture in fibrin hydrogels and monolayers on glass coverslips. Cells cultured for 0.5, 12, 24, 48, and 72 h were fixed with formaldehyde 4% for 10 h (hydrogel) and 30 min (monolayer). Hydrogels were immersed in Tissue Tek OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), frozen at -80°C , and cryo-sectioned. Samples (monolayers and cryo-sections) were permeabilized with Triton X-100 0.1% (10 min for monolayers, 15 min for cryo-sections) and incubated with phosphate - buffered saline (PBS) albumin 5% for 30 min. Primary antibody for anti-vinculin 1:100 (kit FAK-100, Merck-Millipore, Burlington, MA, USA) and its secondary antibody anti-mouse-CY5 1:200 (Seracare, Milford, MA, USA) were used. Cryo-sections from fibrin hydrogels and monolayers cultured for 48 h were also incubated with anti-CD51 1:75 (Enzo Biochem, Farmingdale, NY, USA) and its secondary antibody anti-rabbit-FITC 1:200 (Merck-Millipore). Samples were incubated with each antibody for 1 h at room temperature. Subsequently, samples were incubated with phalloidin-TRITC 1:1000 (kit FAK-100, Merck-Millipore) for 30 min and DAPI (kit FAK-100, Merck-Millipore) for 10 to 15 min (monolayer or cryo-sections, respectively). Samples were mounted with DAKO solution (Agilent Technologies, Sta. Clara, CA, USA). Some cryo-sections were stained with primary antibody anti-CD105 1:200 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a quadruple stain with anti-vinculin, phalloidin-tetramethylrhodamine (TRITC), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The secondary antibody used for anti-CD105 detection was anti-mouse-FITC 1:100 (Merck-Millipore). Panoramic images (200 \times) were taken using a Nikon Eclipse 80i microscope; Z stacks (630 \times , 400 \times) were acquired using Leica TCS SP5—Leica TCS SP8 confocal microscopes with LASX software (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Fibrinolysis analysis

Enzymatic degradation of fibrin hydrogels was evaluated at low cell density (1500 cells/mL) in the presence or absence of fibrinolytic inhibitors: aprotinin 200 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich), BB-94 5 μM (Abcam, Cambridge, UK), tranexamic acid 400 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich), aprotinin/tranexamic acid, aprotinin/BB-94, and BB-94/tranexamic acid for 7 days. Inhibitors were added to the fibrin mix before polymerization. Degraded zones were imaged in an Olympus SZX7 stereoscopic microscope (Shinjuku, Tokyo, Japan).

Image processing

Micrographs were analyzed through Fiji-ImageJ 1.51h ((National Institutes of Health, (NIH), Bethesda, MD, USA) software. Micrographs were edited to adjust brightness, contrast, and color using the same magnitudes for each assay. Z stacks were processed in two ways: maximally projected to generate 2D images or 3D video reconstructions (see Supplemental Videos S1–S3). Morphology analysis was done under the criteria of elongated or round-shaped cells, and the percentage was calculated from panoramic immunofluorescence images of gels. On average, 75 cells were analyzed in each sample. Total degraded area from the fibrinolysis assay was quantified by the particle analysis tool using panoramic images ($8\times$). Outlines of the degraded zones were drawn with the same software (see Supplemental Figure S3).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA); data were obtained from quantifications of elongated and round-shaped cell proportions in fibrin hydrogels and of degraded areas. Intergroup analysis was carried out with two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. The p values <0.05 were considered significant. Viability statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Results

Immunophenotype and mesodermal differentiation of PL-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs

Because there could be differences between MSCs sources, in the present study we compared MSCs from three different tissues: BM, PL, and WJ. They were characterized by analyzing the presence of markers associated with MSCs and by their capability to differentiate in mesodermal lineages. As was reported previously,²⁹ these cells showed high expression of CD105, CD90, CD73, and CD13;

moderate to low expression of HLA-ABC; and low to absent expression of CD45, CD34, CD31, CD14, and HLA-DR (see Table 1, Figure 1(a)). PL-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs showed positive mesodermal differentiation, as confirmed by staining (see Figure 1(b)). For osteoblastic differentiation, cells were stained to detect alkaline phosphatase, while for chondroblastic differentiation, glycosaminoglycans were marked by their staining with Alcian blue; for adipoblastic differentiation, lipid droplets were stained with Oil Red O.

Viability of PL-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs in fibrin hydrogels

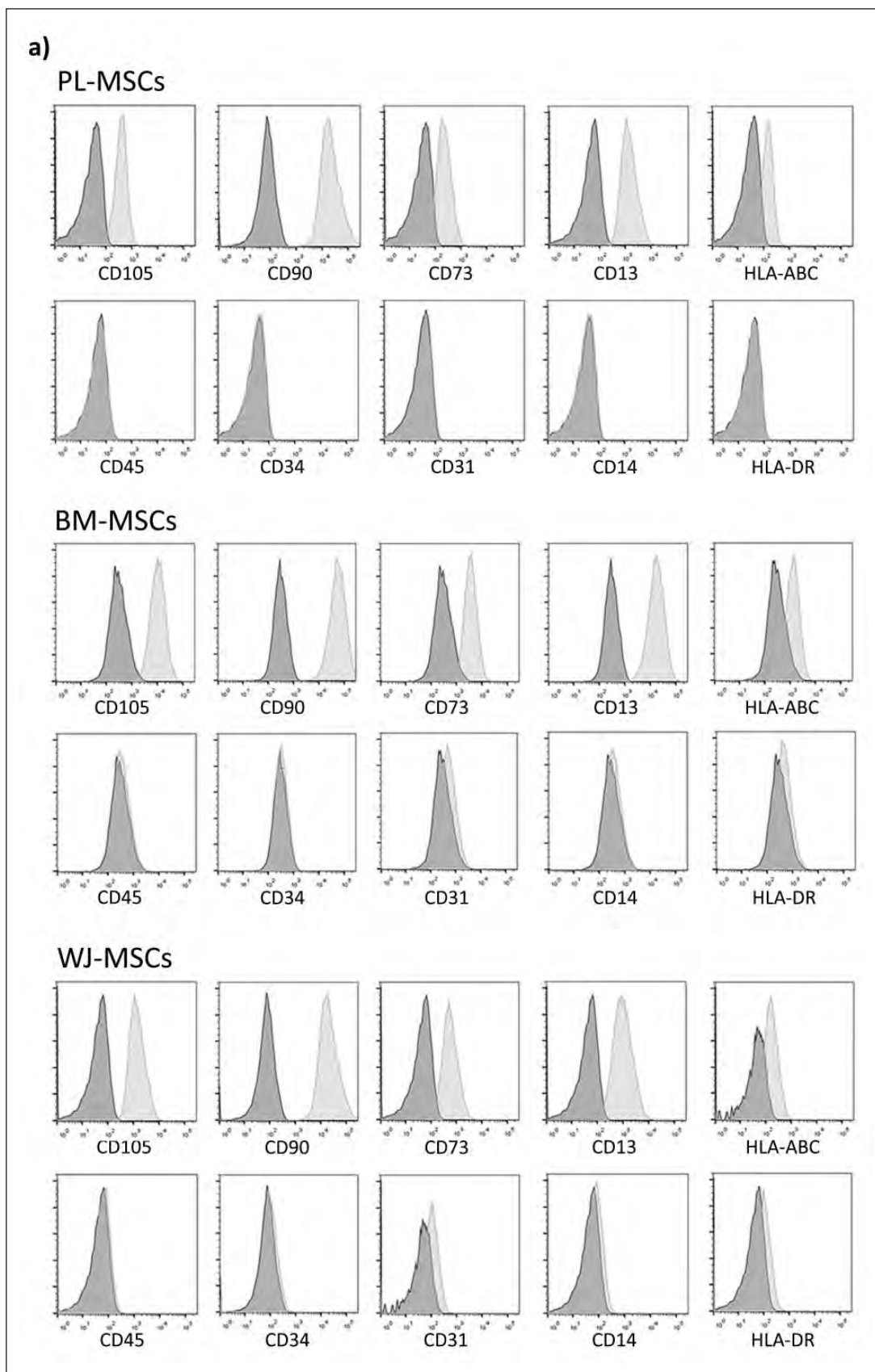
MSCs behavior in fibrin hydrogels was analyzed through viability, adhesion, and fibrinolysis assays. We used LIVE/DEAD staining to assay viability,^{16,31} and found that MSCs from the three tissues were maintained viable after being cultured for up to 72 h in the hydrogel ($>90\%$), at a similar rate as on 2D cultures on glass coverslips ($\sim 100\%$), as seen in Figure 2. In addition to viability, other aspects can be visualized in this assay. First, even though the morphology of cells grown on monolayer tends to be spindle-shaped, cells inside the fibrin hydrogel exhibited both round and elongated shapes. Second, PL-MSCs demonstrated a high fibrinolytic activity, as they degraded the fibrin hydrogel completely by the third to fourth day of culture and grew in monolayer on the plastic substrate (see Supplemental Figure S1). Both phenomena were evaluated in further detail.

