



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

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS BJ HACIA CÉLULAS
PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS IPSC Y AISLAMIENTO DE MIOFIBROBLASTOS
A PARTIR DE UNA CICATRIZ HIPERTRÓFICA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

BIÓL. ROMERO CHAVESTE ADRIÁN JAVIER

**TUTOR PRINCIPAL: DR. CABRERA WROOMAN ALEJANDRO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

**REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS BJ HACIA CÉLULAS
PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS IPSC Y AISLAMIENTO DE MIOFIBROBLASTOS
A PARTIR DE UNA CICATRIZ HIPERTRÓFICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ROMERO CHAVESTE ADRIÁN JAVIER

TUTOR PRINCIPAL: DR. CABRERA WROOMAN ALEJANDRO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2023

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/546/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **08 de mayo de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **ROMERO CHAVESTE ADRIÁN JAVIER** con número de cuenta **309210340** con la tesis titulada **“REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS BJ HACIA CÉLULAS PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS iPSC Y AISLAMIENTO DE MIOFIBROBLASTOS A PARTIR DE UNA CICATRIZ HIPERTRÓFICA”**, realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO CABRERA WROOMAN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
Vocal: DR. DAVID GARCADIIEGO CÁZARES
Vocal: DRA. ITZEL ESCOBEDO ÁVILA
Vocal: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
Secretario: DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 28 de junio de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RCHT/EARR/rcht

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al CONACYT por otorgar la beca del Programa Nacional de Posgrados de Calidad. CVU:1101583

Al tutor principal Dr. Alejandro Cabrera Wrooman

Al comité tutor
Dr. Genaro Vázquez Victorio
Dr. Marco Velasco-Velázquez

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra"

Al Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra"

Al Laboratorio de Tejido Conjuntivo CENIAQ

Al Dr. Francisco Ferreira Aparicio del INR por proporcionar las muestras de paciente

A MIS PADRES, HERMANO, REGINA.

A MI FAMILIA

A MIS AMIGOS

A LOS MIEMBROS DEL LABORATORIO DE TEJIDO CONJUNTIVO DEL INR

Índice general

Lista de figuras

Resumen.....	01
Abstract.....	02
1. Introducción.....	03
1.1 Estructura de la piel.....	03
1.1.1 Epidermis.....	04
1.1.2 Dermis.....	05
1.1.2.1 Matriz extracelular.....	07
1.1.3 Hipodermis.....	09
1.2 Fibroblastos.....	10
1.3 Miofibroblastos.....	12
1.4 Lesiones en la piel y cicatrización.....	15
1.5 Cicatriz hipertrófica	18
1.6 Células Troncales.....	20
1.7 Células pluripotentes inducidas (iPSC)	22
1.7.1 Aplicaciones de las iPSC.....	23
2. Antecedentes.....	25
3. Hipótesis.....	25
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
5. Metodología.....	26
5.1 Obtención de la biopsia de paciente y cultivo primario.....	26
5.2 Inmunofluorescencia	27
5.3 Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF)	28
5.4 Pasaje celular de fibroblastos.....	29
5.5 Reprogramación celular de miofibroblastos obtenidos de paciente y células BJ	29
5.6 Ensayos de migración celular.....	30
5.7 Ensayo MTT	31
5.8 RT-PCR	32

5.9	Análisis estadístico.....	33
6.	Resultados.....	34
6.1	Aislamiento de miofibroblastos.....	34
6.2	Caracterización de miofibroblastos por inmunofluorescencia	34
6.3	Ensayo de migración celular	36
6.4	Ensayo de viabilidad celular MTT.....	38
6.5	Análisis de la expresión del mRNA de Colágena tipo I, α SMA y TGF β -1 por ensayos RT-PCR.....	39
6.6	Aislamiento de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF)	40
6.7	Reprogramación células BJ y miofibroblastos.....	41
7.	Discusión.....	42
8.	Conclusiones.....	46
9.	Referencias bibliográficas	47
10.	Anexo1: Información general experimental.....	59
11.	Anexo 2: Consentimiento informado.....	63

Lista de figuras.

Figura 1. Estructura de la piel humana.

Figura 2. Esquema de estructura de la epidermis.

Figura 3. Estructura de la dermis.

Figura 4. Estructuras supramoleculares de las colágenas

Figura 5. Estructura cuaternaria de la colágena.

Figura 6. La arquitectura de la piel 3D humana

Figura 7. Diagrama de un fibroblasto

Figura 8. La transdiferenciación de fibroblasto en miofibroblasto.

Figura 9. Proceso de cicatrización de una herida en la piel y los diferentes tipos de células involucradas.

Figura 10. Diferenciación de los miofibroblastos y la consecuencia de su persistencia.

Figura 11. Representación esquemática de la primera semana del desarrollo embrionario humano.

Figura 12. Diferenciación de una célula pluripotente.

Figura 13. Esquema del uso de células pluripotenciales inducidas iPSC para el modelado de enfermedades.

Figura 14. Obtención del cultivo primario y caracterización molecular de la línea celular proveniente de una biopsia de paciente con cicatriz hipertrófica.

Figura 15. Diagrama de trabajo para realizar la metodología de inmunofluorescencia.

Figura 16. Diagrama de trabajo para realizar la metodología de la obtención de células alimentadoras.

Figura 17. Diagrama de trabajo para realizar la metodología de reprogramación celular.

Figura 18. Diagrama de trabajo para realizar la metodología del ensayo de migración.

Figura 19. Diagrama de trabajo para realizar la metodología del ensayo de viabilidad celular MTT.

Figura 20. Diagrama de trabajo para realizar la metodología del ensayo de RT-PCR.

Figura 21. Microscopía de contraste de fases de Miofibroblastos obtenidos de biopsias de paciente.

Figura 22. Microscopía de fluorescencia de células BJ y miofibroblasto de Colágena tipo y α SMA, faloidina y TGF β -1.

Figura 23. Análisis estadístico de la expresión relativa de las proteínas α -SMA, Colágena tipo I, TGF β -1, y filamentos de actina (Faloidina).

Figura 24. Microscopía de contraste de fases en 10X del ensayo de migración de células BJ (control) izquierda y miofibroblastos derecha, en diferentes tiempos 0, 18, 24, 42 y 60 hrs.

Figura 25. Análisis estadístico del ensayo de “scratch” o migración celular. Se observan las medias del porcentaje de área disponible n=3 (BJ y miofibroblastos) en diferentes tiempos (0,18,24,42 y 60 hrs).

Figura 26. Análisis estadístico del ensayo MTT se observa una mayor actividad metabólica en células BJ con respecto a las células tipo miofibroblasto.

Figura 27. Ensayo PCR de cDNA de línea celular BJ y miofibroblastos para analizar la abundancia de Colagena tipo I, SMA y TGF β -1.

Figura 28. Cuantificación de la expresión relativa del ensayo RT-PCR en líneas celulares BJ y cultivo primario obtenido de paciente con cicatriz hipertófica (MIO) n=3.

Figura 29. (A) Embrion de Embrión de ratón Hembra Mus musculus (Balb/C) embarazada de 13.5 días de gestación. (B) Microscopia óptica de líneas celulares obtenidas a partir de los embriones.

Figura 30. Microscopia óptica de los cultivos transfectados de BJ con los factores de Yamanaka en diferentes tiempos. En total se obtuvieron 13 colonias de iPSC.

Figura 31. Microscopias ópticas y de fluorescencia de los cultivos transfectados de miofibroblastos con los factores de Yamanaka en diferentes tiempos.

Resumen

La piel humana es un órgano vital que protege al cuerpo de daños externos y regula la temperatura corporal. Sin embargo, cuando se produce una lesión, puede haber dificultades para recuperarse y puede resultar en una cicatriz hipertrófica. Las cicatrices hipertróficas son una respuesta exagerada del cuerpo a una lesión que se manifiesta como una cicatriz elevada y abultada en la piel.

Los fibroblastos son una de las principales células que componen a la dermis, cuando la piel sufre un daño, los fibroblastos sufren una transdiferenciación hacia miofibroblastos. Estas células son células encargadas de la formación de la matriz extracelular para realizar el cierre de una herida, si existen un descontrol en la inflamación y en la activación de los miofibroblastos estos generaran una cicatriz hipertrófica. Los miofibroblastos son las principales células presentes en una cicatriz hipertrófica, sintetizando en exceso colágena I y actina resultando en la formación de una cicatriz hipertrófica.

En este trabajo se obtuvieron biopsias de pacientes con cicatriz hipertrófica de 4mm de diámetro, para obtener cultivos primarios de miofibroblastos. Después de 20 días de cultivar la biopsia se comienzan a observar células con morfología correspondiente a miofibroblastos. Estas células fueron caracterizadas con marcadores específicos para miofibroblastos, como α -SMA, Col I, Actina y TGF β 1. Observamos un incremento en la expresión de RNA y de proteínas de los diferentes marcadores comparándolos con los fibroblastos, lo que nos demuestra que las células aisladas son miofibroblastos. Continuando con la caracterización de los miofibroblastos también realizamos ensayos funcionales midiendo viabilidad a través del ensayo MTT y migración celular por medio la técnica de herida. Reforzando los resultados anteriores observamos que los miofibroblastos presentan una menor migración que los fibroblastos y una viabilidad celular correcta.

Con el objetivo de entender mejor el mecanismo de como los fibroblastos se transdiferencian hacia miofibroblastos en el proceso de cicatrización, se reprogramaron fibroblastos de la línea BJ hacia células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) a través de la transfección de los factores de Yamanaka (OSKM) mediante la nucleofección. Después de 20 días se observaron colonias con morfología correspondiente a células troncales pluripotentes, estas se mantuvieron hasta su selección.

La diferenciación de los miofibroblastos hacia iPSC puede ser útil para estudiar la biología de estas células y su papel en diferentes procesos patológicos, como la fibrosis. Además, la obtención de iPSC a partir de los miofibroblastos puede ser útil para desarrollar terapias celulares personalizadas para tratar diferentes enfermedades.

Abstract

Human skin is a vital organ that protects the body from external damage and regulates body temperature. However, when an injury occurs, there may be difficulty in healing and it can result in a hypertrophic scar. Hypertrophic scars are an exaggerated response of the body to an injury that manifests as a raised and bulky scar on the skin. Fibroblasts are one of the main cells that compose the dermis, when the skin suffers damage, fibroblasts undergo transdifferentiation into myofibroblasts. These cells are responsible for the formation of the extracellular matrix to close a wound, if there is a lack of control in inflammation and activation of myofibroblasts, they will generate a hypertrophic scar. Myofibroblasts are the main cells present in a hypertrophic scar, synthesizing excessive collagen I and actin resulting in the formation of a hypertrophic scar.

In this study, biopsies were obtained from patients with hypertrophic scars to obtain primary cultures of myofibroblasts, these cells were characterized through specific markers of myofibroblasts, such as α -SMA, Col I, Actin, and TGF β 1. We observed an increase in RNA and protein expression of different markers compared to fibroblasts, which demonstrates that the isolated cells are myofibroblasts. Continuing with the characterization of myofibroblasts, we also performed functional assays by measuring viability through the MTT assay and cellular migration using the scratch technique. Reinforcing the previous results, we observed that myofibroblasts have lower migration than fibroblasts and proper cellular viability.

In order to better understand the mechanism of how fibroblasts transdifferentiate into myofibroblasts in the healing process, fibroblasts from the BJ line were reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSCs) through transfection of the Yamanaka factors (OSKM) using nucleofection.

The differentiation of myofibroblasts into iPSCs can be useful to study the biology of these cells and their role in different pathological processes, such as fibrosis. Additionally, obtaining iPSCs from myofibroblasts can be useful for developing personalized cellular therapies to treat different diseases.

Introducción

1.1 Estructura de la piel.

El órgano más grande del ser humano es la piel, que está constituida por multicapas. Su biomasa corresponde al 16.6% de la masa corporal y ocupa una superficie de entre 1.6 y 2m². Proporciona una barrera física protectora entre el cuerpo y el medio ambiente, evitando pérdidas de agua y electrolitos, reduciendo la penetración de productos químicos y protegiendo contra microorganismos patógenos (Blair *et al.*, 2020).

La piel está formada por una estructura compleja que comprende tres capas, la más superficial la epidermis, una capa intermedia la dermis además de una capa profunda llamada hipodermis. (Figura 1). La piel presenta diferentes funciones como: la regulación de la temperatura corporal y proporciona vigilancia inmunológica. Contiene nervios sensoriales, autónomos y receptores sensoriales que detectan estímulos entrantes de tacto, vibración, presión, dolor y picazón (Lim, K., 2021).

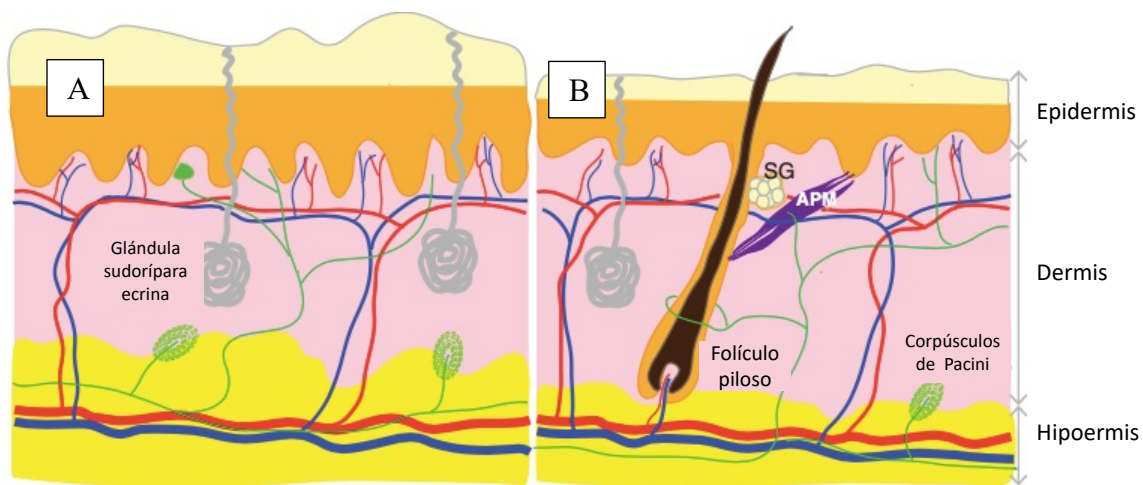


Figura 1. Estructura de la piel: (A) Piel gruesa (B) Piel delgada corpúsculos de Meissner y Pacini. APM: músculo erector del pelo, SG: glándula sebácea. Rojo: arteriola, azul: vénulas, verde: fibras nerviosas, corpúsculo de Meissner (cerca de la epidermis). Modificado de Xu et al., 2020.

1.1.1. Epidermis

El mantenimiento del número de células en la epidermis depende de un fino equilibrio entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular, ya que es la capa encargada de tener contacto con el ambiente exterior y por lo tanto está en constante renovación. La epidermis esta estratificada en capas basal, espinosa, granular y cornificada, se renueva continuamente el epitelio, por ejemplo, la epidermis humana se repone cada 4 semanas y muestra una diferenciación progresiva en una dirección de la zona basal a la superficial (Gonzales *et al.*, 2017).

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado compuesto por múltiples tipos de células, las cuales son derivadas de diferentes orígenes embrionarios: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. La estructura y función de la epidermis como cualquier otro tejido del cuerpo humano depende de diferentes procesos que son iniciados durante el desarrollo embrionario y que mayormente continúan en toda la vida con las células troncales basales de transición, las cuales son esenciales para una estratificación adecuada (Wang *et al.*, 2021).

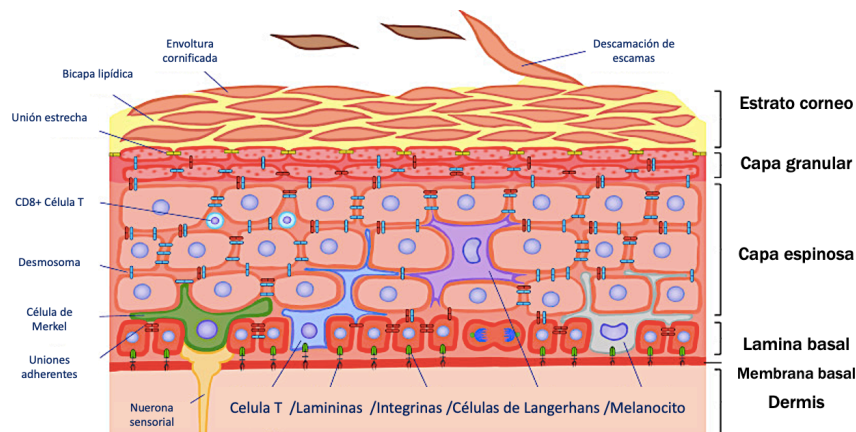


Figura 2. Esquema de estructura de la epidermis. Tomado y modificado de Gonzales *et al.*, 2017.

En la epidermis se encuentran células inmunitarias, células mecanosensoriales y melanocitos, lo que refleja la vital interacción de los queratinocitos con la microbiota presente en la superficie de la piel. La vida terrestre requiere una barrera cutánea que se autorrenueva, el grupo de Uberoi *et al.* (2021) han demostrado que la microbiota de la piel regula la reparación y la integridad de dicha barrera a través de la activación del receptor de hidrocarburos arílicos de los queratinocitos (AHR).

Los queratinocitos tienen un tamaño de 8-10 μm de diámetro, forman aproximadamente del 90 al 95% de las células epidermales y tienen origen embrionario de la parte superficial del ectodermo, formándose durante las primeras semanas del desarrollo, y se mantiene una población de células troncales de queratinocitos durante la ontogenia (Nanba D., 2019).

Las queratinas son marcadores de queratinocitos y otras células epiteliales, están organizadas en paquetes que se extienden a través de todo el citoplasma y forman parte del citoesqueleto, entre la envoltura nuclear, los desmosomas y hemidesmosomas de la membrana plasmática teniendo una función estructural (Werner *et al.*, 2020). Dentro de la capa basal, los queratinocitos presentan un nicho único que se distingue por su interacción con la membrana basal, constituida por componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento, aportados tanto por la epidermis como por la dermis subyacente, lo que mantiene su estado proliferativo.