FAs rich in vinculin and integrin αV are absent in PL-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs cultures in fibrin hydrogels

MSCs adhesion capability in 2D cultures and in fibrin hydrogels was evaluated by analyzing the presence of vinculin and integrin αV (FA proteins), and stress fiber formation. First, the presence of vinculin at FAs was analyzed after culturing MSCs on glass coverslips for 12, 24, 48, and 72 h, and in fibrin hydrogels for 0.5, 24, 48, and 72 h.

Monolayer conditions showed that cells were capable of adhering at 12 h, but spreading was clear at 24 h, along with stress fiber formation (see Figure 3). In every culture condition, vinculin was detected, and its presence in FAs increased as time in culture was augmented. Interestingly, in BM-MSCs, stress fibers appeared to be thicker and longer, and FAs had stronger vinculin detection, in comparison to PL-MSCs and WJ-MSCs, at all times.

As expected, MSCs adhesion in fibrin hydrogels was different with respect to the one observed in 2D cultures. From the first day, MSCs from the three tissues exhibited two shapes: round or elongated, but both with F-actin (see



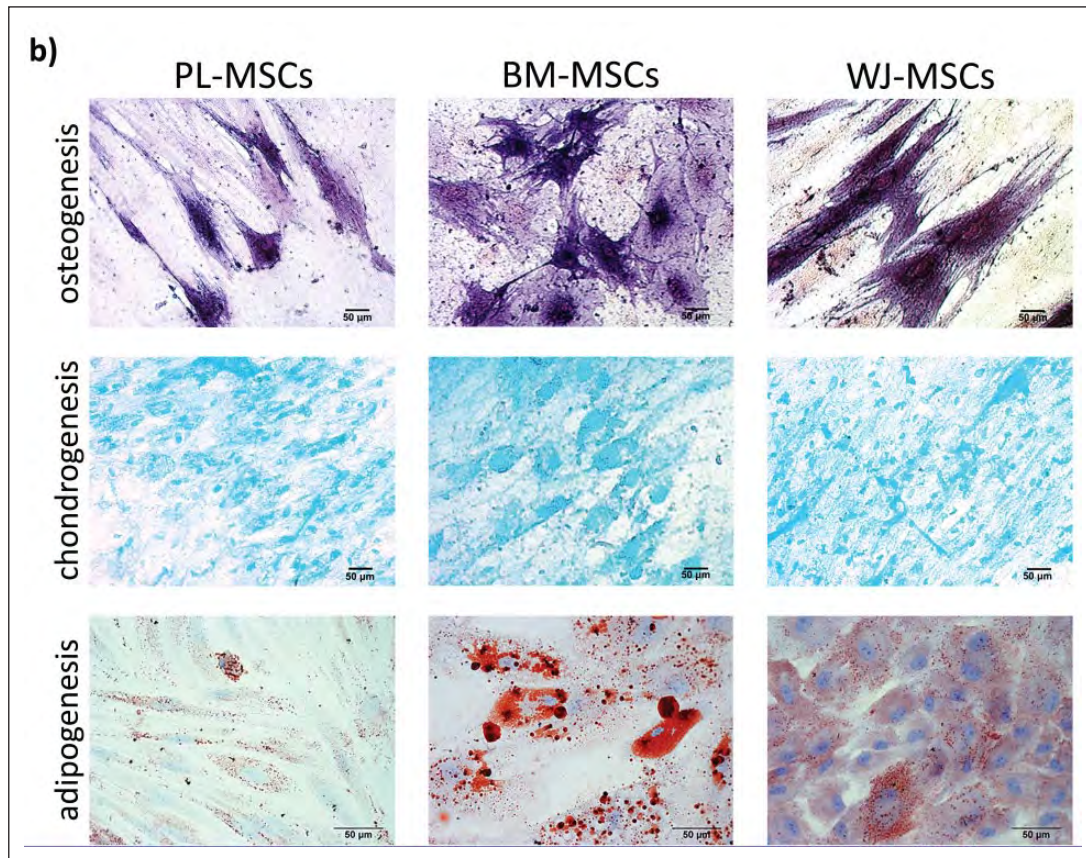


Figure 1. Immunophenotype and differentiation to mesodermal lineages of MSCs. (a) Cells were incubated with labeled antibodies for CD105, CD90, CD73, CD13, HLA-ABC, CD45, CD34, CD31, CD13, and HLA-DR, and analyzed by flow cytometry. Control (dark gray histograms) and positive populations (light gray histograms) are shown. (b) Osteoblastic differentiation was confirmed by alkaline phosphatase staining; glycosaminoglycans in chondroblastic differentiation were stained with Alcian blue, and lipid droplets in adipoblastic differentiation were stained with Oil Red O. Representative experiment. PL-MSCs: placenta mesenchymal stem cells; BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; WJ-MSCs: Wharton's jelly mesenchymal stem cells.

Table 1. Immunophenotype of PL-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs.

| Marker | PL-MSCs (% \pm SD) | BM-MSCs (% \pm SD) | WJ-MSCs (% \pm SD) |
|---------|----------------------|----------------------|----------------------|
| CD105 | 96 \pm 3 | 90 \pm 13 | 99.8 \pm 0.1 |
| CD90 | 72.7 \pm 27 | 85 \pm 15 | 100 |
| CD73 | 88 \pm 9 | 97 \pm 3 | 95.5 \pm 6.6 |
| CD13 | 98 \pm 3 | 98 \pm 1 | 97.8 \pm 2.7 |
| HLA-ABC | 68 \pm 30 | 94 \pm 9 | 56.6 \pm 32.1 |
| CD45 | 2 \pm 3 | 1 \pm 1 | 0.1 \pm 0.1 |
| CD34 | 0 | 0 | 0.9 \pm 0.8 |
| CD31 | 1 \pm 1 | 1 \pm 1 | 6.6 \pm 6.3 |
| CD14 | 1 \pm 1 | 2 \pm 2 | 0.4 \pm 0.3 |
| HLA-DR | 1 \pm 1 | 3 \pm 3 | 3.6 \pm 4.9 |

PL-MSCs: placenta mesenchymal stem cells; BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; WJ-MSCs: Wharton's jelly mesenchymal stem cells; SD: standard deviation.

The results are expressed as percentage of positive cells. SD of three experiments, with at least >10,000 events per sample, was counted (n=3).

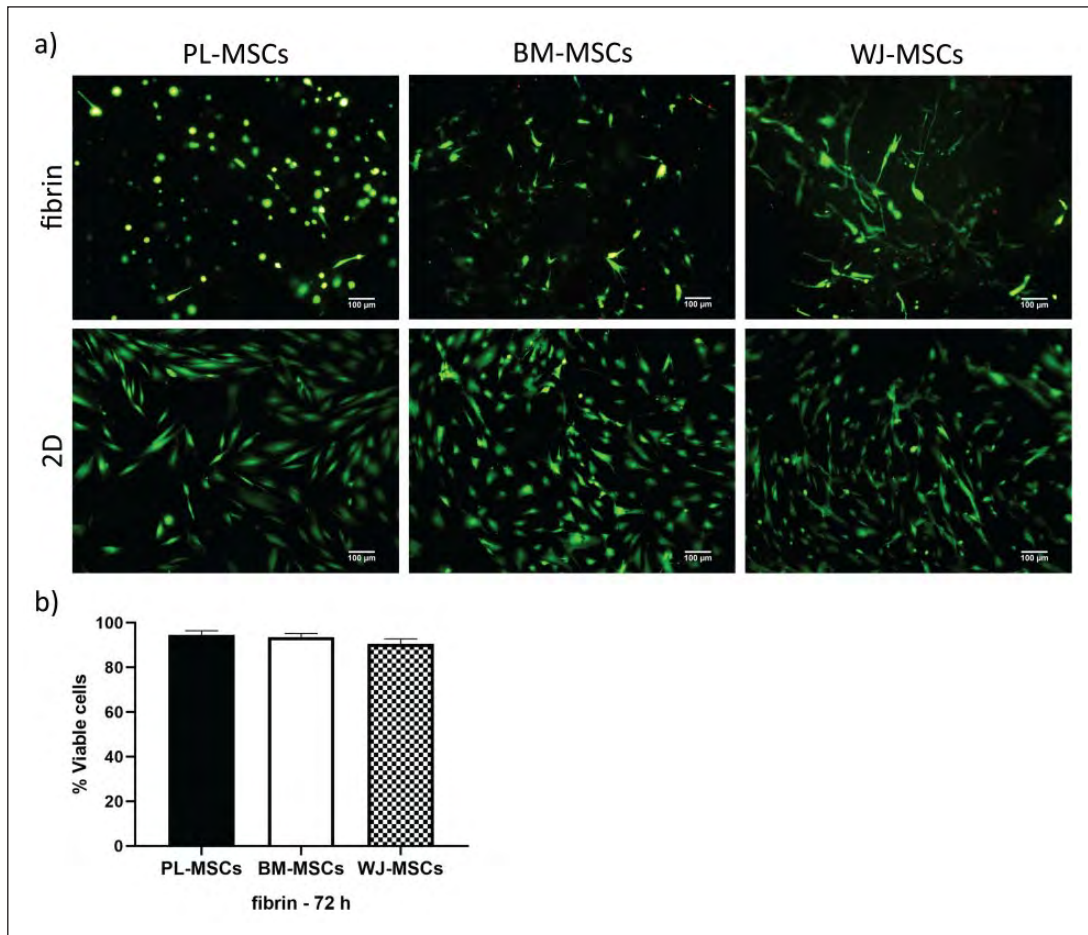


Figure 2. Viability of MSCs cultured in fibrin hydrogels and 2D. (a) Cells were stained with LIVE/DEAD kits; viable cells are seen in green, and dead ones in red. MSCs from different tissues showed a viability $>90\%$ at 3 days of culture in fibrin and almost 100% as a monolayer on glass coverslips. Images from a representative experiment were taken with an epifluorescence microscope. (b) Graph showing the percentages of viable cells in fibrin hydrogels at 3 days of culture. Bars indicate standard errors of the media of three experiments. There were no statistical differences between MSCs ($p < 0.05$) ($n = 3$). PL-MSCs: placenta mesenchymal stem cells; BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; WJ-MSCs: Wharton's jelly mesenchymal stem cells.

Figure 4(a)). These morphologies were more evident at 48h, and their proportions were different between the three types of MSCs. After culturing for 2 days, $91.12 \pm 1.92\%$ of PL-MSCs were round-shaped cells, which represent approximately 2-fold and 1.2-fold greater than in BM-MSCs and WJ-MSCs ($44.44\% \pm 7.74\%$ and $76.84\% \pm 0.01\%$), respectively, with statistically significant difference in comparison to BM-MSCs ($p = 0.0007$) (see Figure 4(b)). We observed that elongated cells from MSCs of the three sources were less widespread in fibrin hydrogels than those seeded on glass coverslips; nonetheless, BM-MSCs tended to be more ramified in fibrin hydrogels than the other two. Despite the differences between elongated and round-shaped cells in the three sources of MSCs, they were positive for CD105 regardless of their morphology and/or expression of the other markers, as shown for WJ-MSCs in Figure 5(c). In one instance, elongated cells in BM-MSCs and WJ-MSCs developed

thicker stress fibers than in PL-MSCs, although vinculin seems not to be present in them (see Figure 4(a)). In another instance, round-shaped cells from the three sources of MSCs had F-actin in aggregates with the submembranous location of vinculin, and only some PL-MSCs contained lamellipodia with low to absent vinculin detection (see Figures 4(a) and 5(b), and Supplemental Videos S1–S3). Moreover, vinculin was detected in round-shaped cells, with increased intensity as time in culture was augmented and was partially colocalized with actin, although there were no apparent FAs. PL-MSCs completely degraded the fibrin hydrogel between the third and fourth day of culture (see Supplemental Figure S1(a)), dropping to the bottom of the tissue culture plate and generating a monolayer. These cells were stained to evaluate vinculin and actin, showing they were still capable of displaying stress fibers and FAs in 2D cultures (see Supplemental Figure S1(b)).

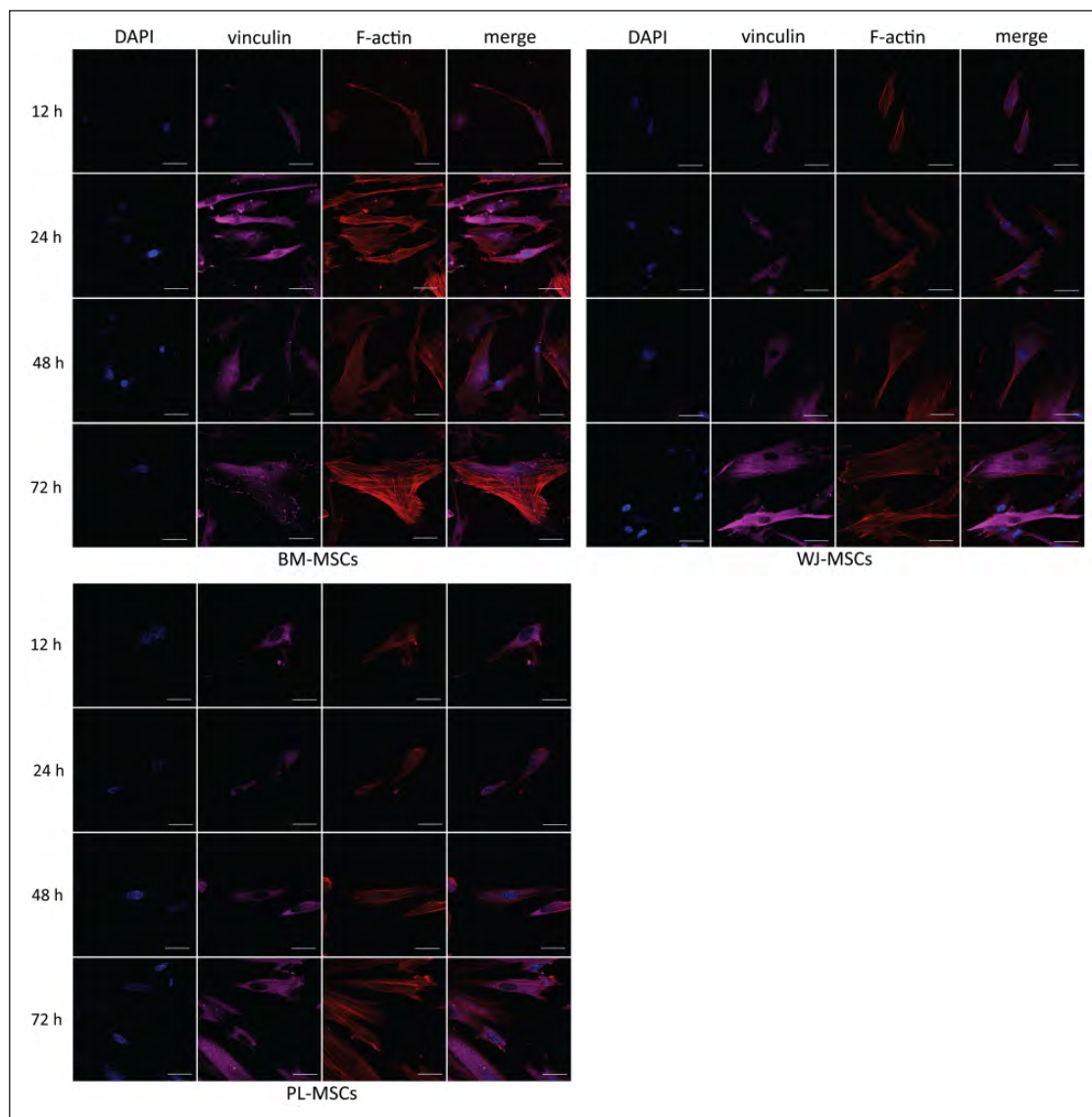


Figure 3. Temporal course of vinculin and actin distribution in MSCs cultured on 2D. Cells were cultured on glass coverslips for 12 h, 1, 2, and 3 days, fixed and stained for nuclei (blue), F-actin (red), and vinculin (magenta). In each case, vinculin detection in FAs was augmented in a time-dependent manner. Representative confocal micrographs are shown. PL-MSCs: placenta mesenchymal stem cells; BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; WJ-MSCs: Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Bars represent 50 μm .

Later, we evaluated integrin αV in MSCs cultured in monolayer as well as in fibrin hydrogels for 2 days. As shown in Figure 5(a), MSCs cultures in 2D expressed integrin αV in FAs, where it colocalized with vinculin and actin. In fibrin hydrogels, integrin αV was found in some elongated and round-shaped cells of PL-MSCs and BM-MSCs, but its detection was null in almost all cells in WJ-MSCs cultures (see Figure 5(b); Supplemental Figure S2 and Videos S1–S3). In all cases, detection of integrin αV in FAs was weak. As previously mentioned, only some round-shaped PL-MSCs had lamellipodia, with a diffuse staining of vinculin and integrin αV at 2 days (see Figure 5(b) and Supplemental Video S1).