El proceso de diferenciación en la epidermis, conocido como queratinización o cornificación, está programado genéticamente y es altamente regulado en serie por eventos metabólicos y morfológicos que involucran la pérdida de la capacidad de proliferación, un incremento en el tamaño de la célula y ensanchamiento, la formación de nuevos organelos, así como la reorganización estructural de los organelos existentes, una eventual pérdida de organelos, síntesis de nuevas proteínas y lípidos, cambio en las propiedades de la membrana plasmática, antígenos de superficie celular, receptores, y por último, la deshidratación. Todo este proceso culmina en la producción de escamas muertas que se desprenden de la superficie de la piel y se reemplazan por células internas que ascienden (Candi *et al.*, 2005). En base a hallazgos encontrados en experimentos de secuenciación de célula única, se sugiere que el queratinocito THBS1+ es una subpoblación de queratinocitos migratorios que facilita la cicatrización de heridas epidérmicas (Coutier *et al.*, 2022).

1.1.2. Dermis

La dermis (o corion) es el componente del tejido conjuntivo de la piel que le proporciona su flexibilidad, elasticidad, resistencia y la tracción a la piel, además de proteger al cuerpo de lesiones mecánicas, mantener la hidratación, ayudar en la regulación de la temperatura y está involucrada en la respuesta a estímulos sensoriales. Se compone de células, moléculas fibrosas y una sustancia fundamental de matriz extracelular. Sufre un recambio continuo, regulado por mecanismos que controlan la síntesis y degradación de sus componentes proteicos. (Roger *et al.*, 2019).

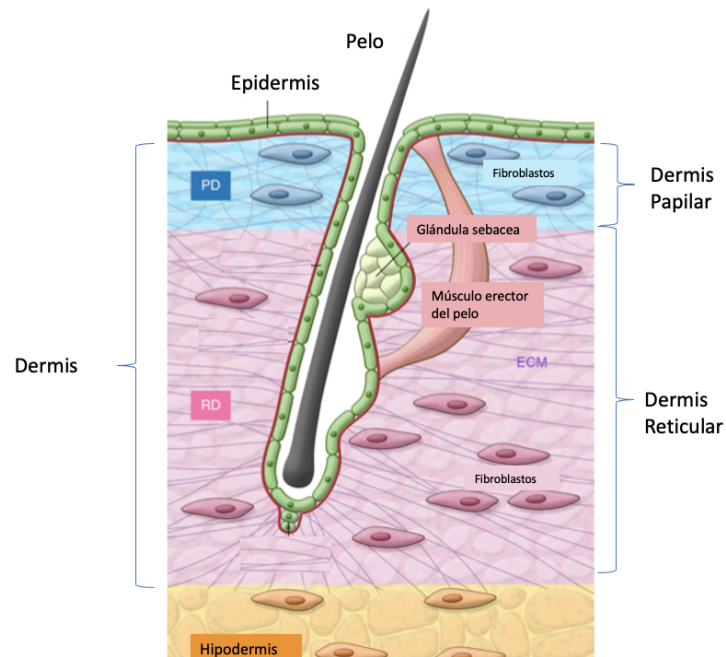


Figura 3. Estructura de la dermis modificado de Lynch *et al.*, 2018. (EMC Matriz extracelular)

La interacción de la dermis con la epidermis es esencial para mantener las propiedades de ambos tejidos, además de colaborar en el desarrollo en la morfogénesis de la unión dermoepidérmica y los apéndices epidermales. Así mismo ambas capas están involucradas en la reparación y remodelación de la piel cuando sufre lesiones o heridas (Brohem *et al.*, 2011).

La dermis principalmente está conformada por células llamadas fibroblastos que son responsables de sintetizar las proteínas que conforman la matriz extracelular, así como los componentes proteicos para su remodelación. Otro tipo de células que constituyen a la dermis son los macrófagos, monocitos y dendrocitos dérmicos los cuales forman parte del sistema fagocítico mononuclear de células de la piel. La última serie de células incluye células de Langerhans, células intermedias, células interdigitadoras y mastocitos (Zhao *et al.*, 2021).

La dermis está compuesta por una capa superior (papilar) y otra inferior (reticular), se distinguen debido a las diferencias en la organización del tejido conectivo, la densidad celular y los patrones nerviosos y vasculares (Fig. 3). Los fibroblastos especializados forman la dermis papilar, que regula el crecimiento del folículo piloso y el músculo erector del pelo, responsable de la piloerección. Parcialmente integrada en la dermis reticular se encuentra una capa de adipocitos dérmicos que forman el tejido adiposo blanco dérmico (Kanitakis, J. 2001).

1.1.2.1 Matriz extracelular.

La matriz extracelular de la dermis humana es una red de proteínas y polisacáridos que proporciona soporte y estructura a la piel y juega un papel importante en la homeostasis y la respuesta de la piel a lesiones y enfermedades. La matriz extracelular está compuesta principalmente de colágena, elastina y ácido hialurónico, que proporcionan resistencia y elasticidad a la piel. Además, también contiene factores de crecimiento y proteínas de adhesión que juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular así mismo la exposición a factores ambientales como la radiación UV y la contaminación pueden dañar la matriz extracelular de la dermis y contribuir a la aparición de arrugas y otros signos de envejecimiento (Vierkötter & Krutmann 2012).

El principal constituyente de la dermis es la proteína llamada colágena la cuál ocupa el 90% del peso seco de la piel, proporciona resistencia a la tracción y elasticidad. Se conocen 28 tipos diferentes de colágena, codificadas por más de 44 genes separados, que se ensamblan en una variedad de estructuras supramoleculares. La mayoría de la colágena tienen distribuciones específicas en el espacio y en el tiempo en los tejidos y exhiben propiedades funcionales distintas y solapadas. (Fig.4) (Mienaltowski & Birk 2014).

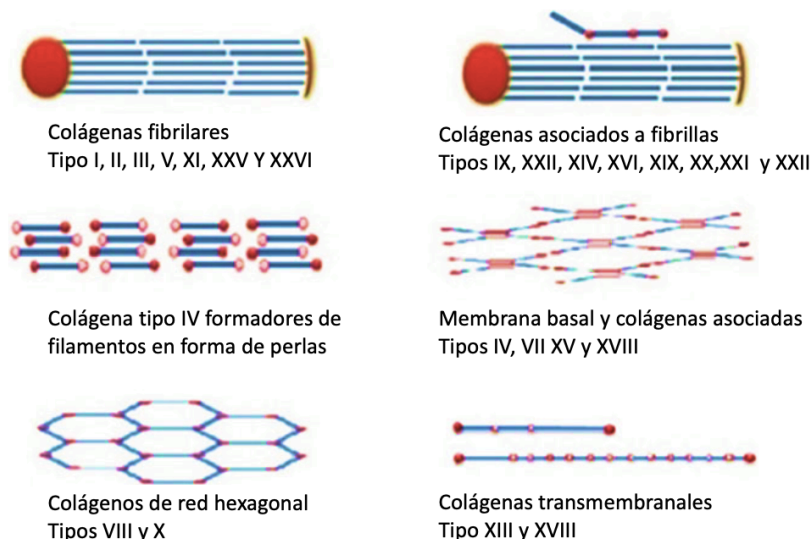


Figura 4. Estructuras supramoleculares de las colágenas. Tomado de Balasubramanian *et al.*, 2013

Todas las cadenas presentan un dominio helicoidal que consta de dominios terminales globulares y repeticiones (Gly-X-Y), donde X e Y son típicamente prolina e hidroxiprolina (Fig.5). En la dermis del adulto que es periódicamente renovada las colágenas fibrilares intersticiales colágena tipo I (Col I), colágena tipo III (Col III) y colágena tipo V (Col V) conforman la mayor cantidad de colágenas. (Ramshaw *et al.*, 1998). La colágena proporciona la matriz/colchón de soporte que sustenta una piel sana y es un factor determinante clave para la preservación de la firmeza y elasticidad de la piel. La

Col I tiene una proporción del 80-90% y la Col III completa casi la totalidad con un aproximado entre un 8-12%, la Col V se codistribuye y ensambla en fibrillas con ambos tipos Col I y Col III. (Reilly *et al.*, 2021)

La Col V es polimórfica en su estructura ya que puede encontrarse forma de gránulos o filamentos y es localizada principalmente en la dermis papilar, la matriz que rodea la membrana basal de las venas, nervios y apéndices.

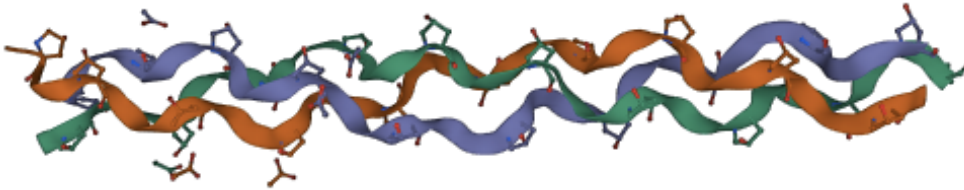


Figura 5. Estructura cuaternaria de la colágena. Tomado de PDB DOI: [10.2210/pdb1CAG/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1CAG/pdb)

La colágena tipo VI es abundante a través de la dermis y está asociada con fibras y espacios interfibrilares, donde están organizada en una gran variedad de formas incluyendo filamentos finos y perlados (Balasubramanian *et al.*, 2013). La Col VI aparece en el durante etapas tempranas del desarrollo embrionario y se piensa que organiza la matriz. La colágena tipo IV (Col IV) en la piel es confinada a la lámina basal de la unión dermoepidérmica (DEJ), los vasos sanguíneos y los apéndices. Por último, mencionaremos a la colágena tipo VII (Col VII), forma fibrillas de anclaje en la DEJ que se interdigitan con fibrillas de colágena intersticiales en la dermis papilar (Reilly *et al.*, 2021).

La remodelación de la matriz extracelular de la dermis humana es un proceso continuo que implica la degradación y la síntesis de proteínas y polisacáridos de la matriz extracelular. Un papel importante en este proceso lo realizan las metaloproteasas, una familia de enzimas que degradan las proteínas de la matriz extracelular. Las metaloproteasas son clave en el mantenimiento de la estructura y la función de la matriz extracelular y tienen un papel importante en la homeostasis y la respuesta de la piel a lesiones y enfermedades (Theocharidis *et al.*, 2016).

Las metaloproteasas se dividen en dos grupos: las metaloproteasas de matriz (MMPs) y las metaloproteasas de cilios (ADAMs). Las MMPs son un grupo de enzimas que degradan la colágena y otros componentes de la matriz extracelular y están involucradas en la remodelación tisular y la curación de lesiones (Page-McCaw *et al.*, 2007). Las ADAMs son un grupo de enzimas que tienen un papel en la proteólisis y la activación de proteínas de la matriz extracelular y están involucradas en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular (Karamanos *et al.*, 2019).

La expresión y la actividad de las metaloproteasas pueden ser moduladas por factores ambientales y genéticos. Por ejemplo, la exposición a factores como la radiación UV y la contaminación puede aumentar la expresión de MMPs y contribuir al daño de la matriz extracelular y al envejecimiento de la piel. Además, se ha encontrado que ciertos polimorfismos genéticos están asociados con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades de la piel que involucran una alteración en la expresión y la actividad de las metaloproteasas. Además, la matriz extracelular de la dermis también puede ser modificada por factores genéticos y puede ser un factor en el desarrollo de enfermedades como la dermatosclerosis (Page-McCaw *et al.*, 2007).

1.1.3 Hipodermis

La hipodermis es la capa más profunda de la piel, esta capa juega un papel importante en la protección y el aislamiento térmico del cuerpo. Está compuesta por tejido conectivo y grasa, y se encuentra debajo de la dermis. La grasa de la hipodermis actúa como aislante térmico y también como reserva de energía. Amortigua y protege la piel, además de permitir su movilidad sobre las estructuras subyacentes. El límite entre la dermis reticular profunda y la hipodermis es una transición abrupta de tejido conectivo dérmico predominantemente fibroso a una región subcutánea rica en tejido adiposo, esto permite una separación clara entre las funciones de estas dos capas de la piel, y ayuda a mantener la estabilidad de la piel y el cuerpo (Figura 6, Wong *et al.*, 2016).

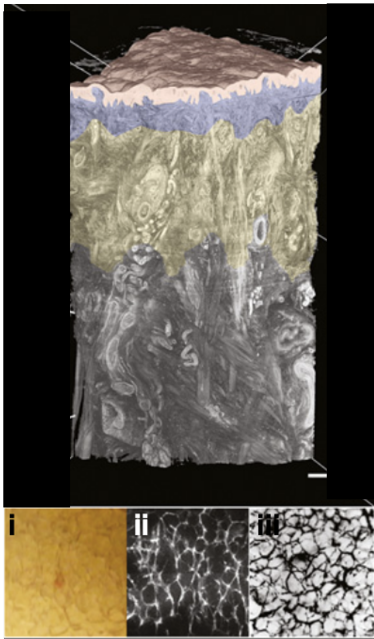


Figura 6. La arquitectura de la piel 3D de la piel humana. Epidermis (rosa); dermis papilar (azul); dermis reticular (amarilla); Hipodermis (blanca). Imágenes de la grasa hipodérmica vista a través de diferentes modalidades de imagen. (i) Grasa hipodérmica vista mediante endoscopia quirúrgica en tejido vivo que muestra glóbulos de grasa de color amarillo (ii) Grasa hipodérmica vista con fluorescencia excitada por dos fotones que muestra fibras fibroelásticas. Reimpreso con permiso de Wiley and Son (Heuke et al. 2013). (iii) Grasa hipodérmica vista con inyección de tinta china de los vasos linfáticos. Reimpreso con autorización de Macmillan Publishers Ltd, J Invest Derm. Modificado de Wong et al., 2016.

Las dos regiones están, sin embargo, estructural y funcionalmente bien integradas a través de las redes nerviosas y vasculares además de la zona de los apéndices epidérmicos. Los folículos pilosos en crecimiento activo se extienden hacia la grasa subcutánea, y las glándulas sudoríparas apocrinas y ecrinas normalmente están confinadas a esta profundidad de la piel (Prost-Squarcioni, 2006).

Los adipocitos derivados del mesénquima son células grasas que se desarrollan a partir de células mesenquimales durante el embarazo y el primer año de vida. Estos adipocitos se encuentran en diferentes partes del cuerpo, incluyendo la hipodermis, y juegan un papel importante en el almacenamiento de energía y la regulación del metabolismo. A medida que envejecemos, la cantidad de adipocitos derivados del mesénquima disminuye y se produce un aumento en la cantidad de adipocitos derivados de los preadipocitos, que se originan de células de la piel, están organizados en lobulillos definidos por tabiques de tejido conjuntivo fibroso. Los nervios, los vasos y los vasos linfáticos están ubicados dentro de los tabiques e irrigan abundantemente la región (Driskell *et al.*, 2014).

Los depósitos de grasa subcutánea comienzan a formarse en el feto a mediados del primer trimestre y ya están bien desarrollados en el recién nacido, la síntesis y el almacenamiento de grasa continúan a lo largo de la vida, mediante una mayor acumulación de lípidos dentro de las células grasas, la proliferación de los adipocitos existentes o el reclutamiento de nuevas células de la mesénquima indiferenciada (Monfort *et al.*, 2013).

Los adipocitos son células grasas que se encuentran en la hipodermis y juegan un papel importante en el almacenamiento y la liberación de energía. Una de las hormonas producidas por los adipocitos es la leptina, que se libera al torrente sanguíneo y actúa en el cerebro para regular el apetito y el metabolismo de los lípidos. La leptina también tiene efectos en otras partes del cuerpo, como el tejido muscular y el hígado, y puede afectar la respuesta del cuerpo a la insulina y el metabolismo del azúcar en sangre (Gómez-Abellán *et al.*, 2011).

1.2 Fibroblastos

Los fibroblastos son células presentes en el tejido conectivo de los animales vertebrados y juegan un papel importante en la cicatrización de heridas y en la remodelación del tejido conectivo durante el crecimiento y el desarrollo. Además de producir componentes del tejido conectivo como la colágena y la elastina, los fibroblastos también participan en la respuesta inflamatoria y en la formación de

nuevos vasos sanguíneos durante la angiogénesis, así como en el proceso de cicatrización de heridas (Lynch & Watt 2018).

Los fibroblastos son células polimorfas, lo que significa que tienen diferentes formas y tamaños. A menudo tienen una forma ovalada o alargada y pueden medir entre 20 y 30 micrómetros de largo. La estructura de los fibroblastos es similar a la de otras células eucariotas. Tienen un núcleo con cromatina y una serie de organelos, como mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y liso, y aparato de Golgi. También tienen un citoplasma denso y una serie de prolongaciones filamentosas llamadas prolongaciones citoplásmicas, que se utilizan para sintetizar y secretar proteínas (Nilforoushzadeh *et al.*, 2017)

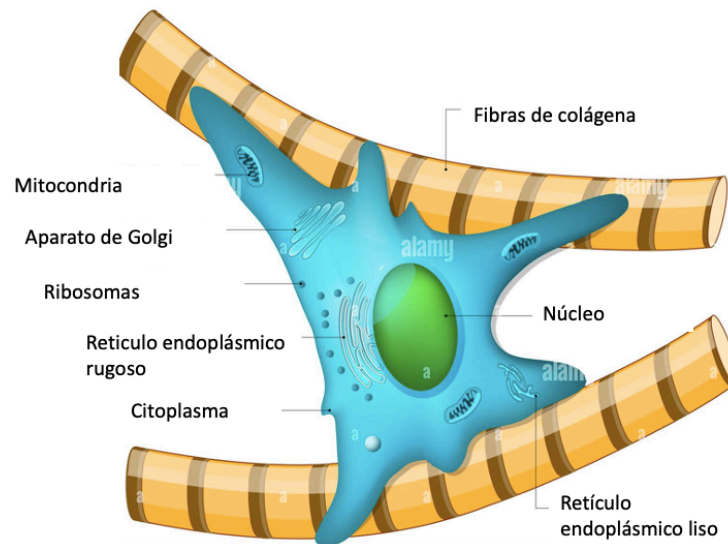


Figura 7. Diagrama de un fibroblasto tomado y modificado de www.alamy.com 2023

La heterogeneidad de los fibroblastos en diferentes órganos ha sido analizada a través de técnicas de secuenciación de ARN a nivel celular obteniendo perfiles transcripcionales de células individuales de fibroblastos y células musculares vasculares de cuatro órganos musculares murinos: corazón, músculo esquelético, intestino y vejiga. Los resultados indican que los fibroblastos son altamente específicos de cada órgano y muestran una gran heterogeneidad entre los diferentes órganos. Además, se encontró que la variación en la expresión de los genes del matrisoma es mayor que en otras categorías de genes, lo que sugiere que los fibroblastos adaptan específicamente la matriz extracelular en función de la patología del órgano. Los hallazgos también muestran que los factores de transcripción son los menos variables en el análisis, lo que podría sugerir que las diferencias epigenéticas contribuyen a la heterogeneidad de los fibroblastos (Muhl *et al.*, 2020).