Fibrin hydrogels were degraded by PL-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs at different rates

We evaluated the fibrinolytic activity of MSCs from the three tissues cultured in fibrin hydrogels in the presence and absence of inhibitors of the plasminogen–plasmin axis and MMPs. Cells were cultured for 7 days in a very low cell number (1500 cells/mL) in the presence or absence of aprotinin, tranexamic acid, BB-94, and their combinations, after which degradation analysis was carried out (see Figure 6(b) and (c)). With the use of image analysis software, degraded zones per hydrogel were selected and numbered, and their areas were calculated as described in

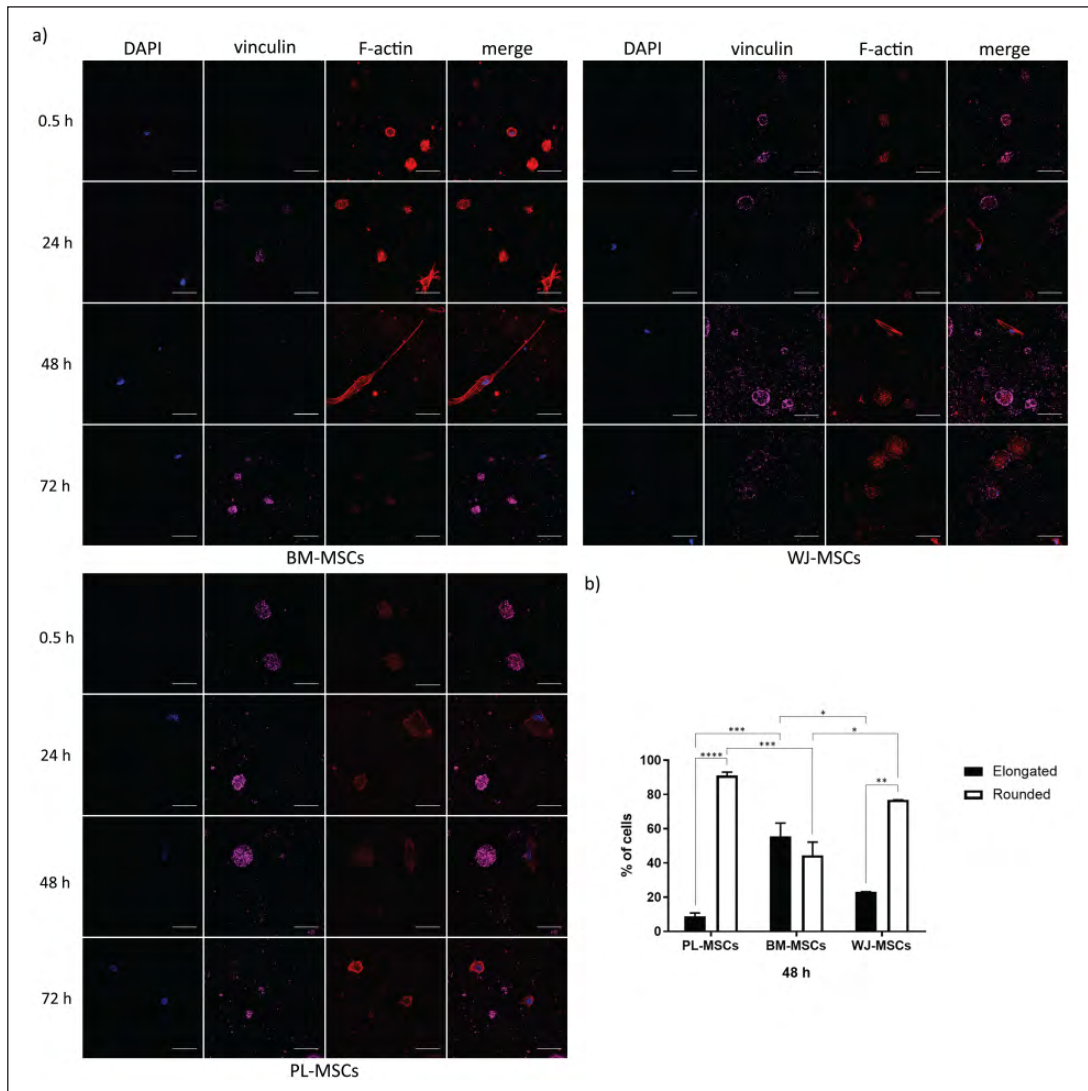


Figure 4. Temporal course of vinculin and actin distribution in MSCs cultured in fibrin hydrogels. (a) Cells were cultured in fibrin hydrogels for 0.5 h, 1, 2, and 3 days, fixed and stained for nuclei (blue), F-actin (red), and vinculin (magenta). In each case, two phenotypes can be observed: round-shaped cells positive for vinculin, and elongated cells negative for the marker. Representative confocal micrographs are shown. Bars represent 50 μ m. (b) Graph showing the percentages of elongated and round-shaped cells in MSCs cultured in fibrin hydrogels for 2 days. Bars indicate standard errors of the media of three experiments, and 75 cells on average per sample were counted ($n = 3$). * $p = 0.0204$, ** $p = 0.0011$, *** $p = 0.0007$, and **** $p < 0.0001$. PL-MSCs: placenta mesenchymal stem cells; BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; WJ-MSCs: Wharton's jelly mesenchymal stem cells.

the “Materials and methods” section (see Supplemental Figure S3). The percentages of total degraded areas are shown in Figure 6(c).

In 2-day cultures and in the absence of inhibitors, MSCs from the three tissues were capable of generating lytic zones, which at 7 days reflected different lytic rates (see Figure 6(a)–(c)). Without inhibitors, PL-MSCs almost completely degraded the hydrogel ($90.81\% \pm 1.88\%$), leaving only traces, whereas BM-MSCs and WJ-MSCs generated limited lysis (BM-MSCs, $17.72\% \pm 0.67\%$; WJ-MSCs, $22.1\% \pm 2.58\%$), and these differences were significant (see Figure 6(b) and (c)). The high degradation generated in hydrogels seeded with PL-MSCs could not

be diminished by BB-94, as the degraded area was approximately $88.04\% \pm 0.97\%$, while tranexamic acid and aprotinin decreased it two- and sixfold, respectively (TA: $58.98\% \pm 6.79\%$; Ap: $16.19\% \pm 0.33\%$) (see Figure 6(c)). Thus, aprotinin was the most efficient inhibitor and BB-94 the least. These observations were repeated with hydrogels seeded with WJ-MSCs and BM-MSCs, although the differences compared with hydrogels without inhibitors were not significant. Among the three combinations of inhibitors used, the one with the strongest effect was aprotinin/tranexamic acid (PL-MSCs, $8.69\% \pm 2.19\%$; BM-MSCs, $7.81\% \pm 0.47\%$; WJ-MSCs, $14.44\% \pm 1.85\%$).

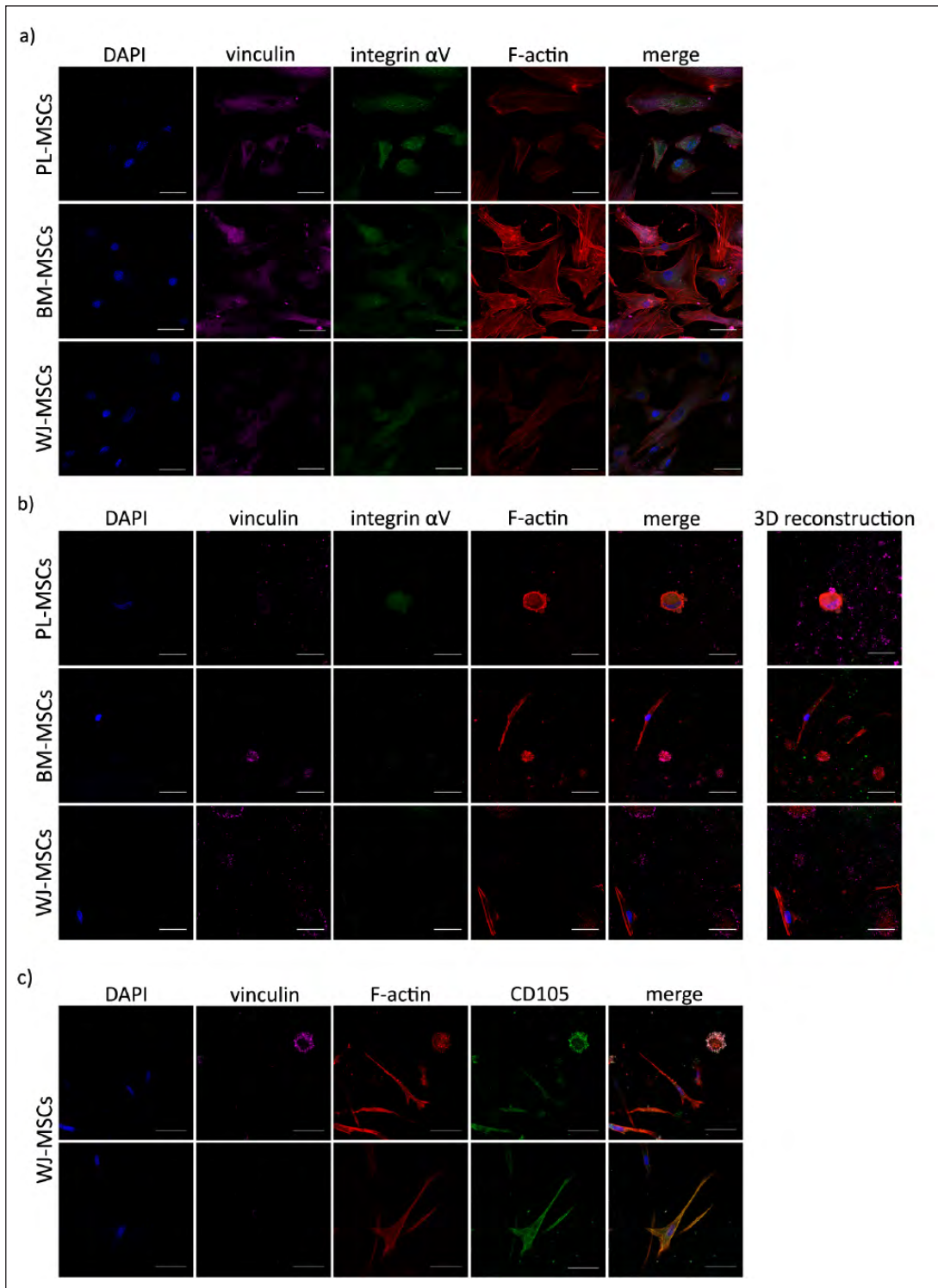


Figure 5. Presence of integrin α V in MSCs cultured in 3D fibrin hydrogel and 2D. (a) Integrin α V detection in MSCs cultured as monolayer on glass coverslips for 48 h. Cells were fixed and stained for nuclei (blue), actin (red), vinculin (magenta), and integrin α V (green). In each case, integrin α V was detected in FAs, where it partially colocalized with F-actin and vinculin. (b) Integrin α V detection in MSCs cultured in fibrin hydrogels for 48 h. Cells were fixed and stained for nuclei (blue), actin (red), vinculin (magenta), and integrin α V (green). Integrin α V was detected in some elongated and round-shaped cells; 3D reconstructions are displayed (see Supplemental Videos S1–S3). (c) CD105 marker in WJ-MSCs cultured in fibrin. Cells were fixed and stained for nuclei (blue), actin (red), vinculin (magenta), and CD105 (green). CD105 was detected in elongated and round-shaped cells. This was also observed in PL-MSCs and BM-MSCs (data not shown). (a)–(c), representative confocal micrographs are shown. PL-MSCs: placenta mesenchymal stem cells; BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; WJ-MSCs, Wharton’s jelly mesenchymal stem cells. Bars represent 50 μ m.

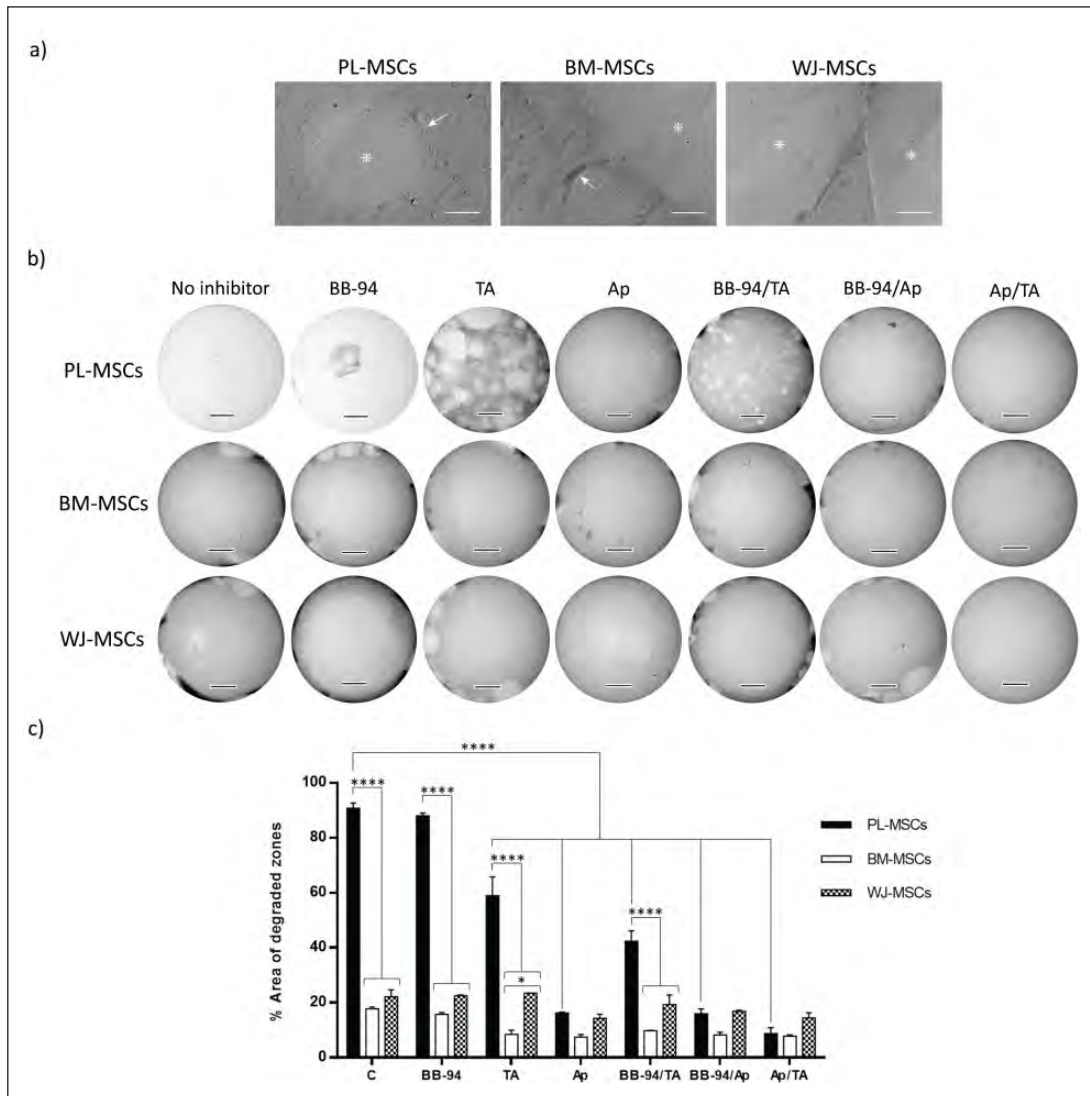


Figure 6. Fibrinolysis by MSCs. (a) Cells seeded in fibrin gels generated hydrolysis at 48 h of culture. Images show degraded zones (*) and cells (arrows). Bars represent 50 μm . (b) Cells seeded in fibrin gels in the presence or absence of inhibitors—Ap (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), TA (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), BB-94 (5 μM), and their combinations—generated distinct levels of hydrolysis at 7 days of culture. Bars represent 3 mm. (c) Semi-quantification of total area of degraded zones done by MSCs in the presence or absence of inhibitors. Bars indicate standard errors of two experiments ($n = 2$). * $p = 0.0104$ and **** $p < 0.0001$. PL-MSCs: placenta mesenchymal stem cells; BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; WJ-MSCs: Wharton’s jelly mesenchymal stem cells; TA: tranexamic acid; Ap: aprotinin.

Discussion

In 2006, the ISCT established the minimal criteria for MSCs identity, principally for BM-MSCs.⁹ However, in the last few years, new tissue sources and characteristics have emerged for MSCs. MSCs have been isolated from PL, umbilical cord, AT, and dental pulp. Although research in tissue engineering and regenerative medicine has mainly been performed with BM-MSCs, as they continue to be the gold standard, there is a high potential to consider other sources because of the accessibility for their isolation.

As others have stated, MSCs isolated from various tissues may behave differently in certain contexts,^{10,28,32} and this is important if they are intended to be used for cellular

therapy. The aim of this work was to understand the biology of the MSCs by comparing the viability, adhesion, and fibrinolytic activities of PL-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs cultured in fibrin hydrogels from nonpurified plasma. Our results shed a light on MSCs behavior in a physiological microenvironment, and this is the first time that the adhesion and fibrinolytic activity of MSCs isolated from different tissues are compared in fibrin hydrogels generated from nonpurified plasma.

BM-MSCs, WJ-MSCs, and PL-MSCs used in this study shared the expected immunophenotype and the capability to differentiate *in vitro* to mesodermal lineages, as well as to adhere to plastic tissue culture (see Table 1 and Figure 1).

Moreover, viability assays in 2D (on glass coverslips) and in 3D (fibrin hydrogels) with LIVE/DEAD staining showed that MSCs isolated from the three tissues were viable in both contexts at similar rates (>90%) (see Figure 2). As noted previously, two other phenomena were revealed with this assay: the different cellular morphologies in fibrin hydrogels and the greater degradation capability of PL-MSCs than MSCs from BM and WJ. LIVE/DEAD staining has been used in the past as an indirect method to evaluate adhesion and proliferation, as cell elongation is necessary for both cell activities. Ho et al.¹⁶ observed that BM-MSCs morphology and proliferation in fibrin hydrogels (prepared with purified fibrinogen) were dependent on fibrinogen concentration. BM-MSCs cultured in fibrin hydrogels prepared with 5 mg/mL of fibrinogen were spindle-shaped and proliferating, while those seeded in 50 mg/mL gels stayed rounded and nonproliferating, even after 12 days of culture. Although our fibrin hydrogels have 2.925 ± 0.15 mg/mL of fibrinogen (prepared with nonpurified plasma), most of the PL-MSCs had round shape, while a mixed population of elongated and round-shaped cells was found in BM-MSCs and WJ-MSCs. The different behavior of the cells reveals the potential clinical relevance of the sources used, being necessary to be considered for future studies. Moreover, we explored cell adhesion by analyzing the presence of two FA proteins, vinculin and integrin αV , in 2D and 3D contexts. PL-MSCs, WJ-MSCs, and BM-MSCs cultured in 2D had vinculin in FAs, and this detection increased with time in culture (see Figure 3). Focal complexes, FAs, fibrillar adhesions, and 3D matrix adhesions are multiprotein structures mediating cell–ECM interactions.³³ In 2D cultures, FAs connect the actin cytoskeleton to ECM through integrins, and it has been stated that substrate rigidity alters the molecules involved. Vinculin is a mechanosensory protein that is activated by a rigid substrate and then recruited to FAs.³⁴ Van Tam et al.³⁵ demonstrated that BM-MSCs exhibited FAs rich in vinculin, talin, and paxillin when seeded on a substrate made of polycaprolactone with rigidity ranging from 0.9 to 133 MPa, but not in Matrigel, a soft substrate. Here, PL-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs had a similar capability to form vinculin-positive FAs in 2D cultures.