Los recientes estudios de secuenciación de célula única (scRNA-seq) han proporcionado una comprensión más profunda de la heterogeneidad de los fibroblastos en diferentes órganos. Se ha descubierto que no existe un solo marcador que pueda discriminar a todos los fibroblastos de todas las células en todos los órganos. En cambio, se han identificado combinaciones de marcadores que pueden señalar subtipos de fibroblastos que cruzan las fronteras de los órganos. Por ejemplo, el marcador Pi16 y el marcador Col15a1 se han encontrado en varios órganos, y se han descrito subtipos de fibroblastos específicos en el corazón, músculo esquelético y colón (Muhl *et al.*, 2020).

En la piel humana, existen algunos subtipos de fibroblastos especializados en la producción de ECM, como los FB DPP4+. Estos subtipos fueron caracterizados mediante análisis de secuenciación de ARN de célula única (scRNA-seq), entre otros subtipos de fibroblastos con actividades relacionadas a las reacciones inmunológicas y antimicrobianas (Vorstandlechner *et al.*, 2020).

Al investigar los efectos del estrés térmico crónico en las células V79 de fibroblastos pulmonares de hamster chino. Se observó que el estrés térmico aumentó la expresión de Hsp 70 y MnSOD, y la fosforilación de p38 MAPK y Akt. Cabe destacar que cuando Akt es activada por la fosforilación, inhibe la apoptosis al inhibir la actividad de las proteínas proapoptóticas y promoviendo la supervivencia celular. Además, Akt también juega un papel en la regulación de la proliferación celular al activar proteínas relacionadas con la proliferación celular (Mustafi *et al.*, 2009).

1.3 Miofibroblastos

Un miofibroblasto es un tipo de célula que se encuentra en los tejidos conectivos del cuerpo. Se caracterizan por tener un aspecto similar a un fibroblasto, una célula que juega un papel importante en la formación de la colágena y otras fibras en la matriz extracelular, pero también tienen características musculares, como la capacidad de contraerse.

Además, promueven la deposición de la matriz extracelular los cuales al activarse adquieren un fenotipo similar al de las células del músculo liso y expresan α -actina de músculo liso (α -SMA), esta característica dota a estas células de características contráctiles que superan las de la mayoría de los otros fibroblastos (Hinz B., 2010).

La α -actina de músculo liso (SMA) es un marcador molecular para los miofibroblastos, y su expresión está asociada con la generación de tensiones mecánicas intracelulares y extracelulares. La SMA se encuentra en las fibras de estrés y adhesiones focales, y mejora la contractilidad de los fibroblastos activados. También ayuda a mediar la fuerza externa en la matriz extracelular a través de diversas proteínas y adhesiones focales. La expresión de SMA puede ser regulada por la tensión mecánica

externa e influenciada por la tensión intracelular generada por la SMA, lo que puede contribuir a un bucle de retroalimentación positiva y a un fenotipo exagerado de miofibroblastos en enfermedades fibrosas (Hetzler *et al.*, 2019).

Su transdiferenciación y su muerte por apoptosis son moduladas por citoquinas, estrés mecánico e interacciones célula-célula y célula-matriz. Los miofibroblastos pueden transdiferenciarse a partir de diversos tipos de células: pericitos, células epiteliales, células madre mesenquimales locales o derivadas de la médula ósea, fibrocitos, y a través de las adhesiones focales aumentando así la rigidez en la superficie (Hinz B., 2015).

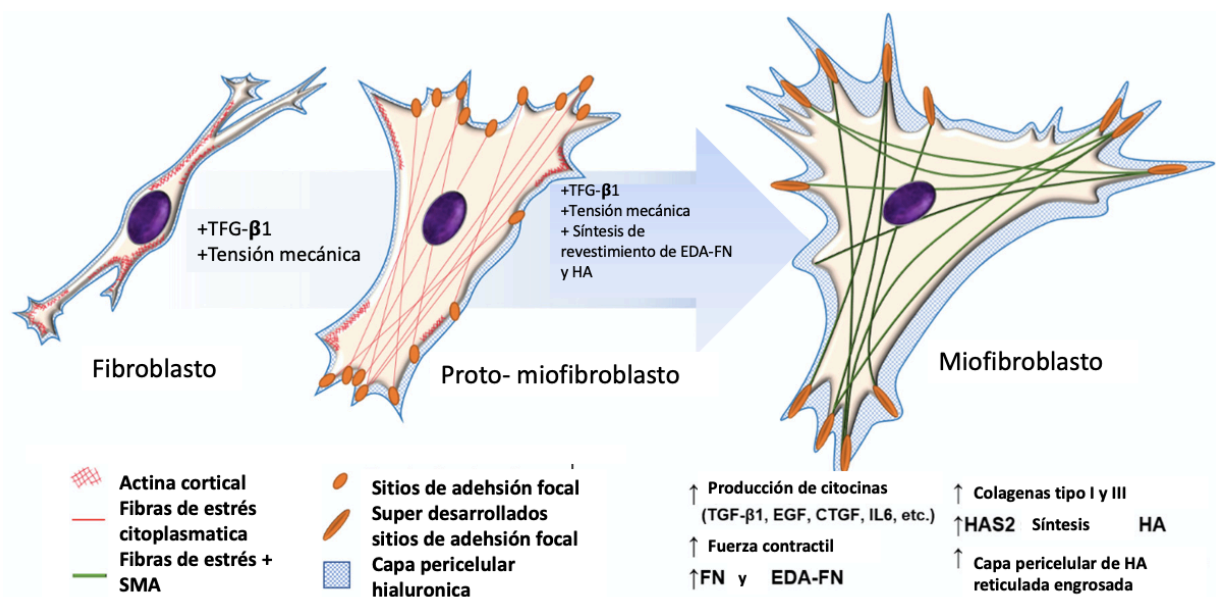


Figura 8. Transdiferenciación de fibroblasto en miofibroblasto. Tomado de Tai *et al.*, 2021

La transdiferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos (Fig.8) está regulada por una combinación de factores físico-químicos y moleculares. Algunos de los factores más importantes son los siguientes:

Tensión mecánica: La tensión mecánica es un factor crucial para la diferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos. La aplicación de una tensión mecánica a través del estiramiento o la compresión del tejido puede activar la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, lo que se conoce como "mecanotransducción". Este proceso se lleva a cabo mediante la activación de diferentes vías de señalización, como la vía de la proteína cinasa RhoA y la vía de la proteína cinasa Akt (Pakshir & Hinz, 2018).

Ciclos celulares: La diferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos está también relacionado con la actividad celular, miofibroblastos tienden a estar en un estado de proliferación activa mientras que los fibroblastos están en un estado de reposo celular. El factor de transcripción relacionado con runt 1 (RUNX1) regulado por TGF- β 1 es necesario para el avance del ciclo celular y la proliferación de los miofibroblastos (Kim *et al.*, 2014).

Factores de crecimiento: Los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) y el factor de crecimiento plaquetario (PDGF), son importantes para la diferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos. Estos factores de crecimiento pueden activar las vías de señalización intracelulares que promueven la diferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos y su activación está relacionada con patologías inflamatorias y fibroticas (Snyder *et al.*, 2016).

Transcripción: la expresión de ciertos factores de transcripción es esencial para la diferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos, como la expresión del factor de transcripción Snail y otros miembros de la familia Snail, que son capaces de inhibir la expresión de genes específicos de fibroblastos y promover la expresión de genes propios de los miofibroblastos (Wang *et al.*, 2020).

Microambiente: El entorno celular en el que se encuentran los fibroblastos también juega un papel importante en su diferenciación hacia miofibroblastos, los cambios en las concentraciones de iones como el calcio, y en el estado oxidativo de la célula, pueden cambiar el balance de señales y promover una diferenciación hacia miofibroblastos.

Las principales vías de mecanotransducción que se relacionan con la diferenciación de los miofibroblastos incluyen: Rho/ROCK y los cofactores transcripcionales YAP/TAZ y MRTF-A/B. La relación entre estas vías y la diferenciación de los miofibroblastos es compleja y no se entiende completamente, por lo que es importante continuar investigando en este campo para desarrollar estrategias terapéuticas eficaces para tratar las heridas y las patologías relacionadas con la fibrosis (Huang *et al.*, 2012).

La matriz extracelular es esencial para la diferenciación de los miofibroblastos. La rigidez de la matriz extracelular es un factor importante en la regulación de la diferenciación celular, ya que un aumento en la rigidez de la matriz ha sido relacionado con un aumento en la diferenciación de los miofibroblastos. El proceso de mecanotransducción se relaciona con la capacidad de las células para responder a las señales mecánicas y convertirlas en respuestas celulares.

Además la matriz extracelular contribuye al desarrollo de procesos fibróticos ya que al tener una proporción mayor de fibras de colágena en los tejidos se ha relacionado con un aumento en el grado

de rigidez (cambios en la mecánica extracelular) y, por lo tanto, con la activación de vías de mecanotransducción (D'Urso & Kurniawan 2020).

1.4 Lesiones en la piel y cicatrización

La piel es la estructura crítica que protege los tejidos internos de daños mecánicos, infecciones microbianas, radiación ultravioleta y temperaturas extremas. Esto la hace altamente susceptible a lesiones con un impacto significativo tanto para los pacientes individuales como para la economía de la salud. Solo en Estados Unidos, las heridas que no sanan representan aproximadamente \$50 mil millones, las cicatrices de incisiones quirúrgicas y traumas representan casi \$12 mil millones y las quemaduras representan \$7.5 mil millones en costos de atención médica cada año (Rodrigues *et al.*, 2019).

El proceso biológico mediante el cual la piel humana repara sus heridas se llama cicatrización, cuando la piel se lastima, varios tipos de células dentro de estas tres capas deben coordinarse en etapas precisas para promover el cierre de la herida. Estas etapas de hemostasis, inflamación, angiogénesis, crecimiento, reepitelización y remodelado ocurren en una secuencia temporal, pero también se superponen. Por lo tanto, la reparación de la piel es uno de los procesos más complejos en el cuerpo humano (Sorg *et al.*, 2017).

Durante la cicatrización (Fig.9), se activan y coordinan varias vías intracelulares e intercelulares para restaurar la integridad y la homeostasis del tejido dañado. También se activan componentes del sistema inmunitario, como neutrófilos, monocitos, linfocitos y células dendríticas, y se inician las cascadas de señalización involucradas en la coagulación de la sangre y en la inflamación. Estos procesos llevan a la proliferación, diferenciación y migración de diferentes tipos de células, incluyendo células inmunitarias, células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos. Estos cambios en la expresión génica y el fenotipo celular son necesarios para promover la reparación del tejido dañado y reemplazarlo con tejido normal durante el proceso de cicatrización (Tottoli *et al.*, 2020).

Sorprendentemente, en algunos organismos eucariotas como los anfibios del género *Ambystoma*, la respuesta a una lesión tiene como consecuencia la regeneración por completo de la arquitectura original del tejido, a través del proceso conocido como regeneración.

Los humanos tienen esta capacidad durante el desarrollo prenatal, pero la pierden durante la vida adulta. ¿Cómo ocurre la regeneración y por qué los humanos pierden esta habilidad? sigue siendo objeto de estudio (García-Lepe *et al.*, 2022).

La primera etapa de la reparación de la herida ocurre inmediatamente después del daño del tejido, y se requiere de componentes involucrados en la coagulación, las vías inflamatorias y el sistema

inmunitario para así prevenir las pérdidas continuas de sangre y líquidos, eliminar los tejidos muertos y desvitalizados además de prevenir infecciones. La hemostasia se logra inicialmente mediante la formación de un tapón de plaquetas, seguido de una matriz de fibrina, que se convierte en el andamiaje para las células infiltrantes. Luego, los neutrófilos se reclutan en la herida en respuesta a la activación del complemento, la desgranulación de las plaquetas y los productos de la degradación bacteriana. Después de 2 a 3 días, los monocitos aparecen en la herida y se diferencian en macrófagos (Park & Barbul, 2004).

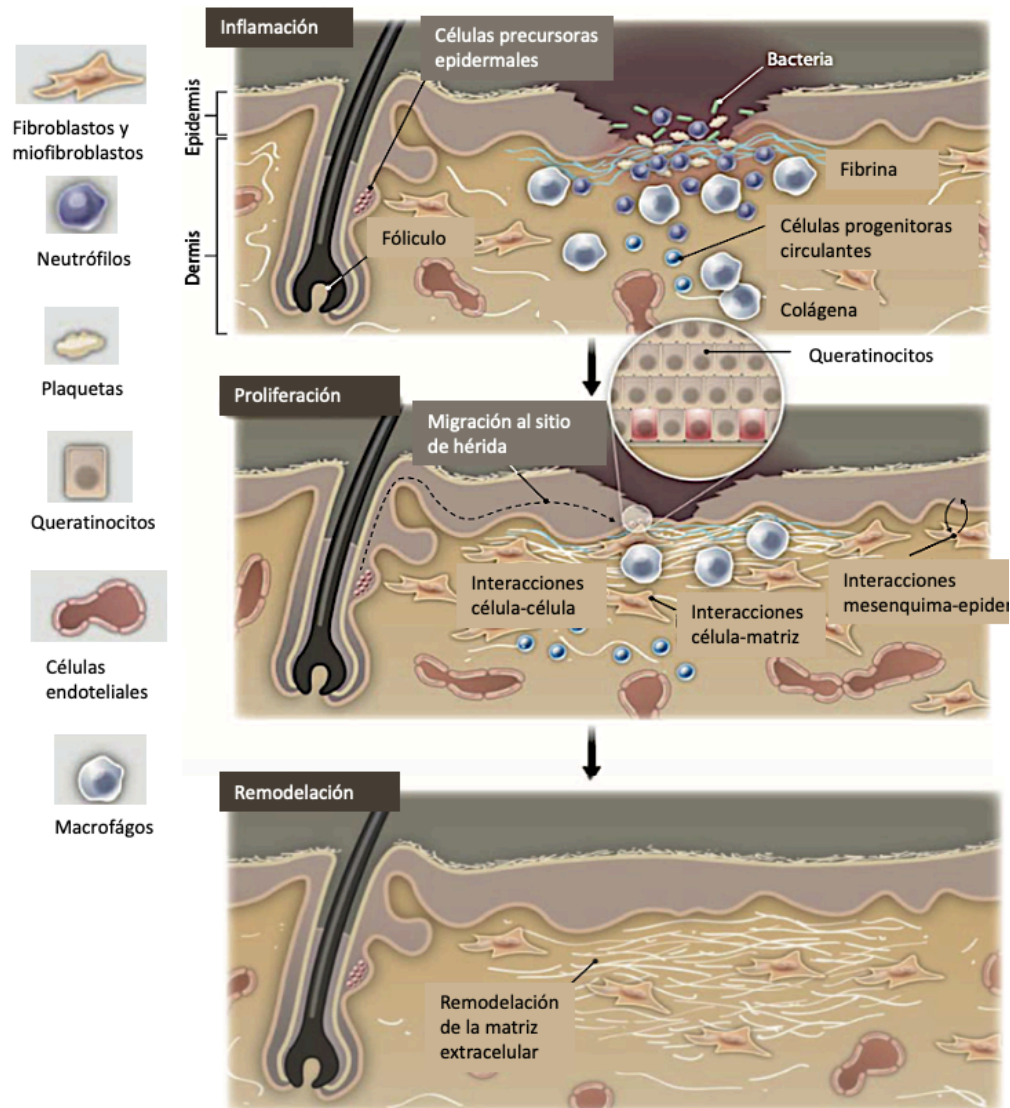


Figura 9. Proceso de cicatrización de una herida en la piel y los diferentes tipos de células involucradas.

La segunda etapa de la reparación de heridas, la formación de tejido nuevo que ocurre de 2 a 10 días después de la lesión y se caracteriza por la proliferación celular y la migración de diferentes tipos de

células, además ocurre la formación de nuevos capilares permitiendo el paso de nutrientes hacia la herida para así ayudar a la proliferación de fibroblastos.

Entonces se forman nuevos vasos sanguíneos (un proceso conocido como angiogénesis), y los brotes de capilares asociados con fibroblastos y macrófagos reemplazan la matriz de fibrina con tejido de granulación, que forma un nuevo sustrato para la migración de queratinocitos en etapas posteriores del proceso de reparación. Los queratinocitos que se encuentran detrás del borde de la lesión proliferan, maduran y, finalmente, restablecen la función de barrera del epitelio (Gurtner *et al.*, 2008). Los reguladores positivos más importantes de la angiogénesis son el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2; también conocido como bFGF). La angiogénesis también puede resultar del reclutamiento de células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea, aunque la magnitud de esta contribución es pequeña, al menos en heridas no isquémicas (en las que la concentración de oxígeno es normal).

En la última parte de esta etapa, los fibroblastos, que son atraídos desde el borde de la herida o desde la médula ósea, son estimulados por macrófagos y algunos se diferencian en miofibroblastos. Los miofibroblastos son células contráctiles que, con el tiempo, unen los bordes de una herida. Los fibroblastos y los miofibroblastos interactúan y producen matriz extracelular, principalmente en forma de colágena, que finalmente forma la mayor parte de la cicatriz madura (Rakita *et al.*, 2020).

La tercera etapa de la reparación de heridas o remodelación comienza de 2 a 3 semanas después de la lesión y dura un año o más. Durante esta etapa, todos los procesos activados después de la lesión disminuyen y cesan. La mayoría de las células endoteliales, macrófagos y miofibroblastos sufren apoptosis (es decir, muerte celular programada) o salen de la herida, dejando una masa que contiene pocas células y consiste principalmente en colágena y otras proteínas de matriz extracelular.