In every case, MSCs cultured in fibrin hydrogels exhibited two phenotypes. In the first phenotype, cells showed an elongated morphology with stress fibers (BM-MSCs and WJ-MSCs) or with a disorganized actin cytoskeleton (PL-MSCs), without detection of vinculin (see Figure 4). In the second phenotype, the morphology was rounded, with aggregates of F-actin, as phalloidin staining only marks actin filaments, and vinculin showed a diffuse distribution, but only PL-MSCs had lamellipodia (see Figures 4(a) and 5(b), and Supplemental Videos S1–S3). Vinculin presence in FAs has been questioned in the past due to a low or null detection in soft scaffolds, such as collagen hydrogels or Matrigel.^{22,35} Van Tam et al.³⁵ found that

BM-MSCs seeded on Matrigel were able to spread and migrate inside it, but cells did not have vinculin, talin, nor paxillin. In addition, vinculin null detection in elongated cells may be explained by a lack of rigidity in the substrate, as poor mechanical strength for whole fibrin hydrogels from purified fibrinogen (<1 kPa) has been reported.³⁶ Our results contrast with the ones reported by Hakkinen et al.,²⁴ who observed vinculin-positive FAs in fibroblasts cultured in fibrin hydrogels (purified fibrinogen) and other matrices. It should be mentioned that the dermal fibroblasts they used might behave differently from MSCs in the same microenvironment, and the fibrin hydrogels they used and ours represent two distinct scaffolds. Fibers from hydrogels prepared with nonpurified plasma have thicker and softer fibers than those from purified fibrinogen.³⁷ In our system, fibrin hydrogel rigidity depends not only on its origin (nonpurified plasma) but also on fibrinolysis carried out by MSCs, especially by PL-MSCs, which will be discussed later. It must be considered that vinculin null detection does not rule out the existence of FAs, as other proteins such as paxillin and talin may be present, which needs further investigation.

Round-shaped cells found in our system have been reported for undifferentiated MSCs. Ho et al.¹⁶ published that BM-MSCs cultured in fibrin hydrogels prepared with a high purified fibrinogen concentration adopted a rounded morphology, but they did not assess FA protein presence. However, MSC cytoskeletal instability has been associated with adipogenesis and chondrogenesis.^{25,38,39} In respect to chondrogenesis, it has been reported that BM-MSCs cultured for 7 days in agarose hydrogels in the presence of an inductor media showed a rounded morphology and diffuse marks for vinculin, actin, vimentin, and tubulin proteins.⁴⁰ Because agarose lacks arginine–glycine–aspartic acid (RGD) sites, the authors claim that MSCs cannot adhere to it, so they do not spread and generate their pericellular matrix, rich in collagen and proteoglycans. Moreover, BM-MSCs chondrogenesis in agarose hydrogels has been inhibited through RGD–integrin adhesion dependent on cytoskeletal organization.⁴¹ The round-shaped cells we found could be later used for chondrogenic differentiation under adequate chemical stimulus, as plasma carries many growth factors that may induce the overexpression of chondrogenic markers, which should be investigated further. Considering that PL-MSCs also presented round-shaped cells that do not match the previous phenotype (lamellipodia formation), the MSCs source might be affecting how they interact with the fibrin hydrogel. In fact, only PL-MSCs completely degraded the hydrogel and formed a monolayer on the tissue culture capable of adhering through FAs (see Supplemental Figure S1).

Because our hydrogel has RGD sites, the behavior of the cells might be related to recognition by integrins. RGD clustering in hyaluronic acid hydrogels induced cell spreading and modulation of integrin expression in mouse

MSCs.⁴² Various integrins recognize RGD sites, such as $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$, $\alpha 5\beta 1$, and $\alpha 11\beta 3$, although $\alpha V\beta 3$ has the best affinity.⁴³ In 2D cultures, MSCs from the three different sources had the ability to form FAs in which integrin αV colocalized with vinculin and actin (see Figure 5(a)). In contrast, in hydrogels, integrin αV was only found in some elongated and round-shaped cells in cultures from BM-MSCs and PL-MSCs, but was low to null in elongated cells from WJ-MSCs, even though FAs were absent (see Figure 5(b), Supplemental Figure S2, and Supplemental Videos S1–S3). Apparently, integrin αV is unnecessary for MSCs adhesion to fibrin hydrogel; however, other integrins may have a role or cells might interact with the scaffold through another adhesion mechanism, such as recognition of haptides.⁴⁴ Khetan et al.²⁵ demonstrated that hyaluronic acid hydrogel degradation by BM-MSCs was necessary for them to adhere, generate traction forces, and differentiate toward an osteogenic phenotype. As the percentages of elongated and round-shaped cells varied among MSCs, this may reflect the kind of activity they are developing in the hydrogel. It can be suggested that some cells seeded in fibrin hydrogels can adhere, generate traction forces, and spread, while those who cannot stay rounded, even though they would interact with the scaffold. It has been reported that MSC seeded in scaffolds, consisting of fibers, must adhere to, pull, and remodel fibers in order to spread.^{45, 46} Moreover, BM-MSCs and WJ-MSCs degradation rates are minimum, allowing some cells to attach and elongate. On the other hand, high fibrinolysis generated by PL-MSCs loosens the hydrogel, limiting the attaching sites, which may cause an impaired spreading and the maintenance of the round shape of the cells.

In vivo, fibrinogen polymerization is a biological process consequence of hemostasia, and fibrinolysis is the counterpart occurring after the blood clot is no longer needed. The principal fibrinolytic enzyme is plasmin, which happens to be a zymogen found in plasma activated by uPA and tPA.^{14, 47} Fibrin hydrogel polymerization appears to represent the last part of the coagulation cascade. Fibrin hydrogel degradation by MSCs has been reported for BM-MSCs, but not for WJ-MSCs and PL-MSCs.^{26, 27, 48} Blood plasma carries many proteins, such as coagulation factors, complement proteins, cytokines, lipoproteins, albumin, hemoglobin, fibronectin, and growth factors, as platelet-derived growth factor (PDGF).^{49, 50} In contrast to hydrogels prepared with purified fibrinogen, nonpurified plasma may bring along many of these proteins. Although it is not known which growth factors or cytokines induce the phenotypes observed, PDGF may have a role in fibrinolysis. It has been reported that therapeutically noneffective AT-MSCs from diabetic patients presented diminished proliferation, migration, homing to the wound bed, and an overall increased profibrotic phenotype, all rescued with the exposure to PDGF-two B subunits (PDGF-BB).⁵¹ Specifically, PDGF-BB increased fibrinolytic activity of AT-MSCs from donors

and diabetic patients, although diabetic cells were less sensitive to the treatment.⁵¹ However, this must be confirmed in MSCs isolated from other tissues, like those used in this work.

Here, we evaluated MSCs fibrinolytic activity after culturing them for 7 days in fibrin hydrogels in the absence or presence of the inhibitors BB-94, aprotinin, tranexamic acid, and their combinations. Later, total degraded areas were quantified by software. It must be considered that this evaluation gives us limited quantification for two reasons. First, the images were taken at 8 \times , so the software may be depreciating the smallest degraded zones. Second, it does not consider the gel volume. Nonetheless, it offers an idea of the observed lysis. As shown in Figure 6(a), lysis can be appreciated as holes (BM-MSCs in the presence of BB-94) and cavities (WJ-MSCs in the presence of BB-94), which may be a result of the differential presence and activity of the fibrinolytic enzymes and their regulators involved. Our results showed that MSCs from different sources hydrolyzed fibrin at different rates and that this activity was best inhibited by the combination of aprotinin–tranexamic acid in every case (see Figure 6).

BB-94 is a general metalloprotease inhibitor, and the other two inhibit the plasminogen–plasmin axis. Tranexamic acid is a lysin analog that joins the binding sites of plasminogen/plasmin to fibrin, while aprotinin inhibits plasmin and other serine proteases. Considering that BM-MSCs were reported to not express plasmin,²⁷ it was possible that MSCs secreted other fibrinolytic enzymes. Thus, as others have stated, these enzymes include metalloproteases MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-13, MT1-MMP, MT2-MMP, and MT3-MMP,⁵² which are expressed by BM-MSCs, traumatized muscle MSCs (TM-MSCs), and AT-MSCs.⁵³ As BB-94 was the least inhibitor of MSCs fibrinolysis, it can be suggested that MMPs have little or no effect and that the plasminogen–plasmin axis principally accounts for it. Considering that aprotinin decreased fibrinolysis more than tranexamic acid, the participation of other enzymes aside from plasmin cannot be ruled out. According to Neuss et al.,²⁷ BM-MSCs hydrolyze fibrin gels (from purified fibrinogen) twofold compared with dermal fibroblasts, and they express uPA, tPA, PAI-1, and uPAR. It has been reported that a high basal expression of PAI-1 and a low expression of cathepsins B and D by WJ-MSCs decreased their capability to migrate through Matrigel, which is opposite to BM-MSCs and PL-MSCs.²⁸ Although fibrin hydrogel composition differs from Matrigel, PAI-1 expression was directly responsible for diminished MSCs migration capability, which is indirectly related to lower hydrogel degradation. In this work, the differential rate of fibrinolysis by distinct types of MSCs could be a consequence of differential regulation of the plasminogen–plasmin axis and the expression of other fibrinolytic enzymes, such as cathepsins B and D, which should be further investigated.

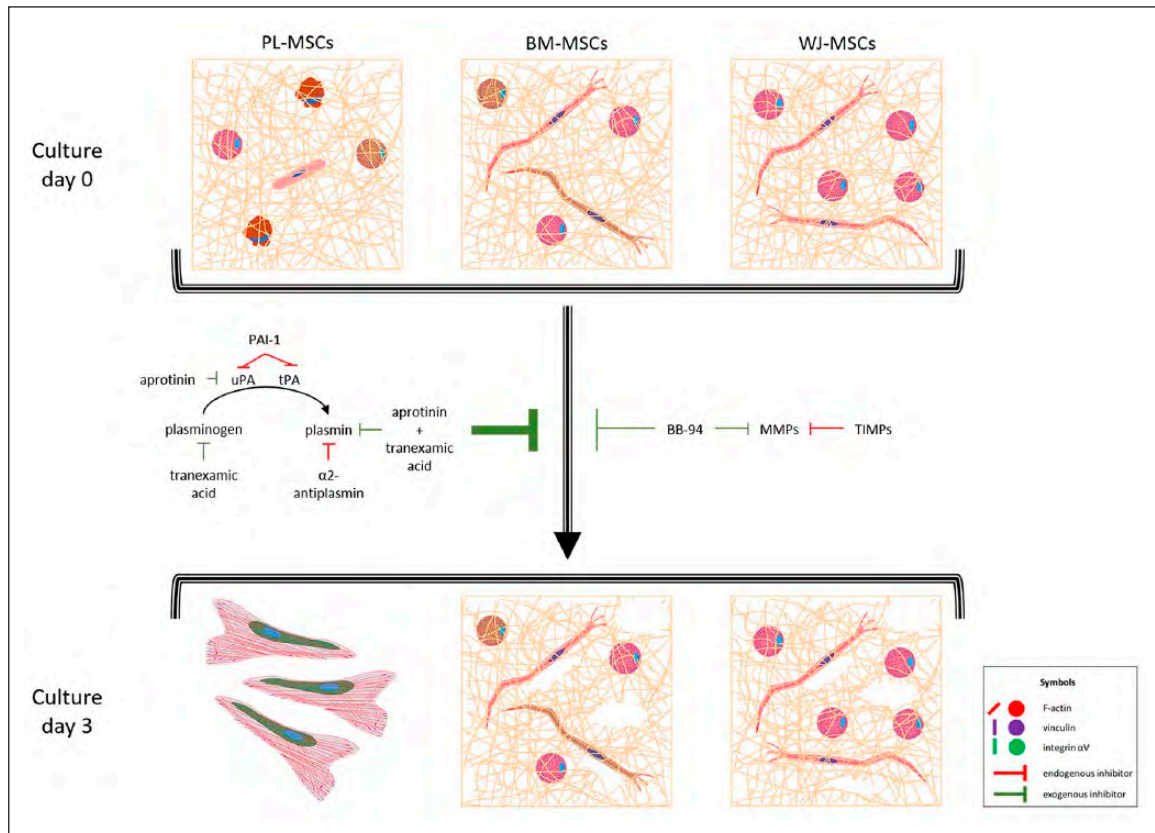


Figure 7. MSCs adhesion to fibrin hydrogels and fibrinolysis effect. MSCs from the three tissues cultured in fibrin hydrogels exhibited elongated and round phenotypes, with actin in filaments or aggregates, respectively. Vinculin and integrin αV were not necessary for adhesion, as they were absent in FAs, and only some cells were positive for both proteins. Proportions of elongated and round-shaped cells varied between the three types of MSCs accordingly to their capabilities to degrade fibrin hydrogel. PL-MSCs were rounded in $>90\%$, degraded the hydrogel completely, and generated a monolayer with FAs rich in vinculin (see Supplemental Figure S1), and were positive probably for integrin αV (as it was shown in 2D cultures, see Figure 5). BM-MSCs and WJ-MSCs degraded fibrin in a limited way, and after 3 days they still gathered inside it. In all cases, aprotinin and tranexamic inhibited fibrinolysis more than BB-94, meaning that it was done principally via the plasminogen–plasmin axis. uPA: urokinase plasminogen activator; tPA: tissue plasminogen activator; PAI-I: plasminogen activator inhibitor I; MMPs: metalloproteases; TIMPs: tissue inhibitors of metalloproteases.

Although it is not known why MSCs from distinct tissues cultured in fibrin hydrogels show different morphologies, adhesion, and fibrinolytic rates, those activities might be related. To survive, MSCs need to adhere to a substrate, and its rigidity will determine the adhesion strength. Fibrin hydrogel is a soft substrate that cannot support a strong adhesion, although it allows for some cells to adhere and spread. In the case of PL-MSCs, elongated cells were in a very low percentage and possessed a disorganized cytoskeleton, meaning that fibrinolysis affected substrate mechanical properties. This might have therapeutic significances. For instance, round-shaped cells with cytoskeleton instability and no lamellipodia had a similar phenotype to MSCs observed in chondrogenesis,^{18,40} and these were more prevalent in WJ-MSCs. In another, BM-MSCs deficient in fibrinolysis remodeling (MSCs $PTX3^{-/-}$) presented a diminished implantation in cutaneous wound beds, and therefore a delay in wound healing.⁴⁸ In addition, some diabetic patients developed distal

microthrombosis after an autologous transplantation of AT-MSCs, which is related to a low fibrinolytic activity in vitro compared to nondiabetic cells.⁵⁴ Because PL-MSCs degraded the most, they may be good candidates for wound healing therapy. On the other hand, it must be considered that in vivo WJ-MSCs are embedded in a connective fetal tissue surrounding and protecting umbilical cord vessels, while BM and PL-MSCs support hematopoiesis and vasculogenesis.⁵⁵ The differences in their physiological roles may be related with their behavior in our work; however, their participation in thrombosis or fibrinolysis in vivo has not been studied.^{56,57}

Taken together, our results showed that PL-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs shared the characteristics established for MSCs identity; they formed FAs rich in vinculin and integrin αV in 2D; and they behaved differently when cultured in fibrin hydrogels from nonpurified plasma (see Figure 7), as shown by FA analysis. Cellular spreading was a vinculin independent phenomenon, and it is not clear if

vinculin is participating in rounded cell adhesion, even though they did not require the presence of integrin α V. Moreover, PL-MSCs degraded fibrin hydrogel more than BM-MSCs and WJ-MSCs. This is the first time that adhesion and fibrinolysis were compared for three different sources of MSCs, and the differences observed are remarkable. If the phenotypes displayed by MSCs in a natural environment do relate to specific behaviors that could be directed to cartilage and bone tissue engineering, or to chronic wound repair according to its source, this should be a theme for future works.

Conclusion

MSCs isolated from BM, PL, and WJ shared a similar immunophenotype, mesodermal differentiation capabilities, spindle-shape morphology, and FAs in 2D cultures, in contrast to their behaviors in fibrin hydrogels. There, MSCs did not form FAs rich in vinculin or integrin α V, exhibited different phenotypes, and were able to degrade fibrin hydrogels at different rates, principally through the plasminogen–plasmin axis. Our findings denote tissue-specific capabilities regarding the culture in a physiological microenvironment, which is necessary to take into consideration when different sources of MSCs are included for cellular therapy, tissue engineering, and regenerative medicine.

Acknowledgements

The authors would like to thank Marta Castro Manreza for her knowledge of mesenchymal stem cells (MSCs), María José Gomora Herrera and José Alfredo Jimenez for their technical support in confocal microscopy, and Katia Jarquín Yáñez and Sara Judith Alvarez Pérez for their technical support.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: The present study was conducted under the financial support of PAPIIT-DGAPA-UNAM (IN218315, IN108116, and IN22316). This article is a requisite for the obtainment of a PhD degree for MSc Casandra Paulina Chaires-Rosas, who received academic support from Biological Sciences Postgraduate program, UNAM, and financial support from CONACYT (263778). Dr Xóchitl Ambríz was supported by a postdoctoral scholarship from DGAPA-UNAM (2016–2018) and Faculty of Medicine (UNAM).