Las interacciones epiteliales-mesenquimatosas probablemente regulan continuamente la integridad y la homeostasis de la piel, debe haber circuitos de retroalimentación adicionales para mantener los otros tipos de células en la piel. Además, a lo largo de 6 a 12 meses, la matriz extracelular se remodela activamente desde un esqueleto de colágena principalmente de tipo III a uno compuesto predominantemente por colágena de tipo I. Este proceso lo llevan a cabo las metaloproteinasas de matriz que son secretadas por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, y fortalece el tejido reparado. Sin embargo, el tejido nunca recupera las propiedades de la piel no lesionada. Curiosamente, los vertebrados como el pez cebra (*Danio rerio*) y *C. elegans* no producen ninguno de estos tipos de colágena; su matriz extracelular se compone enteramente de colágenas tipo VI y tipo

XVIII. Este hallazgo sugiere un grado de plasticidad evolutiva que no se observa en las primeras etapas de reparación de heridas (Arenas *et al.*, 2020).

Rognoni *et al.*, en 2019 postulan que una fase inicial de proliferación y migración activa de fibroblastos dérmicos, seguida de una fase de alto depósito de ECM, que regula negativamente la proliferación de fibroblastos, es clave para la cicatrización exitosa de heridas.

No se tiene un modelo adecuado para el estudio de las cicatrices hipertróficas en humano, por lo que la exploración de nuevas tecnologías para la generación de líneas celulares que sean modelo de estudio para el entendimiento de los procesos moleculares del proceso de cicatrización. La técnica de reprogramación celular tiene los alcances para la generación de líneas celulares humanas que ayudarán al modelaje de enfermedades.

1.5 Cicatriz hipertrófica

El proceso de cicatrización de las heridas es un proceso dinámico que tiene una regulación equilibrada. Cuando esta regulación está desequilibrada, pueden ocurrir cicatrices menos deseables como las cicatrices hipertróficas. Estas son cicatrices elevadas y firmes formadas por una producción excesiva de fibrogénico y colágeno durante la cicatrización. Pueden ser asintomáticas, principalmente pruriginosas, pero también pueden ser dolorosas y causar restricciones en el movimiento y deformaciones cosméticas además están contenidas dentro del sitio de la herida. En el examen histológico, las cicatrices hipertróficas tienden a tener colágeno en un patrón ondulado y regular (Carswell & Borger, 2022).

Los fibroblastos en enfermedades fibróticas exhiben un potencial proliferativo abrumador, mayor migración y capacidad de invasión, y mayor depósito de MEC, lo que contribuye a la patogénesis de la fibrosis. Estas acciones son impulsadas principalmente por citocinas como IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-10, así como de factores de crecimiento como TGF- β , CTGF, PDGF, bFGF, POSTN (Zhu *et al.*, 2016).

La formación de tejido fibrótico, que se define por la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular (MEC) como la colágena y la fibronectina, es de hecho una fase normal e importante de la reparación tisular en todos los órganos.

En un estudio de secuenciación de célula única, se investigaron las diferencias en los tipos celulares y los mecanismos de regulación en las células de la piel. Se identificaron seis tipos de células, incluyendo los miofibroblastos negativos y positivos para el gen EN1, células hematopoyéticas, macrófagos, pericitos y células endoteliales. Se encontró que los genes ligando y receptores entre los miofibroblastos y los macrófagos modulan principalmente la proliferación y migración celular y la vía

TGF- β . Además, se identificaron genes específicos diferencialmente expresados en miofibroblastos y macrófagos fibróticos comparados con los regenerativos. Los genes específicos entre los miofibroblastos fibróticos y regenerativos están involucrados en el proceso metabólico del ARN y la organización de los orgánulos, mientras que los genes específicos entre los macrófagos fibróticos y regenerativos participan en la regulación de la inmunidad y la fagocitosis (Chen *et al.*, 2022).

En la cicatrización fisiológica de heridas, los miofibroblastos desaparecieron después del cierre y resolución de la herida, predominantemente por apoptosis. A pesar de la producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los miofibroblastos durante la fibrosis, la persistencia de la expresión de TGF- β 1, el depósito de MEC y la FAK acumulativa inducida por el estrés promueve fenotipos de miofibroblastos favorables a la supervivencia y antiapoptóticos (Fig.10) (Hinz & Lagares, 2020). La susceptibilidad de los miofibroblastos a la apoptosis inducida por óxido nítrico (NO) se ha informado *in vitro*. Por lo tanto, una combinación de reducción de la expresión del factor de crecimiento profibrótico, aumento del recambio de ECM y aumento de la generación de NO puede preparar el escenario para desencadenar la apoptosis de miofibroblastos durante la resolución de la reparación y remodelación de tejidos (Tai *et al.*, 2021).

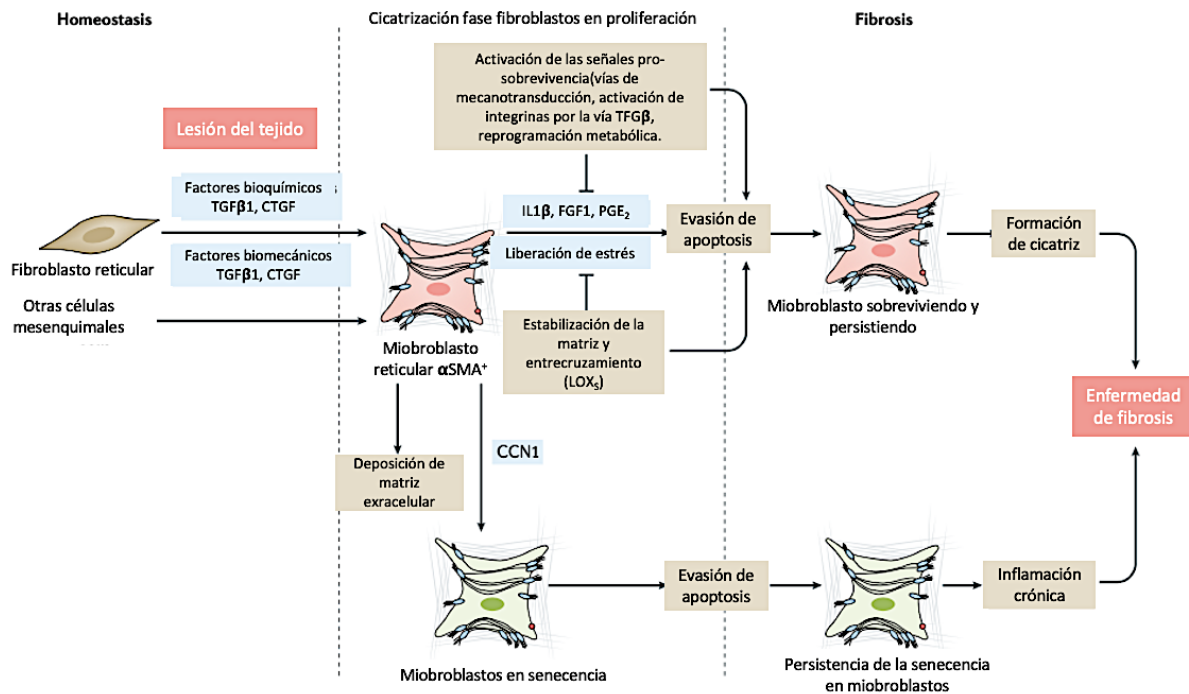


Figura 10. Diferenciación de los miofibroblastos y la consecuencia de su persistencia Tomado y modificado de (Hinz & Lagares, 2020)

Los fármacos antifibróticos aprobados incluyen Nintedanib y Pirfenidona. Nintedanib es un inhibidor de la tirosina quinasa que regula a la baja los mediadores profibróticos, incluidos el TGF β , el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos. La pirfenidona es un fármaco de molécula pequeña que ha demostrado reducir la producción de colágena mediada por TGF β además de sus efectos como agente antiinflamatorio que disminuye los niveles de TNF e interleucinas (Liu *et al*, 2019).

Sin embargo, hasta la fecha, el antagonismo directo de los ligandos de TGF β ha producido más toxicidad que beneficio.

En relación a los modelos biológicos en animales son útiles para investigar los mecanismos de la enfermedad y evaluar intervenciones terapéuticas en un entorno controlado. La selección del modelo adecuado es importante para el diseño de estudios eficaces que contribuyen a nuestra comprensión de la enfermedad y mejoran el tratamiento de los pacientes. Sin embargo, existen varios modelos animales para estudiar la cicatrización queloide y ninguno de ellos es completamente fiel a la realidad. Es necesario definir criterios para determinar un modelo "estándar de oro" y medir la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados, el enfoque en la medición de la fibrosis, y la aplicabilidad a las pruebas farmacológicas de drogas. Los diferentes modelos animales permiten estudiar las enfermedades fibróticas con mayor detalle y tienen implicaciones en el campo farmacológico (Marttala *et al.*, 2016).

El modelado de enfermedades de humanos utilizando células troncales es uno de los hallazgos ayudarán a comprender mejor la patogénesis de la fibrosis de la piel y proporcionarán objetivos potenciales para las terapias de enfermedad fibrosa.

1.6 Células troncales

El descubrimiento de las células troncales se atribuye a James Thompson, quien en 1998 logró cultivar células troncales a partir de un embrión de rata. Sin embargo, fue en el año 2001 cuando se logró cultivar células troncales a partir de un embrión humano, lo que generó un gran interés en su uso terapéutico. Las células troncales son células indiferenciadas que tienen la capacidad de autorenovación y la pluripotencia que es la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula del cuerpo. Se encuentran en diferentes tejidos del cuerpo humano, como la médula ósea, la piel y el tejido nervioso (Thompson *et al.*, 1998).

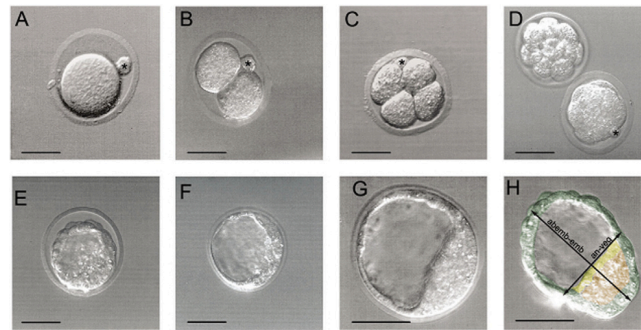


Figura 11. Representación esquemática de la primera semana del desarrollo embrionario humano. El óvulo es fertilizado 12-24 horas después de la ovulación (liberación del ovario). Dentro del huevo se forman un pronúcleo masculino y uno femenino que posteriormente se fusionan. Unas 30 horas después de la fecundación, el cigoto se escinde (o se divide en dos). El embrión recién formado se transporta a través del oviducto hasta la matriz (útero) a medida que continúa desarrollándose.

Existen tres tipos principales de células troncales: las células troncales embrionarias (Fig. 11), las células troncales adultas y las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC). Las células troncales embrionarias se obtienen a partir de un embrión en las primeras etapas de desarrollo y tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula del cuerpo (Fig. 12). Por otro lado, las células troncales adultas se encuentran en diferentes tejidos del cuerpo y tienen una capacidad de diferenciación limitada. Por último, el descubrimiento de las células troncales inducidas pluripotentes (iPSCs) en 2006 representa un hito importante en la biología y la medicina. Sin embargo, los cimientos para la reprogramación celular se establecieron mucho antes. En 1981, Evans y colaboradores demostraron que las células troncales embrionarias (ESC) podían derivarse cultivando la masa celular interna de blastocistos murinos (Yoshida & Yamanaka, 2017).

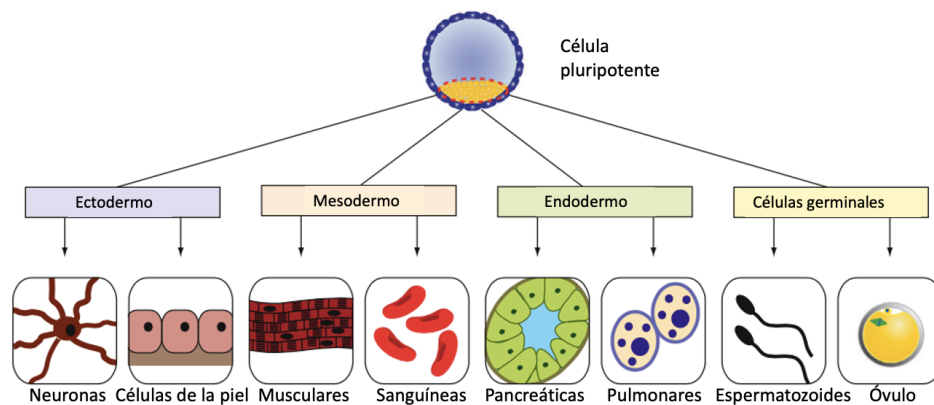


Figura 12. Las células pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse en los tres tipos de capas germinales y en todos los tipos celulares que conforman un organismo.

Las células troncales han tenido éxito en el tratamiento de enfermedades en modelos animales y en algunos pacientes humanos. Por ejemplo, se ha demostrado que las células troncales pueden ser utilizadas para regenerar tejidos dañados en enfermedades cardiovasculares, como la insuficiencia cardíaca. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica, lesión de la médula espinal, las células madre han demostrado tener un efecto positivo en la preservación de las células nerviosas y en la mejora de los síntomas así como en el tratamientos de degeneración macular relacionada con la edad y diabetes tipo 1 (Blau & Daley, 2019).

Sin embargo, el uso de células troncales también ha generado controversia debido a la obtención de células troncales a partir de embarazos abortados y el posible uso de células troncales embrionarias en la clonación humana. A pesar de esto, la investigación en el campo de las células troncales ha avanzado mucho en los últimos años con el descubrimiento de las iPSC y se espera que en el futuro puedan ser utilizadas para tratar una gran variedad de enfermedades sin las implicaciones éticas y de rechazo inmunológico después del trasplante que implica utilizar células derivadas de embriones (Shi *et al.*, 2017).

1.7 Células pluripotenciales inducidas (iPSC)

Las células pluripotentes inducidas (iPSC) son células troncales que se han obtenido a partir de células adultas somáticas que se han sometido a un proceso llamado reprogramación celular y tienen la capacidad de convertirse en cualquier tipo de tejido del cuerpo. Estas células son muy prometedoras porque pueden utilizarse para modelar enfermedades y para desarrollar terapias de regeneración de tejidos (Yamanaka *et al.*, 2007).

El primer descubrimiento de células iPSC se produjo en 2006 en Japón, cuando se demostró que era posible convertir células de piel en células madre pluripotentes utilizando factores de transcripción específicos asumiendo la idea que la pluripotencia puede ser inducida en células somáticas por factores definidos que existían en ESC y se buscaron factores de reprogramación de ESC de ratón basados en esta hipótesis. Como resultado, se identificaron cuatro factores de transcripción (Oct3/4, Sox2, Klf4 y cMyc) que fueron capaces de inducir pluripotencia en fibroblastos fetales y adultos de ratón (Takahashi & Yamanaka, 2006).

El avance de iPSC de ratón a humano se logró en el breve período de un año debido al conocimiento acumulado de la investigación de hESC. Las iPSC humanas (hiPSC) se generaron en 2007 (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Desde entonces, se han desarrollado métodos adicionales para generar células iPSC y se han utilizado para modelar una amplia variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos y ciertos tipos de cáncer.

Sin embargo, hay muchos desafíos que deben abordarse para que la tecnología iPSC esté al alcance de muchos más pacientes. Ya que actualmente se tiene tres desafíos principales: tumorigenicidad, inmunogenicidad y heterogeneidad (Yamanaka, 2020).

Uno de los primeros métodos utilizados para generar iPSCs fue el uso de plásmidos episomales que contenían los factores de reprogramación Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Este método fue muy eficaz para generar iPSCs a partir de células de la piel humana y permitió la generación de líneas celulares estables de iPSCs (Okita *et al.*, 2011).

Para hacer las iPSCs más aplicables en la clínica, se han desarrollado varios métodos no integrantes para evitar el riesgo de mutagénesis por inserción y alteraciones genéticas asociadas con la transducción mediada por vectores retrovíricos y lentivíricos. Estos métodos incluyen la reprogramación utilizando ADN episómico, mensajeros sintéticos modificados, virus Sendai, microRNAs y pequeñas moléculas, aunque la aproximación con pequeñas moléculas todavía no es aplicable a la derivación de iPSCs humanas (Takahashi & Yamanaka, 2016).

1.7.1 Aplicaciones de las iPSC.

El primer estudio clínico para evaluar células derivadas de iPSC humanas se inició en 2014. El estudio utilizó células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) derivadas de iPSC humanas para tratar la degeneración macular, y se informó que el tratamiento mejoraba la visión del paciente. Aunque el ensayo se suspendió posteriormente debido a la identificación de dos variantes genéticas en las iPSC de un segundo paciente, se prevé que se reanude (Scudellari, 2016).

Además, se han llevado a cabo otros estudios clínicos para evaluar el uso de células iPSC en el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, se han iniciado estudios clínicos con células iPSC para tratar la degeneración macular relacionada a la edad, la enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, diabetes e infarto de miocardio lo que resalta la importancia de esta tecnología en el tratamiento de enfermedades humanas (Trounson & DeWitt, 2016).

Aunque el uso de células iPSC tiene el potencial de ser una herramienta muy útil en el tratamiento de enfermedades, todavía hay muchos desafíos técnicos y científicos que deben abordarse antes de que esta tecnología esté disponible de manera amplia. Por ejemplo, es importante desarrollar técnicas para controlar el crecimiento y diferenciación de las células iPSC para que se conviertan en los tipos de tejidos deseados y para evitar el riesgo de formación de tumores. También es importante investigar los posibles efectos a largo plazo de utilizar células iPSC en el cuerpo humano y asegurar la calidad y seguridad de las células utilizadas en terapias (Shi *et al.*, 2017).

A pesar de estos desafíos, el campo de las células iPSC ha avanzado enormemente en los últimos años y es probable que en el futuro veamos un mayor uso de estas células en la investigación especialmente en el modelado de enfermedades que no tienen un estándar en modelos animales tal como el estudio de la cicatriz hipertrófica en la piel (Takahashi & Yamanaka, 2016).