ORCID iDs

Javier R Ambrosio  <https://orcid.org/0000-0001-7441-0609>
 Andrés Castell-Rodríguez  <https://orcid.org/0000-0003-2881-2759>

Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

References

1. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng* 2007; 13(6): 1299–1312.
2. Liu L, Yu Y, Hou Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PLoS ONE* 2014; 9(2): e88348.
3. Mehanna RA, Nabil I, Attia N, et al. The effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their conditioned media topically delivered in fibrin glue on chronic wound healing in rats. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 846062.
4. Arno AI, Amini-Nik S, Blit PH, et al. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(1): 28.
5. Chen L, Tredget EE, Wu PY, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE* 2008; 3(4): e1886.
6. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 2008; 180(4): 2581–2587.
7. Sivamani RK, Schwartz MP, Anseth KS, et al. Keratinocyte proximity and contact can play a significant role in determining mesenchymal stem cell fate in human tissue. *FASEB J* 2011; 25(1): 122–131.
8. Zhang J, La X, Fan L, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell transplantation in rat burn models. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(5): 5129–5136.
9. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–317.
10. Castro-Manreza ME, Mayani H, Monroy-García A, et al. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem Cells Dev* 2014; 23(11): 1217–1232.
11. Iohara K, Zheng L, Ito M, et al. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells* 2006; 24(11): 2493–2503.
12. Li X, Bai J, Ji X, et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med* 2014; 34(3): 695–704.
13. Janmey PA, Winer JP and Weisel JW. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J R Soc Interface* 2009; 6(30): 1–10.
14. Li Y, Meng H, Liu Y, et al. Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. *Sci World J* 2015; 2015: 685690.

15. Brueckers SM, Jaspers M, Hendriks JM, et al. Fibrin-fiber architecture influences cell spreading and differentiation. *Cell Adh Migr* 2016; 10(5): 495–504.
16. Ho W, Tawil B, Dunn JC, et al. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng* 2006; 12(6): 1587–1595.
17. O’Cearbhaill ED, Murphy M, Barry F, et al. Behavior of human mesenchymal stem cells in fibrin-based vascular tissue engineering constructs. *Ann Biomed Eng* 2010; 38(3): 649–657.
18. Steward AJ, Thorpe SD, Vinardell T, et al. Cell-matrix interactions regulate mesenchymal stem cell response to hydrostatic pressure. *Acta Biomater* 2012; 8(6): 2153–2159.
19. Calzada-Contreras A, Moreno-Hernández M, Castillo-Torres NP, et al. Valores de referencia para las pruebas de coagulación en México: utilidad de la mezcla de plasma de donadores de sangre. *Revista Invest Clin* 2012; 64: 437–443.
20. Llamas S, Del Río-Nechaevsky M, Larcher F, et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation as a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004; 7: 350–355.
21. Barreda L, Marcet I, Llamas S, et al. Human plasma gels: their preparation and rheological characterization for cell culture applications in tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* 2019; 89: 107–113.
22. Harunaga JS and Yamada KM. Cell-matrix adhesions in 3D. *Matrix Biol* 2011; 30: 363–368.
23. Rahman A, Carey SP, Kraning-Rush CM, et al. Vinculin regulates directionality and cell polarity in 2D, 3D matrix and 3D microtrack migration. *Mol Biol Cell*. Epub ahead of print 9 March 2016. DOI: 10.1091/mbc.E15-06-0432.
24. Hakkinen KM, Harunaga JS, Doyle AD, et al. Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(5–6): 713–724.
25. Khetan S, Guvendiren M, Legant WR, et al. Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels. *Nat Mater* 2013; 12(5): 458–465.
26. Copland IB, Lord-Dufour S, Cuerquis J, et al. Improved autograft survival of mesenchymal stromal cells by plasminogen activator inhibitor 1 inhibition. *Stem Cells* 2009; 27(2): 467–477.
27. Neuss S, Schneider RK, Tietze L, et al. Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. *Cells Tissues Organs* 2010; 191(1): 36–46.
28. Li G, Zhang XA, Wang H, et al. Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: implication in the migration. *Proteomics* 2009; 9: 20–30.
29. Montesinos JJ, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, et al. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy* 2009; 11(2): 163–176.
30. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton’s jelly. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2012; 48(2): 75–83.
31. Kohli N, Wright KT, Sammons RL, et al. An in vitro comparison of the incorporation, growth, and chondrogenic potential of human bone marrow versus adipose tissue mesenchymal stem cells in clinically relevant cell scaffolds used for cartilage repair. *Cartilage* 2015; 6(4): 252–263.
32. Miranda JP, Filipe E, Fernandes AS, et al. The human umbilical cord tissue-derived MSC population UCX(®) promotes early motogenic effects on keratinocytes and fibroblasts and G-CSF-mediated mobilization of BM-MSCs when transplanted in vivo. *Cell Transplant* 2015; 24(5): 865–877.
33. Li Z, Lee H and Zhu C. Molecular mechanisms of mechanotransduction in integrin-mediated cell-matrix adhesion. *Exp Cell Res* 2016; 349(1): 85–94.
34. Liu Z, Bun P, Auduge N, et al. Vinculin head-tail interaction defines multiple early mechanisms for cell substrate rigidity sensing. *Integr Biol (Camb)* 2016; 8(6): 693–703.
35. Van Tam JK, Uto K, Ebara M, et al. Mesenchymal stem cell adhesion but not plasticity is affected by high substrate stiffness. *Sci Tech Adv Mater* 2012; 13: 064205.
36. Brueckers SMC, Bao M, Hendriks JMA, et al. Adaptation trajectories during adhesion and spreading affect future cell states. *Sci Rep* 2017; 7(1): 12308.
37. Li W, Sigley J, Pieters M, et al. Fibrin fiber stiffness is strongly affected by fiber diameter, but not by fibrinogen glycation. *Biophys J* 2016; 110: 1400–1410.
38. Kim IL, Khetan S, Baker BM, et al. Fibrous hyaluronic acid hydrogels that direct MSC chondrogenesis through mechanical and adhesive cues. *Biomaterials* 2013; 34(22): 5571–5580.
39. Mathieu PS and Lobo EG. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18(6): 436–444.
40. Steward AJ, Wagner DR and Kelly DJ. The pericellular environment regulates cytoskeletal development and the differentiation of mesenchymal stem cells and determines their response to hydrostatic pressure. *Eur Cell Mater* 2013; 25: 167–178.
41. Connelly JT, Garcia AJ and Levenston ME. Interactions between integrin ligand density and cytoskeletal integrity regulate BMSC chondrogenesis. *J Cell Physiol* 2008; 217(1): 145–154.
42. Lam J and Segura T. The modulation of MSC integrin expression by RGD presentation. *Biomaterials* 2013; 34(16): 3938–3947.
43. Kapp TG, Rechenmacher F, Neubauer S, et al. A comprehensive evaluation of the activity and selectivity profile of ligands for RGD-binding integrins. *Sci Rep* 2017; 7: 39805.
44. Levy-Beladev L, Levdansky L, Gaberman E, et al. A family of cell-adhering peptides homologous to fibrinogen C-termini. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 401(1): 124–130.
45. Baker BM, Trappmann B, Wang WY, et al. Cell-mediated fibre recruitment drives extracellular matrix mechanosensing in engineered fibrillar microenvironments. *Nat Mater* 2015; 14(12): 1262–1268.
46. Xie J, Bao M, Brueckers SMC, et al. Collagen gels with different fibrillar microarchitectures elicit different cellular responses. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017; 9(23): 19630–19637.
47. Hudson NE. Biophysical mechanisms mediating fibrin fiber lysis. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 2748340.

48. Cappuzzello C, Doni A, Dander E, et al. Mesenchymal stromal cell-derived PTX3 promotes wound healing via fibrin remodeling. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 293–300.
49. Anderson NL and Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1(11): 845–867.
50. Tahara A, Yasuda M, Itagane H, et al. Plasma levels of platelet-derived growth factor in normal subjects and patients with ischemic heart disease. *Am Heart J* 1991; 122(4 Pt 1): 986–992.
51. Capilla-Gonzalez V, Lopez-Beas J, Escacena N, et al. PDGF restores the defective phenotype of adipose-derived mesenchymal stromal cells from diabetic patients. *Molec Ther* 2018; 26(11): 2696–2709.
52. Hotary KB, Yana I, Sabeh F, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes. *J Exp Med* 2002; 195(3): 295–308.
53. Lozito TP, Jackson WM, Nesti LJ, et al. Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs. *Matrix Biol* 2014; 34: 132–143.
54. Acosta L, Hmadcha A, Escacena N, et al. Adipose mesenchymal stromal cells isolated from type 2 diabetic patients display reduced fibrinolytic activity. *Diabetes* 2013; 62(12): 4266–4269.
55. Bongso A and Fong CY. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2013; 9(2): 226–240.
56. Fajardo-Orduna GR, Mayani H and Montesinos JJ. Hematopoietic support capacity of mesenchymal stem cells: biology and clinical potential. *Arch Med Res* 2015; 46(8): 589–596.
57. Wang Y and Zhao S. Vascular biology of the placenta. San Rafael, CA: Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.