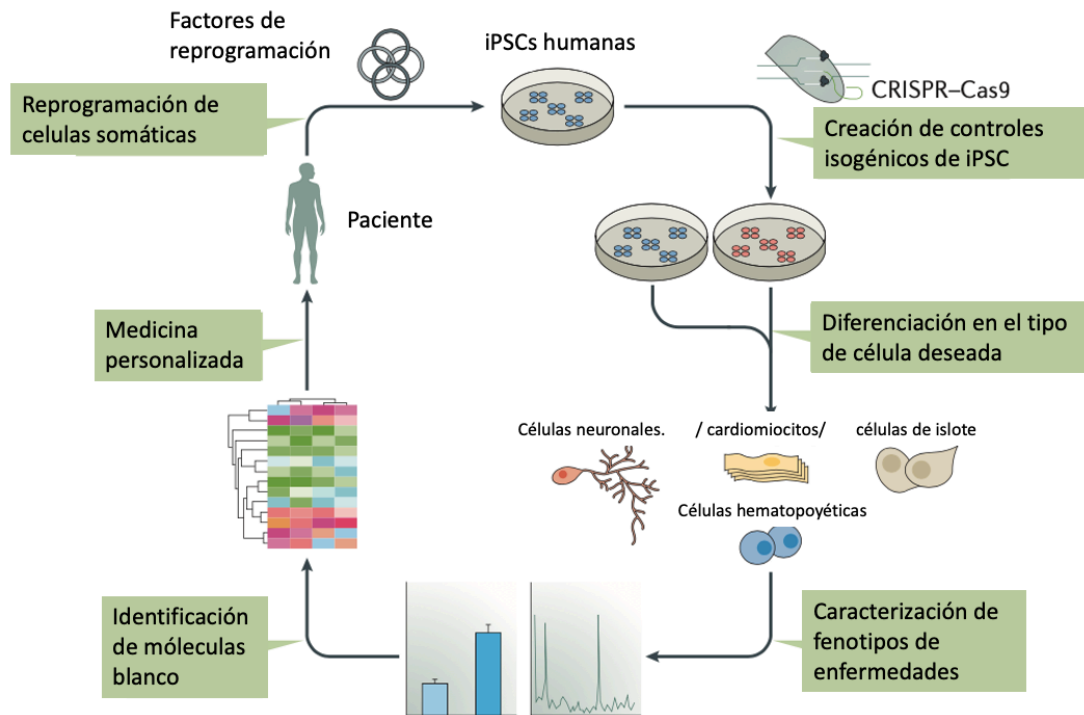


Figura 13. Esquemización del uso de células pluripotenciales inducidas iPSC para el modelado de enfermedades, su implicación en la búsqueda de nuevos fármacos y uso de estos en la medicina personalizada. Tomado de Shi *et al.*, 2017.

2. Antecedentes.

El artículo de Okita *et al.* (2011) es un importante antecedente en la generación de células pluripotentes inducidas (iPSC) humanas a partir de fibroblastos. Utilizando virus adenovirales y episomales como vectores, los autores desarrollaron un método más eficiente y seguro para generar iPSC, lo que aceleró el desarrollo de modelos biológicos basados en células iPSC para células humanas.

3. Hipótesis

- Si aislamos y reprogramamos miofibroblastos derivados de cicatriz hipertrófica hacia iPSC, los marcadores moleculares de fibrosis se expresarán en las iPSC obtenidas.

4. Objetivos

4.1 General

- Obtener miofibroblastos hipertróficos de biopsias de paciente con cicatriz hipertrófica e inducir su reprogramación hacia iPSC.

4.2 Particulares

1.-Obtener biopsia de cicatriz hipertrófica derivadas de cirugía estética y/o reconstructiva del Instituto Nacional de Rehabilitación.

2.-Aislar miofibroblastos de las biopsias obtenidas.

3.-Caracterizar los miofibroblastos obtenidos.

4.-Obtener fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y arrestarlos en G0

5.-Reprogramar fibroblastos a células pluripotenciales Inducidas (iPSC).

6.-Caracterizar los marcadores moleculares de la fibrosis en las iPSC obtenidas.

Planteamiento del problema

Cuando la piel sufre daños quirúrgicos o no quirúrgicos el tejido tiene limitantes en su capacidad de repararse y en algunas ocasiones puede llegar a producir una cicatriz hipertrófica. La fibrosis es un resultado no deseado de la cicatrización y del subsecuente tejido de reparación en varios tejidos del cuerpo y no existe un tratamiento adecuado.

Al reprogramar miofibroblastos de pacientes con cicatriz hipertrófica, resaltará la importancia del uso de iPSC como modelo biológico para avanzar en el estudio de los mecanismos moleculares y de diferenciación celular presentes en los miofibroblastos derivados de una cicatriz hipertrófica en el humano.

5 Metodología.

5.1 Obtención de la biopsia de paciente y cultivo primario.

Se obtuvieron muestras de piel de paciente con cicatriz hipertrófica derivados de cirugía estética y/o reconstructiva del Instituto Nacional de Rehabilitación. Cuyos criterios de inclusión son: muestras de un paciente adulto con cicatriz hipertrófica con al menos un año de evolución y de extensión de al menos 5cm², sin tratamiento previo de al menos 1 mes antes de la resección de la cicatriz. Posteriormente se colocaron en 6 pedazos en cajas de 6 pozos tratados previamente con gelatina, con medio DMEM 1X [Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium. (Gibco; Life Thecnologies, Grand Island, NY, USA)] acondicionado con 20% de suero fetal bovino (SFB;Gibco), 1% de antibiótico [penicilina 10.000 U/mL y estreptomina 10.000µg/mL. Gibco] durante 1 semana, después el medio fue reemplazado por medio DMEM 10% SFB con 1% de antibiótico. Posteriormente se monitoreo diariamente mediante microscopia para verificar el crecimiento de miofibroblastos. Una vez que se obtuvieron suficientes miofibroblastos se procedió a expandir el cultivo en botellas de cultivo de 75 cm² (Corning, Corning NY, USA). Ya obteniendo densidades celulares de más de 1x10⁶ células se procedió a aislar las células desprendiéndolas con tripsina (Gibco) y neutralizando con medio DMEM10% SFB con 1% antibiótico en una proporción 1:1 procediendo a centrifugar en tubos de centrifuga de 15mL (Corning) a 1500 rpm para su posterior criopreservación en 1ml de medio DMEM 10% SFB con 1% antibiótico y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO Sigma Aldrich, St. Lois, MO, USA). Las muestras fueron almacenadas en viales criogénicos de rosca interna de 2mL (Corning) en N₂ líquido.

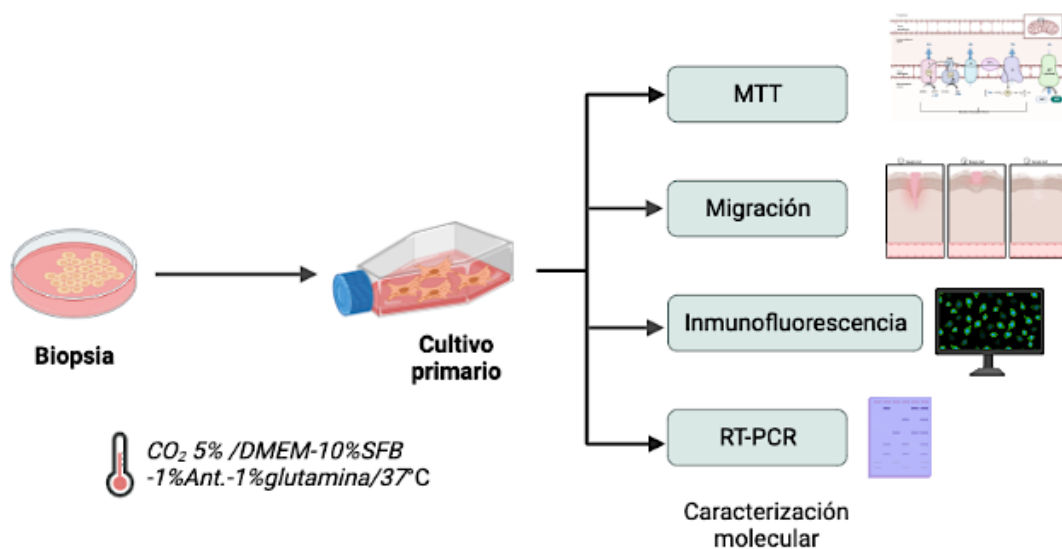


Figura 14. Obtención del cultivo primario y caracterización molecular de la línea celular proveniente de una biopsia de paciente con cicatriz hipertrófica.

5.2 Inmunofluorescencia

En cajas de 24 pozos [191 mm², (Costar, Corning NY, USA)] se depositaron cubreobjetos tipo circulares y se les agregaron 500µl de gelatina de cerdo 0.5% (Sigma Aldrich, St. Lois, MO, USA) a cada pozo y se dejó incubando la caja a 37°C /5% y CO₂ durante 24hrs con el objetivo de que las células se adhieran al cubreobjetos.

Se cultivó la línea celular BJ (fibroblastos humanos de prepucio de recién nacido) como control y miofibroblastos de muestras de paciente con cicatriz hipertrófica en las siguientes condiciones: medio DMEM 10% SFB 1% antibiótico/ 37°C/ 5% CO₂, hasta alcanzar una confluencia celular del 90% posteriormente se trataron con 5ml de tripsina (Gibco) al 0.3% y se incubaron a 37°C/ 5% CO₂ durante 8 min. Se agregaron 5ml de medio DMEM 10% SFB para parar la reacción y se centrifugaron en tubos de centrifuga de 15ml a 1000rpm durante 5min.

Se procedió a descartar el sobrenadante y se agregó 1ml de medio DMEM 10% SFB para su conteo celular mediante cámara de Neu Bauer, se tomaron 25000 células para cada pozo. En total se cultivaron 5 pozos por línea celular y se incubaron en 500µl de medio DMEM 10% de SFB 1% antibiótico / 37°C/ 5% CO₂ durante 24hrs.

Una vez transcurridas las 24 hrs. se descartó el medio y realizaron 3 lavados a los pozos con 500µl de PBS 1X (Gibco) durante 5 min en agitación y se procedió a fijar las células con 500µl solución de paraformaldehído (Sigma- Aldrich) al 4% durante 1hrs en agitación. Ya fijadas las células se procede a realizar 3 lavados con 500µl de PBS 1X 0.1% de albúmina de suero bovino (BSA, Bio-Rad, Berkeley, California, USA) durante 5 min en agitación.

Para el bloqueo y permeabilización de agregaron 500µl con una solución de PBS1X 10% Suero normal de cabra (SNC) y 0.3% de TRITON 100X (Sigma) durante 1 hrs, posteriormente se procedió a realizar 3 lavados con 500µl de PBS 1X 0.1% de BSA durante 5 min en agitación.

La incubación con anticuerpo primario para la detección de las proteínas α-SMA, Colagena tipo I, TGFβ-1, y faloidina (Abcam, Cambridge, UK) se realizó añadiendo una solución de PBS1X 10% suero normal de caballo (SNC, Abcam) en un volumen de 1:50 de anticuerpo primario. Se dejó incubar toda la noche a 4°C y se procedio a realizar 3 lavados 500µl de PBS 1X 0.1% de BSA durante 5 min en agitación.

Se procedió a realizar la incubación de anticuerpo secundario (Abcam) durante 1 hrs. para el caso de α-SMA TGFβ-1 y faloidina se utilizo una solución de PBS1X 10% SNC con anticuerpo Alexa Fluor 488 (Abcam) en una concetración 1:500 y en el caso de Colagena tipo I se utilizo una solución de PBS1X

10% SNC con anticuerpo DyE (Abcam) en una concentración de 1:1000 y se procedió a realizar 3 lavados con 500 μ l de PBS 1X 0.1% de BSA durante 5 min en agitación.

Para teñir los núcleos se agregó una gota de DAPI (Abcam) en un portaobjetos y se montó el cubreobjetos redondo con las células tratadas sobre la gota depositada.

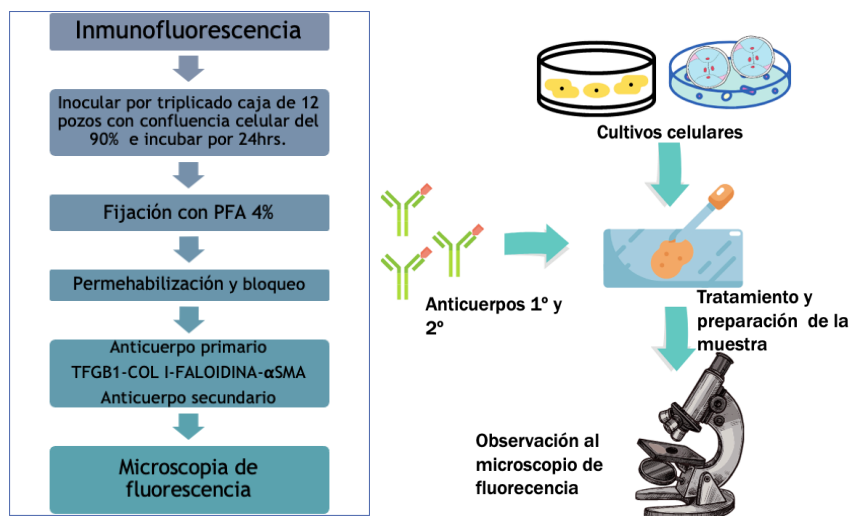


Figura 15. Diagrama de trabajo para realizar la metodología de inmunofluorescencia.

5.3 Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF)

Los fibroblastos se obtienen de embriones de ratón *Mus musculus* con 13.5 días de gestación. Para obtener los embriones, se sacrifica la rata preñada mediante dislocación cervical. Se desinfecta el abdomen con etanol 70%, se abre la pared abdominal y se extrae el útero, que se introduce en una caja de Petri con 50 ml de solución de Krebs. Se disecciona el útero con pinzas para sacar los embriones y se elimina la placenta con otras pinzas de disección. Se elimina la cabeza, el hígado y las vísceras de cada embrión para únicamente quedarse con la cavidad torácica. Ésta se pasa a otra placa con una solución de amortiguador de fosfatos (PBS) 1x donde se trocea lo más posible con las pinzas. Los agregados celulares se disocian mecánicamente con una jeringa y se colocan en cajas de Petri de 100 mm previamente tratadas con gelatina al 0.5% (Sigma-Aldrich, USA). Los fibroblastos son mantenidos en estas cajas con medio DMEM alto en glucosa (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco) y 1% de Penicilina/estreptomicina (Gibco). Los fibroblastos obtenidos directamente de los embriones se denominan fibroblastos pasaje c ó MEFs p0 (por sus siglas en inglés: Mouse Embryonic Fibroblast).

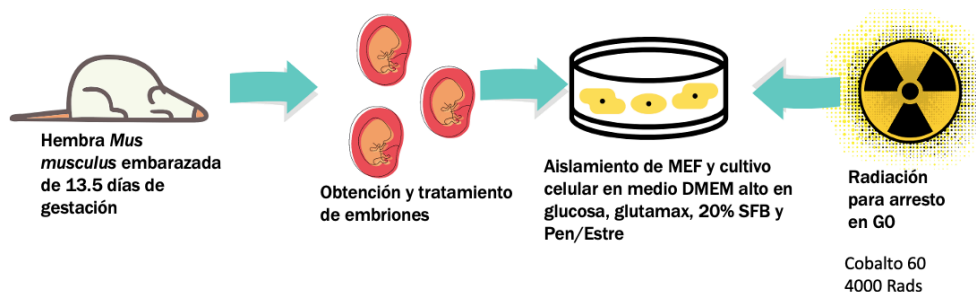


Figura 16. Diagrama de trabajo para realizar la metodología de la obtención de células alimentadoras.

5.4 Pasaje celular de fibroblastos

Cuando los fibroblastos hayan alcanzado una confluencia cercana al 100% de la superficie donde están sembrados, se realiza su pasaje celular. Se lavan las cajas con PBS 1X para quitar todas las células que no se hayan adherido. Se aspira el PBS, se coloca Tripsina al 0.5% y se incuba durante 5-8 minutos a 37 °C. La reacción de la Tripsina se detiene con medio con suero y se centrifuga la suspensión a 1200 rpm por 5 minutos. Se decanta el sobrenadante, el pellet se resuspende en 5 ml de medio y se realiza un conteo celular con azul de tripano en un hematocitómetro (Cámara de Neubauer). Se distribuye el medio con las células en frascos T25 (Corning) previamente tratados con gelatina de piel de porcino al 0.5% y se mantienen con medio DMEM/ 10%SFB/ 1% antibiótico. Los fibroblastos subcultivados aumentan su número de pasaje, siendo utilizando el pasaje 1 primeramente.

5.5 Reprogramación celular de miofibroblastos obtenidos de paciente y células BJ.

Se realizó una electroporación de los plásmidos episomales de Yamanaka que contienen 5 factores de transcripción L-MYC-Lin28 (pCXLE-hUL plásmido Addgene n.º 27080) Sox2-Klf4 (pCXLE-hSK plásmido Addgene n.º 27078), Oct3/4 (pCXLE-hOCT3/4 plásmido Addgene n.º 27076) y además de tener un plásmido reportero con el gen del GFP (pCXLE-EGFP plásmido Addgene n.º 27082) (Apéndice 1). Los plásmidos se nucleofectaron en en dos diferentes concentraciones (1µg y 3µg) a en una confluencia celular de 100,000 miofibroblastos obtenidos de un tejido con cicatriz hipertrófica. Una vez realizada la electroporación se procedió a cultivar las células con medio DMEM 10% SFB con 1% de antibiótico. Al siguiente día se le agregó Ac. Valproico que se ha documentado aumenta la eficiencia de la reprogramación celular y se le aplicó cada 2 días durante seis días. Posteriormente se levantaron con enzimas TrypLE (Gibco) y se cultivaron en una caja de cultivo circular de 100mm con células alimentadoras fibroblastos embrionarios de ratón (MEFi) previamente inoculadas y medio

DMEM Knock-out (Gibco) para células troncales y complementado con 20% de reemplazo de suero (Gibco) . Se monitorea el cultivo con microscopía óptica y de fluorescencia.

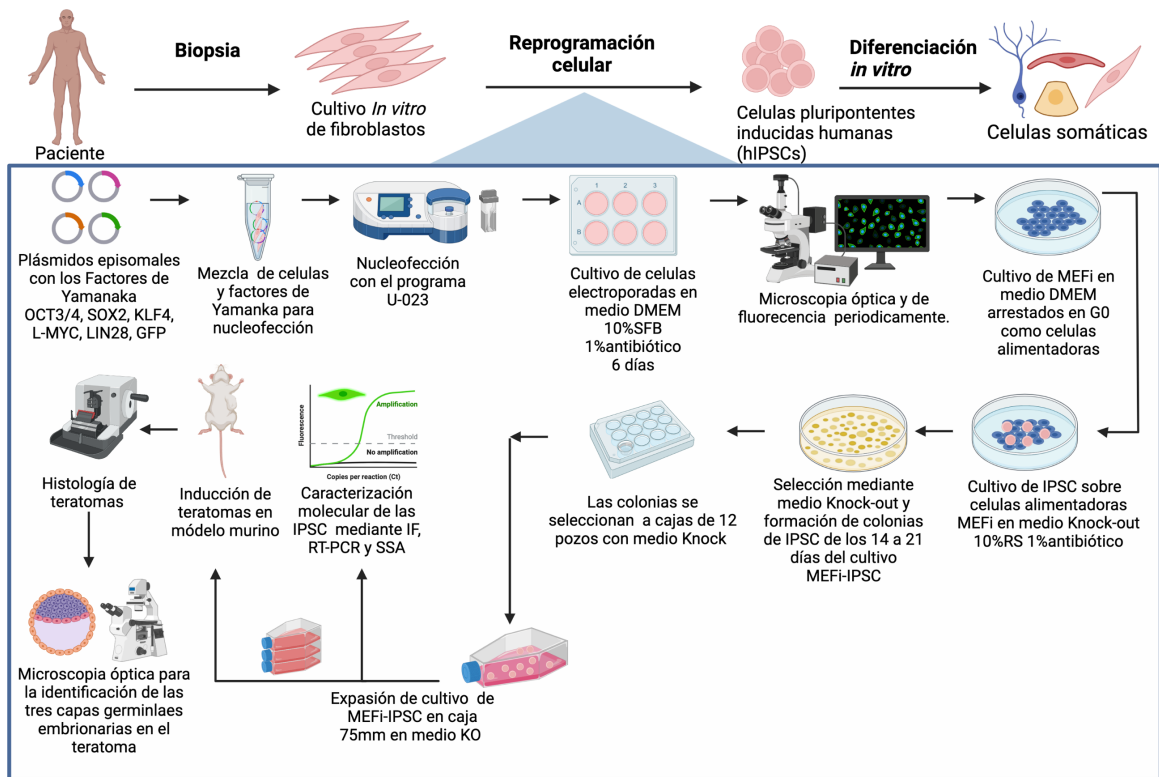


Figura 17. Diagrama de trabajo para realizar la metodología de reprogramación celular.

5.6 Ensayos de migración celular

Con el objetivo de medir la capacidad de migración celular de las líneas celulares BJ y miofibroblastos se realizó un ensayo de cierre de herida, para ello se obtuvieron cultivos en monocapa con una confluencia de aproximadamente 90% en placas de 6 pozos, asegurando que ambas líneas celulares tuvieran la misma confluencia celular. Posteriormente se procedió a realizar la “herida” trazando una línea con puntas estériles (P200) en un ángulo de aproximadamente 30°. Una vez realizada la “herida” se procedió a lavar el pozo dos veces con PBS para descartar los restos celulares desprendidos de la zona de la “herida”.

Posterior a la creación de la herida se tomaron micrografías con el objetivo de 10X a las 0 y 24 hrs de la zona en donde se realizó la “herida” para evaluar la migración celular general.

Ensayo de migración (scratch)

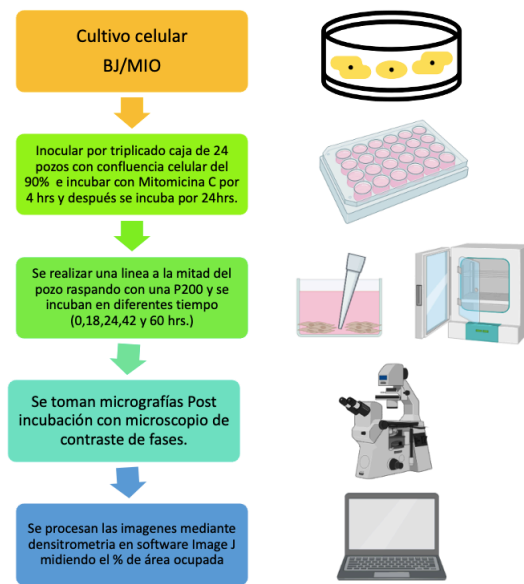


Figura 18. Diagrama de trabajo para realizar la metodología del ensayo de migración.

5.7 Ensayos de viabilidad celular

Se realizaron ensayos MTT con el objetivo de medir el metabolismo celular viable, incubando con 5×10^3 , 10×10^3 , 20×10^3 , 40×10^3 , 80×10^3 , y 120×10^3 células de las líneas celulares BJ y miofibroblastos por 24 hrs. a 37°C en placas de 96 pozos. Posteriormente se agregaron a las células $10 \mu\text{l}$ de reactivo MTT (Sigma- Aldrich) con una concentración de 5 mg/ml en $190 \mu\text{l}$ de medio DMEM 10% SFB, 1% antibiótico y se dejó incubar a 37°C por 4 hrs.

Una vez terminada la incubación se procedió a disolver los cristales de formazán agregando $200 \mu\text{l}$ de una solución 1:1 de alcohol isopropílico (Sigma-Aldrich) y DMSO, para su posterior lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 570-630nm (Kumar *et al.*, 2018).

Ensayo de actividad metabólica MTT



Figura 19. Diagrama de trabajo para realizar la metodología del ensayo de viabilidad celular MTT.

5.8 Ensayos RT.PCR

Se agregaron 5 µl de la mezcla de buffer 5X DTT 0.01M, 25 mM de cada dNTP, oligonucleótido Nedted-dt 10mM y 200 U de la enzima retotranscriptasa Super Script. III (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en el termociclador con capacidad de incubación de la siguiente manera 10 min a 22°C de polimerización a 42°C y 15 min a 70°C para inactivar la reacción. Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed (Biotium Landing Parkway Fremont, CA, USA (1%), y se estimó su tamaño con el marcador de peso molecular (escalera de 1kb, Invitrogen).

El cDNA resultante se utilizó como templado para detectar los transcritos mediante PCR. Para cada reacción se usaron 1U de polimerasa (Sigma) Buffer 1X MgCl₂ 2mM, 25mM de cada dNTP, 100ng de cada oligonucleotidos requeridos. Se usaron 15 ciclos 20 seg de desnaturalización a 92°C, 30seg de alineamiento 45 °C y 45 seg de elongación a 72°C. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed al 1%.

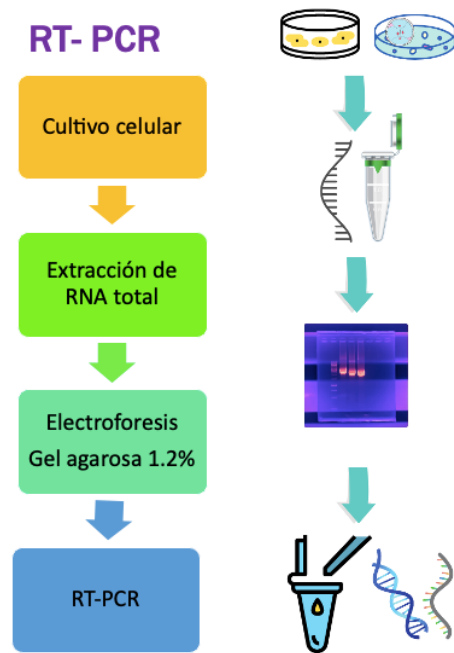


Figura 20. Diagrama de trabajo para realizar la metodología del ensayo de RT-PCR.

5.9 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron procesados mediante el software PRISMA mediante los estadísticos regresión lineal, y la prueba de T de Student con una $p < 0.05$ con experimentos por triplicado ($n=3$).

6.Resultados.

6.1 Aislamiento de miofibroblastos.

En esta investigación se obtuvo una muestra de piel de paciente con cicatrices hipertróficas derivadas de cirugías estéticas y/o reconstructivas del Instituto Nacional de Rehabilitación. La paciente cumplió con los criterios de inclusión y se logró obtener una línea celular de miofibroblastos humanos a partir de la biopsia proporcionada.

Una vez que se obtuvieron suficientes miofibroblastos a partir de pacientes con cicatrices hipertróficas, se procedió a expandir el cultivo en cajas de 75mm y a congelar las muestras en 1ml de medio DMEM al 10% de SFB con 1% de antibiótico y 10% de DMSO. Las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido. Los resultados mostraron que fue posible obtener y cultivar miofibroblastos a partir de muestras de piel de pacientes con cicatrices hipertróficas con éxito (Fig. 21). (Fig. 21).

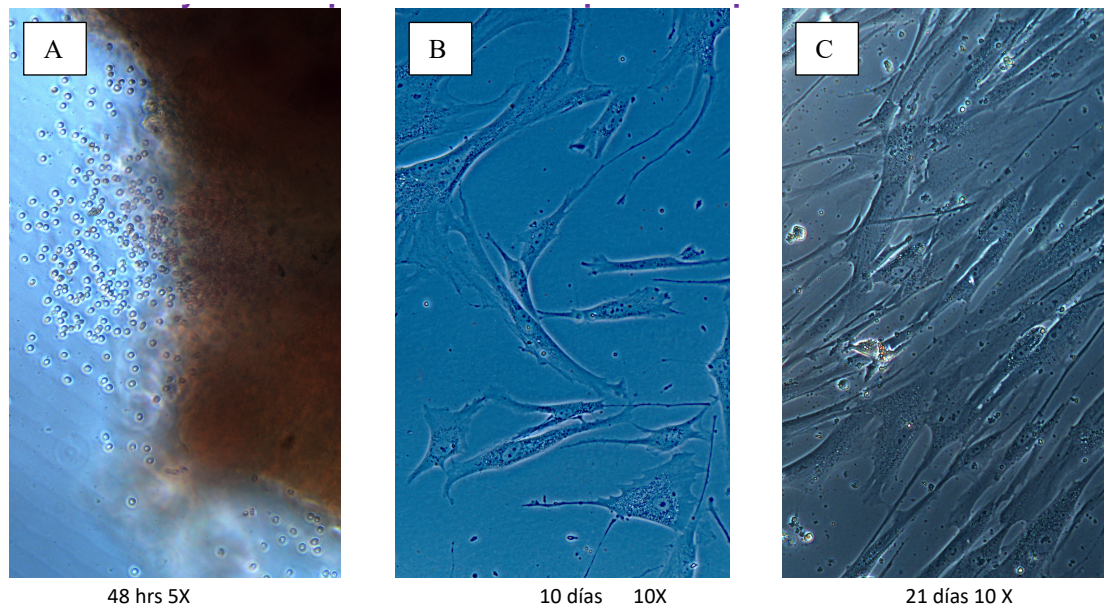


Figura 21. Microscopia de contraste de fases de Miofibroblastos obtenidos de biosias de paciente. a) Biopsia a las 48hrs. b) Periferia de la biopsia a los 10 días. c) Cultivo celular en cajas de 75mm con una alta densidad celular.

6.2 Caracterización de miofibroblastos por inmunofluorescencia.

Para confirmar que aislamos miofibroblastos a partir de las biospias de pacientes con cicatriz hipertrófica se realizaron inmunofluorescencias de marcadores moleculares para células del tipo miofibroblasto. Se observa una mayor expresión de las proteínas Colagena tipo I, α -SMA, faloidina y TGF β -1 (Fig. 22) en células tipo miofibroblasto con respecto a las células BJ (fibroblastos), lo que nos indica que se obtuvo con éxito la línea celular de miofibroblastos. Para comprobar que la diferencia en la expresión de las proteínas sea estadísticamente significativa, se procedió a cuantificar las

inmofluorescencias. Como podemos observar en la figura 23 encontramos un aumento estadísticamente significativo en los miofibroblastos cuando se cuantifico la expresión relativa de Colágena I, α -SMA y TGF β -1 lo que nos comprueba el fenotipo celular típico de miofibroblasto.

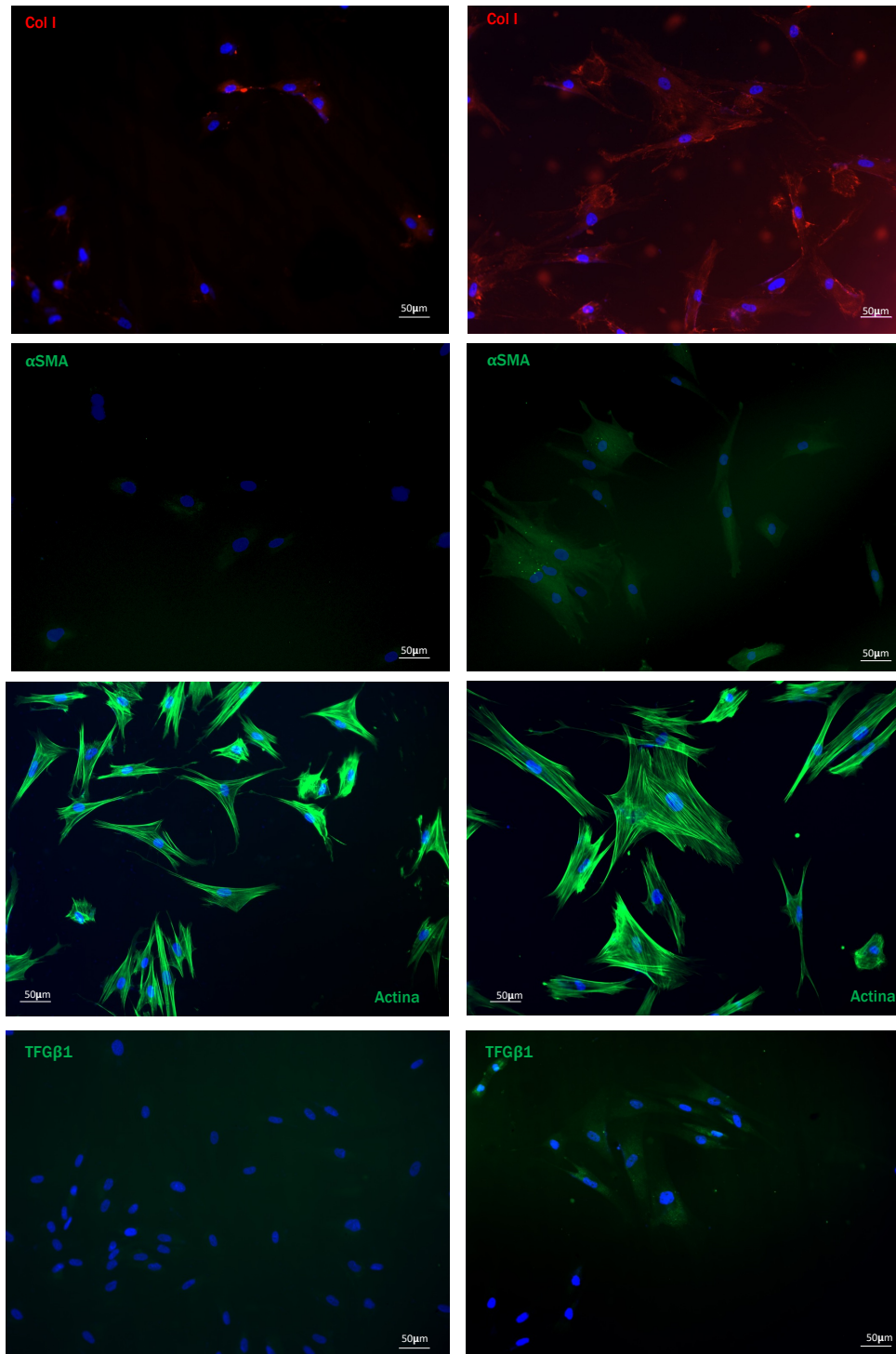


Figura 22. Microscopia de fluorescencia de células BJ (Control) panel izquierdo y miofibroblastos (paciente) panel derecho de diferentes marcadores moleculares: (Col I) Colágena tipo I, α SMA. Faloidina (Actina) y TGF β -1.

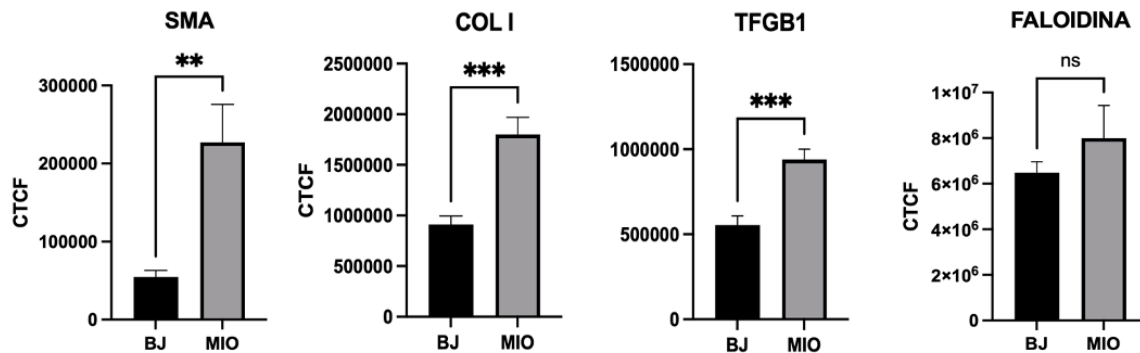


Figura 23. Análisis estadístico de la expresión relativa (CTCF) de las proteínas α -SMA, Colagéna tipo I, TGF β -1, y filamentos de actina (Faloidina). Los asteriscos representan el valor de p: * <0.05 , ** <0.005 , *** <0.001 , NS= No hay diferencia significativa.

6.3 Ensayos de migración celular

Con el objetivo de continuar con la caracterización de la línea celular del tipo miofibroblasto, se realizaron ensayos de migración celular (scratch). Los experimentos realizados en fibroblastos y miofibroblastos muestran que los miofibroblastos (Fig. 24 panel derecho) muestran un desplazamiento más lento con respecto a las células del tipo fibroblasto (Fig. 24 panel izquierdo). Los resultados obtenidos concuerdan con los experimentos de migración realizados por Anderson en 2006. Por lo que se las células obtenidas de la biopsia se comportan como miofibroblastos ya que mediante densitometría se evaluó el área disponible con ayuda del software Imaje J y los datos se analizaron con la prueba T de Student y mostraron diferencias significativas con el área ocupada a través del tiempo.

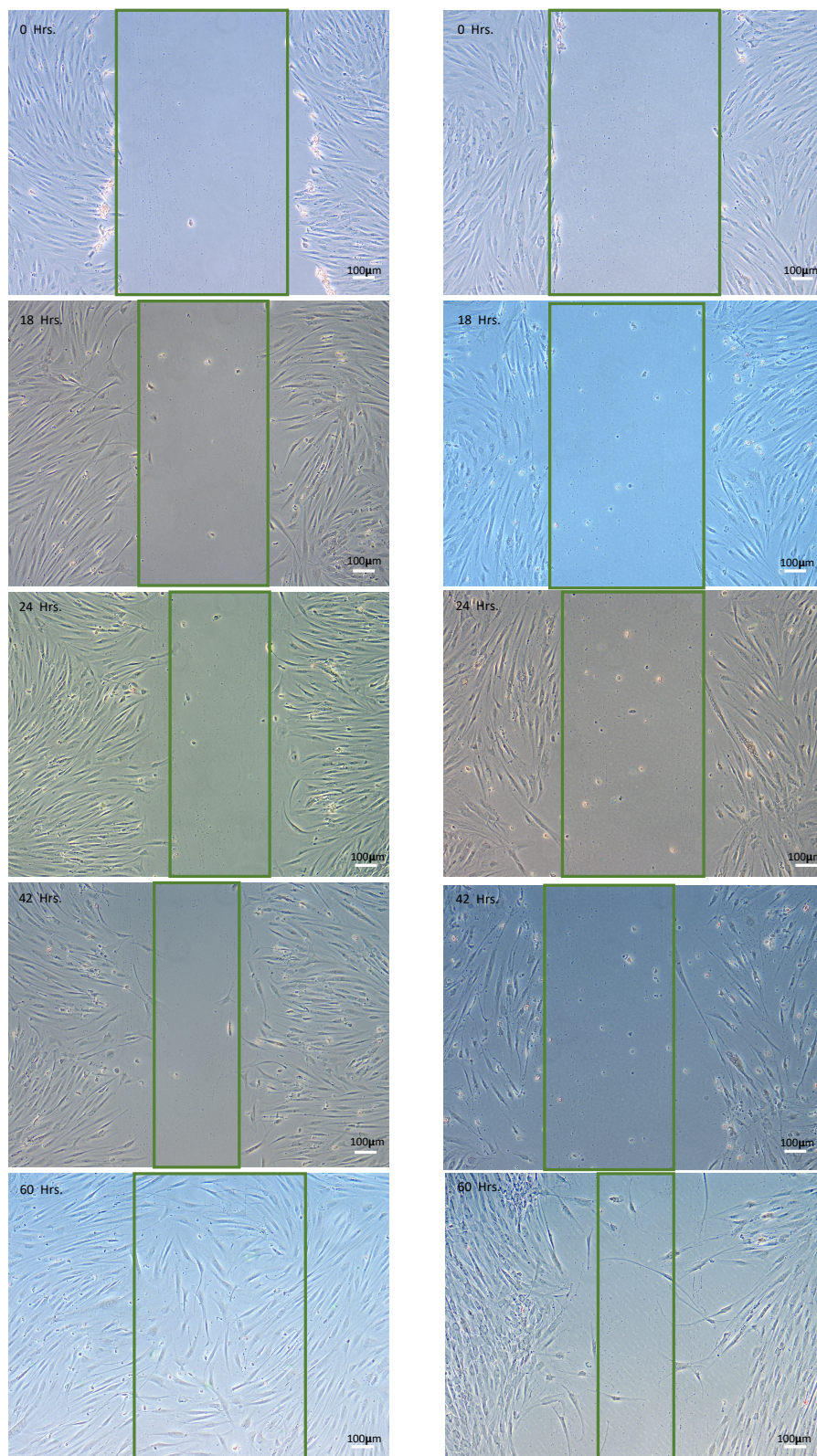


Figura 24. Microscopia de contraste de fases en 10X del ensayo de migración de células BJ (control) izquierda y miofibroblastos derecha, en diferentes tiempos 0, 18, 24, 42 y 60 hrs.

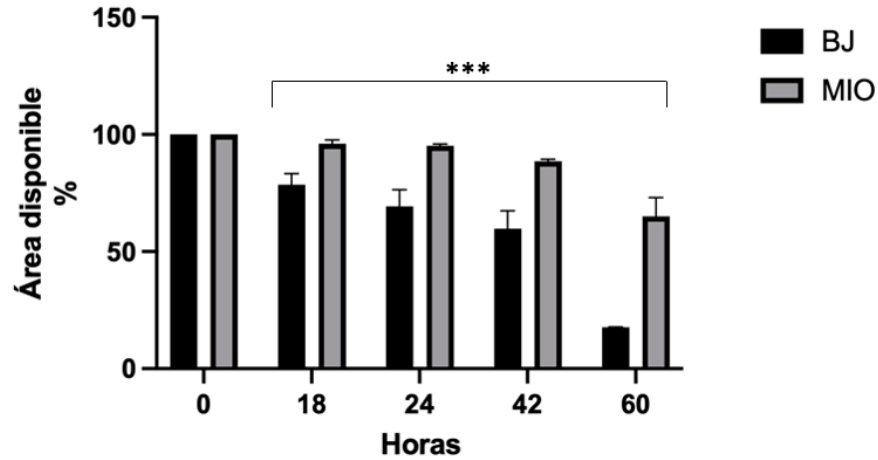


Figura 25. Análisis estadístico del ensayo de “scratch” o migración celular. Se observan las medias del porcentaje de área disponible $n=3$ (BJ y miofibroblastos) en diferentes tiempos (0,18,24,42 y 60 hrs). Los asteriscos representan el valor de p : $***<0.001$

6.4 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Para conocer el efecto metabólico de células tipo miofibroblásticas y fibroblásticas se realizó un ensayo de actividad metabólica a través de la reducción de MTT. Se observa que las células del tipo fibroblasto tienen una mayor actividad metabólica con respecto a las células tipo miofibroblasto (Fig.26).

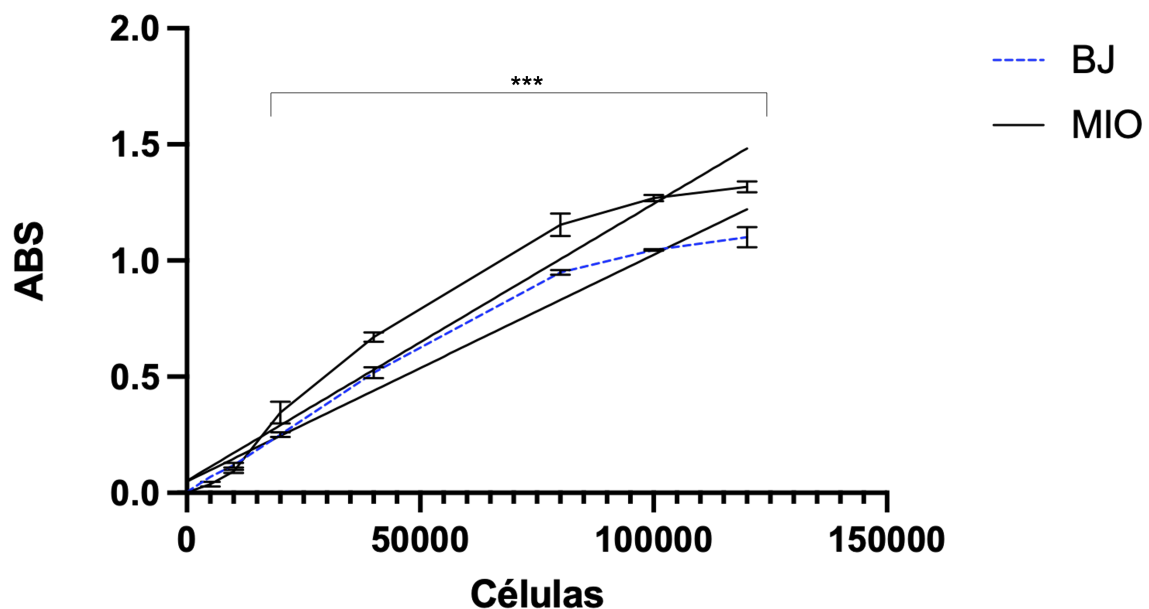


Figura 26. Análisis estadístico de regresión lineal del ensayo MTT se observa una mayor actividad metabólica en células BJ (azul punteada) con respecto a las células tipo miofibroblasto (negra).

6.5 Análisis de la expresión del mRNA de Colagena tipo I, α SMA y TGF β -1 por ensayos RT-PCR.

Para medir la expresión de mRNA de Colagena tipo I, α -SMA y TGF β -1 en el cultivo primario obtenido de biopsias de paciente con cicatriz hipertrófica se utilizó el método de RT-PCR en punto final (Fig. 27). Para el procedimiento se preparó cDNA a partir de las muestras de RNA total extraídas tanto del cultivo primario así como de fibroblastos de prepucio de neonato humano como control. Posteriormente se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos para el reconocimiento de los mRNAs de Colagena tipo I (COL1A1), actina alfa del músculo liso (ACTA2) y TGF β -1 (TGFB1), observándose las siguientes bandas del tamaño esperado (Tabla 1. Apéndice 1) tanto en la líneas celulares de cultivo primario así como en la línea control teniendo una mayor expresión relativa de la línea celular proveniente de la biopsia (Fig. 28). Así, con este ensayo se confirmó que en el cultivo obtenido de paciente con cicatriz hipertrófica hay una mayor cantidad de células del tipo miofibroblasto ya que se realizaron análisis estadísticos del tipo T de Student con un valor de p de 0.05 mínimo tomando en cuenta los valores de densitometría obtenidos por el software Image J (Fig. 28).

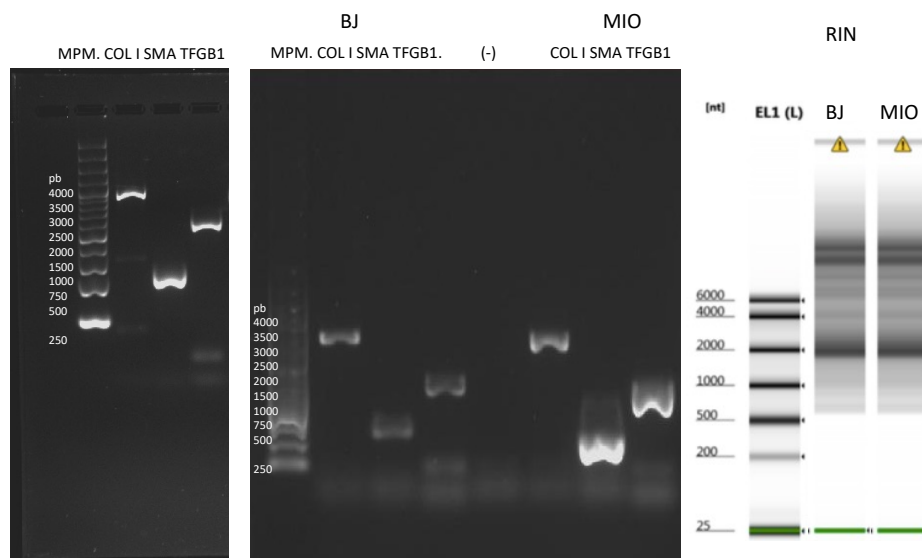


Figura 27. Izq. Ensayo PCR de cDNA de línea celular BJ para probar los oligonucleótidos de Colagena tipo I, SMA y TGF β -1. Centro Ensayo RT-PCR para verificar la abundancia del mRNA de Colagena tipo I, SMA y TGF β -1 en la línea celular BJ (control) y en la línea obtenida de biopsia de paciente con cicatriz hipertófica utilizando RNA total (cDNA) y control negativo de la retrotranscripción en el que se utilizó H₂O en lugar de enzima (RT-). Derecha. Ensayo de integridad de ARN (RIN)

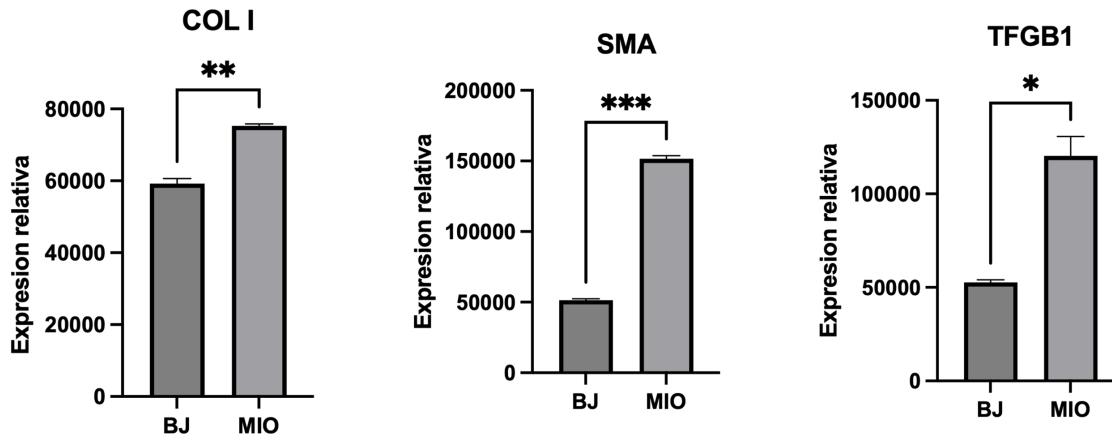


Figura 28. Cuantificación de la expresión relativa del ensayo RT-PCR en líneas celulares BJ y cultivo primario obtenido de paciente con cicatriz hipertónica (MIO) n=3. Los asteriscos representan el valor de p: *>0.05, **=0.005, ***>0.001.

6.6 Aislamiento de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF)

Con la intención de obtener una capa adherente que soportara el mantenimiento y crecimiento de las células troncales pluripotenciales, se realizó el cultivo y posterior inactivación (por radiación) de fibroblastos embrionarios de ratón (Fig. 29).

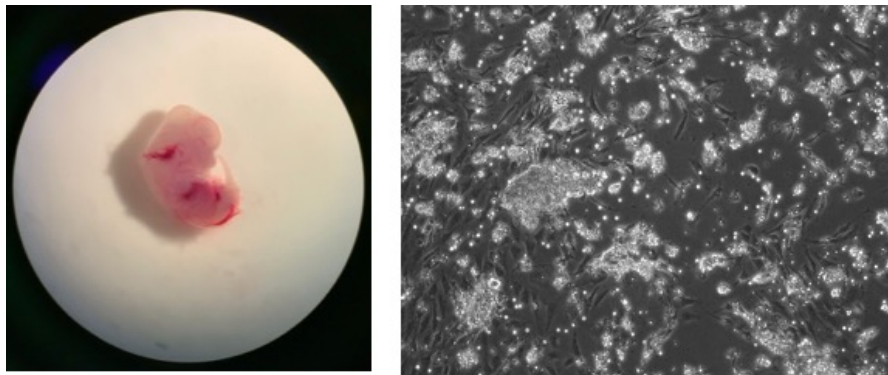


Figura 29. (A) Embrión de Embrión de ratón Hembra *Mus musculus* (Balb/C) embarazada de 13.5 días de gestación. (B) Microscopía óptica de líneas celulares obtenidas a partir de los embriones.

6.7 Reprogramación células BJ y miofibroblastos

Fibroblastos humanos BJ1 y miofibroblastos fueron reprogramados (Fig.30, 31) utilizando plásmidos episomales según el método de Okita *et al.*, 2011. Durante los primeros días después de la transfección, se observa una alta proporción de células que no sobreviven al procedimiento. Después de 6 días de iniciado el experimento, se observa la aparición de algunos cúmulos cuyas células tienen un aspecto más redondo y de menor tamaño que el que tienen los fibroblastos. Con el paso de los días, los cúmulos observados siguieron creciendo en el número de células que

contenían. A partir de 12-14 días post-transfección, los cúmulos celulares comienzan a parecer colonias con clara morfología tipo hESC, las cuales se siguieron cultivando pero en el proceso de expansión perdieron la capacidad de proliferación.

Mediante microscopía de fluorescencia se detecto el gen reportero que codifica para la proteína GFP en la figura 37 se observa como células dentro de la población celular emiten la señal de la GFP lo que nos indica que la electroporación tuvo éxito. Además se observa como los miofibroblastos comienzan a cambiar morfológicamente de células alargadas y estrelladas a células redondeadas que son una característica de las células troncales.

Las iPSC obtenidas tienden a agruparse y formar colonias alrededor del día 20 post transfección. También se observó que el número de células alimentadoras (MEFi) es de suma importancia para mantener la pluripotencia de las células, ya que si no hay suficientes la colonia en la periferia comienza a tomar nuevamente una morfología de fibroblasto.

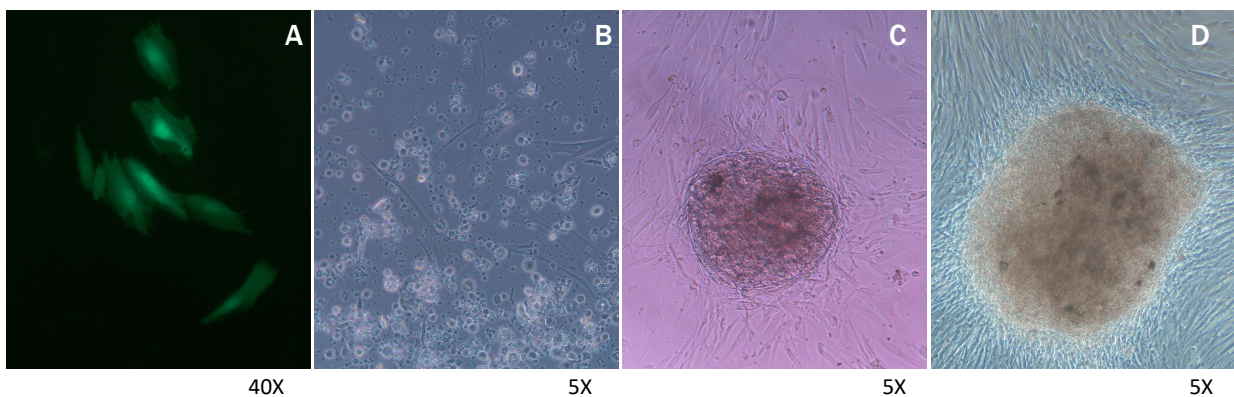


Figura 30. Microscopía de fluorescencia y óptica de los cultivos transfectados de BJ con los factores de Yamanaka en diferentes tiempos: (A) 7 días (B) 15 días (C) 25 días (D) 35 días post transfección. En total se obtuvieron 13 colonias de iPSC.

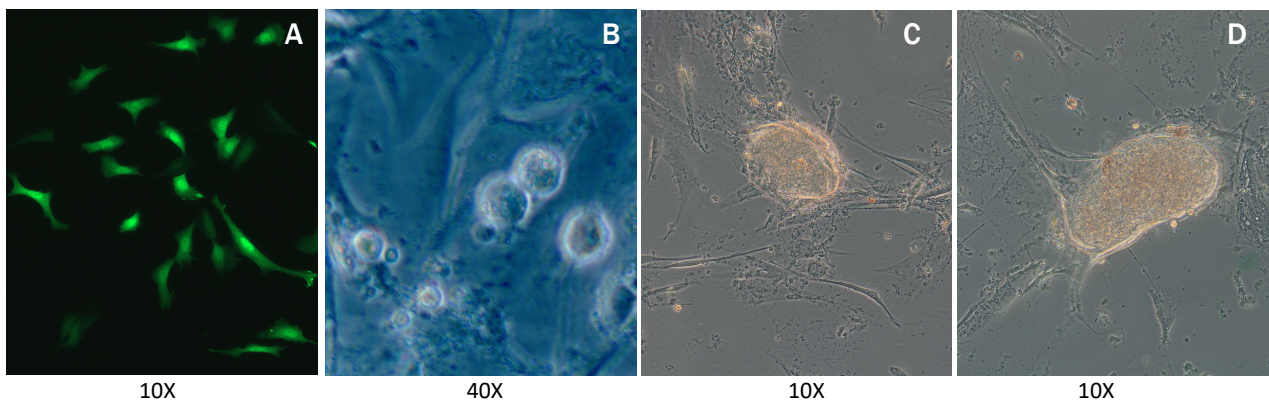


Figura 31. Microscopías ópticas y de fluorescencia de los cultivos transfectados de miofibroblastos con los factores de Yamanaka en diferentes tiempos: (A) 7 días (B) 15 días (C) 25 días (D) 31 días post transfección.

7. Discusión

La cicatrización es un proceso complejo en el que se reestablecen las propiedades mecánicas y fisiológicas de la piel. Los fibroblastos tienen la función de contraer las heridas y secretar elementos de la matriz extracelular durante la cicatrización, pero una proliferación descontrolada de fibroblastos, miofibroblastos y una excesiva deposición de la matriz extracelular contribuyen a la formación de una cicatriz hipertrófica.

La activación de los miofibroblastos es clave para la reparación de las heridas, ya que son las principales células que secretan matriz extracelular durante la cicatrización y la fibrosis y son responsables de la contractibilidad en el tejido de cicatrización y su maduración. El papel de los miofibroblastos en el desarrollo de la matriz extracelular y en la reparación anormal del tejido ha sido estudiado en diversos órganos como el pulmón (Hardie *et al.*, 2009), hígado (Hernández-Gea *et al.*, 2011), riñón (Meran *et al.*, 2011), músculo esquelético (Serrano *et al.*, 2011), y corazón (Blankesteyn *et al.*, 2010). La obtención de miofibroblastos de humanos es un proceso que puede realizarse a partir de biopsias de diferentes tejidos humanos, como la piel, el pulmón y el hígado y así poder ayudar en su investigación utilizando cultivos *in vitro* como modelos biológicos de estudio de la fibrosis en humanos (Thannickal *et al.*, 2014).

Por lo que se procedió en este estudio a obtener biopsias de piel de pacientes con cicatriz hipertrófica derivados de quemaduras, obtener cultivos primarios y caracterizar los miofibroblastos mediante técnicas de análisis de proteínas y ácidos nucleicos, como inmunofluorescencia y RT-PCR, evaluando la expresión relativa de marcadores específicos de miofibroblastos (α -SMA, Col I, Actina y TGF β -1) y así determinar las características de expresión génica del cultivo obtenido de la biopsia, que tuvieron una alta expresión de los marcadores de miofibroblasto (Hetzler *et al.*, 2019).

Además de estas técnicas moleculares, los miofibroblastos se caracterizaron mediante ensayos funcionales para complementar la caracterización, como fue el ensayo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) y el ensayo de migración que son útiles para comparar la viabilidad celular y la capacidad de movilidad de los miofibroblastos con la de otros tipos de células, como los fibroblastos (Meyer-ter-Vehn *et al.*, 2006).

Los ensayos funcionales que se utilizaron para caracterizar a los cultivos primarios indican que hay una diferencia entre ambas líneas celulares mostrando que el cultivo primario contiene el tipo celular de miofibroblastos. (Micallef *et al.*, 2012). Esto debido a que existe un estudio que comparó la actividad metabólica de miofibroblastos y fibroblastos de pulmón humano encontró que los

miofibroblastos tenían una mayor actividad mitocondrial así como se demostró en los experimentos de viabilidad con el reactivo MTT realizados en este estudio ya que la contracción es crucial para mantener el fenotipo diferenciado de los miofibroblastos. La contracción es un mecanismo dependiente de la energía que se basa en la producción de ATP por las mitocondrias y/o la glucólisis lo que representa una mayor tasa de consumo de oxígeno que los fibroblastos por ende una mayor actividad metabólica, los miofibroblastos al tener una mayor actividad contráctil reduce su migración que concuerda con los datos de este estudio. Así mismo en los miofibroblastos estudiados por Bernard *et al.*, 2015 tuvieron una mayor expresión de genes mitocondriales. Lo que sugiere fuertemente que en el cultivo primario obtenido de biopsias de paciente con cicatriz hipertrófica hay principalmente miofibroblastos ya que presentaron una mayor viabilidad celular que las células control utilizados que fueron fibroblastos de prepucio de neonato.

Además, se ha comparado la actividad metabólica de miofibroblastos y fibroblastos de hígado humano y se encontró que los miofibroblastos tenían una mayor tasa de producción de ácido láctico y una mayor actividad lítica que los fibroblastos. Los miofibroblastos también tuvieron una mayor expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos y la producción de ATP.

Estas diferencias en la actividad metabólica pueden tener importantes implicaciones en el papel de los miofibroblastos en la fibrosis y en la cicatrización de heridas (Chen *et al.*, 2020).

En conjunto los datos moleculares y funcionales indican que en nuestro cultivo primario obtenido de biopsias de paciente con cicatriz hipertrófica corresponden a miofibroblastos humanos.

Una vez caracterizados, los miofibroblastos, se procedió a la reprogramación de ambas líneas celulares, mediante el uso de factores de transcripción específicos y técnicas de ingeniería genética como es la nucleofección y vectores virales (Yamanaka *et al.*, 2016).

La reprogramación de células somáticas a células pluripotentes inducidas (iPSC) es un proceso crucial en la medicina regenerativa y en la investigación biomédica para la generación de modelos biológicos de enfermedades en humanos. A pesar de que la reprogramación celular se ha convertido en un proceso relativamente común, aún no se comprenden completamente los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso. Una de las formas de hacerlo es mediante el uso de plásmidos episomales, que son fragmentos de ADN que se insertan temporalmente en el genoma de la célula y se replican junto con él (Okita *et al.*, 2011). En este estudio se utilizaron plásmidos episomales para nucleofectar a los miofibroblastos obtenidos con factores de transcripción de Yamanaka que promuevan su diferenciación hacia iPSC.

Otra forma de diferenciar miofibroblastos hacia iPSC es mediante el uso de vectores virales, como el virus de Sendai. Los vectores virales se pueden utilizar para transducir a los miofibroblastos con factores de transcripción específicos que promuevan su diferenciación hacia iPSC, como los factores de transcripción de Yamanaka (Fukashi *et al.*, 2009).

La reprogramación de miofibroblastos hacia iPSC puede ser útil para estudiar la biología de estas células, su diferenciación y su papel en diferentes procesos patológicos, como la fibrosis, ya que actualmente no existe un modelo estandar para su estudio en células humanas (Gao *et al.*, 2018). Además, la obtención de iPSC a partir de miofibroblastos puede ser un buen modelo de estudio para desarrollar terapias celulares personalizadas para tratar diferentes enfermedades, ya que las iPSC pueden ser diferenciadas en cualquier tipo de célula del cuerpo humano (Trounson & DeWitt, 2016.) Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, la diferenciación de miofibroblastos hacia iPSC ha sido hasta el momento bastante ineficiente y ha resultado en éxitos limitados en nuestro estudio. No así para la reprogramación de los fibroblastos con los que si tuvimos éxito en la reprogramación. La deficiencia en la reprogramación podría deberse a que el ADN episomal puede ser eliminado de la célula durante la reprogramación o durante el proceso de diferenciación, lo que puede limitar la estabilidad de las líneas celulares de iPSCs generadas.

Además, es posible que la capacidad de los miofibroblastos para diferenciarse hacia iPSC dependa de factores específicos del individuo donde provienen las muestras, como su edad y estado de salud (Hishida *et al.*, 2022).

Así mismo la memoria somática de células que se refiere a los rasgos fenotípicos y funcionales de una célula que se derivan de su linaje celular, su edad y su entorno metabólico. La memoria somática se considera una propiedad intrínseca de las células somáticas que se conserva durante la reprogramación celular principalmente en células con una alta diferenciación como los miofibroblastos lo que pudo ser una limitante para el proceso de reprogramación celular (Khoo *et al.*, 2020).

Otros estudios han demostrado que las células iPSC no son idénticas a las células troncales embrionarias. Algunas marcas epigenéticas en las células somáticas no se borraron por completo durante la reprogramación y se transmitieron a las células iPSC que luego se conservaron como memoria. A menudo se encontró que esta memoria somática se manifiesta como una mejora funcional en el potencial de diferenciación de las células iPSC hacia el tejido de origen. La primera evidencia de retención de memoria somática fue revelada por Kim *et al.* en 2010 quienes demostraron que las células iPSC pueden retener firmas epigenéticas de origen somático y mostraban preferencia en la propensión a la diferenciación hacia su tejido de origen.

Se ha demostrado que los miofibroblastos que generan fibrosis en diferentes tejidos (corazón, hígado, riñón, pulmón, y ojo) tienen una alta cantidad de modificaciones epigenéticas que van desde metilación de ADN, modificaciones en histonas y ARNs no codificantes que tienen implicación en múltiples genes y su expresión, contribuyendo al régimen transcripcional de los miofibroblastos que influyen en el fenotipo de los miofibroblastos que ocasionan fibrosis. Se ha identificado un número cada vez mayor de modificaciones epigenéticas en la regulación de estas vías de señalización que impulsan la activación de miofibroblastos y la progresión de la enfermedad (Duong & Hagood, 2018). Por lo que se infiere que estas marcas epigenéticas en los miofibroblastos tienen una implicación negativa en el proceso de reprogramación celular, además de que este tipo celular tiene una alta actividad metabólica y una memoria somática ya que es un tipo de célula altamente especializada, lo que en conjunto implica limitantes en su diferenciación completa hacia iPSC ya que en las células reprogramadas se notaba el inicio de la reprogramación celular pero no llegaban a formar colonias. Se necesita de una mejora en la eficiencia de reprogramación en este tipo de células derivadas de paciente y además altamente diferenciadas añadiendo otros factores de reprogramación además de los canónicos así como Lapasset *et al.* en 2011 informaron que mediante el uso de un cóctel que contenía genes para los cuatro factores de Yamanaka junto con NANOG y LIN28 para la reprogramación de células iPSC, lograron la generación de células iPSC a partir de fibroblastos en proliferación y fibroblastos senescentes, con una eficiencia generativa similar.

Para mejorar la eficiencia de la reprogramación celular Velychko *et al.* en 2019 mostraron que la sobreexpresión de OCT4 durante la reprogramación provoca cambios epigenéticos que deterioran la calidad de las iPSC. La eliminación de OCT4 de los factores para la inducción del proceso de reprogramación celular, genera iPSC con un potencial de desarrollo equivalente a las células troncales de origen embrionario, según lo determinado por su capacidad para generar ratones iPSC a través de la complementación de experimentos obteniendo exitosamente de embriones tetraploides.

También se ha visto que OCT4 es un mediador clave de la reprogramación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), ya que Rallabandi *et al.*, en 2022 utilizando vectores de reprogramación con virus de sarampión, controlaron la expresión microARN (miARN) dirigidos a OCT4 exógeno para detener su expresión durante la fase de transición mesenquimal a epitelial de la reprogramación. Mostraron que el OCT4 exógeno se requiere solo para el inicio de la reprogramación y es prescindible para la etapa de maduración. Sin embargo, la expresión continua de SOX2, KLF4 y c-MYC es necesaria para la etapa de maduración del iPSC. Por lo que el control de la expresión de OCT4 conduce a un aumento en la eficiencia de la reprogramación celular. Este nuevo enfoque podría

aplicarse a sistemas celulares de difícil obtención como los miofibroblastos para mejorar la eficiencia de los procesos de obtención de iPSC que son inducidos por vectores o plásmidos episomales.

8. Conclusiones

Los miofibroblastos obtenidos de biopsias de paciente con cicatriz hipertrófica expresan los marcadores de células del tipo miofibroblasto (α -SMA, Col I, Actina y TGF β -1), tienen una mayor actividad metabólica y una menor capacidad de migración con respecto a los fibroblastos. Los fibroblastos BJ si se lograron reprogramar hacia células pluripotenciales inducidas. Los miofibroblastos aislados a partir de la biopsia no se lograrón reprogramar.

9. Referencias bibliográficas

Arenas Gómez, C. M., Sabin, K. Z., & Echeverri, K. (2020). Wound healing across the animal kingdom: Crosstalk between the immune system and the extracellular matrix. *Developmental Dynamics*, 249, 834-846. <https://doi.org/10.1002/dvdy.178>

Bahar, M.A., Bauer, B., Tredget, E.E., Ghahary, A., 2004. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mrna. *Wound Repair Regen.* 12, 175–182.

Baker, A. H., Edwards, D. R., & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115(19), 3719–3727. <https://doi.org/10.1242/jcs.00063>

Balasubramanian, P., Prabhakaran, M. P., Sireesha, M., & Ramakrishna, S. (2013). Collagen in human tissues: Structure, function, and biomedical implications from a tissue engineering perspective. *Advances in Polymer Science*, 251, 173–206. https://doi.org/10.1007/12_2012_176

Bieber, T., et al. (2018). Skin aging. *Dermato-endocrinology*, 10(1), e1314245.

Blair, M. J., Jones, J. D., Woessner, A. E., & Quinn, K. P. (2020). Skin Structure-Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. *Advances in Wound Care*, 9(3), 127–143. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1021>

Blau, H. M., & Daley, G. Q. (2019). Stem Cells in the Treatment of Disease. *New England Journal of Medicine*, 380(18), 1748–1760. <https://doi.org/10.1056/nejmra1716145>

Bray, G. A. (2012). Medical consequences of obesity. *Endocrine Reviews*, 33(1), 56-68.

Brodsky, B., & Persikov, A. v. (2005). MOLECULAR STRUCTURE OF THE COLLAGEN TRIPLE HELIX. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)70009-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)70009-1)

Brohem, C. A., da Silva Cardeal, L. B., Tiago, M., Soengas, M. S., de Moraes Barros, S. B., & Maria-Engler, S. S. (2011). Artificial skin in perspective: Concepts and applications. In *Pigment Cell and Melanoma Research* (Vol. 24, Issue 1, pp. 35–50). <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x>

Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005). The cornified envelope: A model of cell death in the skin. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 6, Issue 4, pp. 328–340). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm1619>

Carswell, L., & Borger, J. (2022). Hypertrophic Scarring Keloids. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459221/>

Chaudhry, M. S., & Fisher, J. K. (2017). iPSC-derived cardiomyocytes in drug discovery and disease modeling. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 879.

Chen, C. J., Kajita, H., Takaya, K., Aramaki-Hattori, N., Sakai, S., Asou, T., & Kishi, K. (2022). Single-Cell RNA-seq Analysis Reveals Cellular Functional Heterogeneity in Dermis Between Fibrotic and Regenerative Wound Healing Fates. *Frontiers in Immunology*, 13.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.875407>

Chen, C. J., Kajita, H., Takaya, K., Aramaki-Hattori, N., Sakai, S., Asou, T., & Kishi, K. (2022). Single-Cell RNA-seq Analysis Reveals Cellular Functional Heterogeneity in Dermis Between Fibrotic and Regenerative Wound Healing Fates. *Frontiers in Immunology*, 13.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.875407>

Chen, X., Cheng, Y., Li, Y., & Huang, S. (2019). The role of miRNA in myofibroblast differentiation and function. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 18.

Coutier, J., Bonnette, M., Martineau, S., Mercadier, A., Domingues, S., Saidani, M., Jarrige, M., Polveche, H., Darle, A., Holic, N., Hadj-Rabia, S., Bodemer, C., Lemaitre, G., Martinat, C., & Baldeschi, C. (2022). Human-Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Keratinocytes, a Useful Model to Identify and Explore the Pathological Phenotype of Epidermolysis Bullosa Simplex. *Journal of Investigative Dermatology*, 142(10), 2695-2705.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.04.009>

D'Amour, K. A., Agulnick, A. D., Eliazer, S., Kelly, O. G., Kroon, E., Baetge, E. E., ... & Itskovitz-Eldor, J. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature*, 436(7047), 207-212.

D'Urso, M., & Kurniawan, N. A. (2020). Mechanical and Physical Regulation of Fibroblast–Myofibroblast Transition: From Cellular Mechanoresponse to Tissue Pathology. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.609653>

Da Silva, L. (2014). Stem cells: An overview. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2, 1-9.

Daley, G. Q. (2018). Induced pluripotent stem cells in disease modeling and drug discovery. *Nature*, 554(7692), 356-366.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008;321:1218-1221.

Duong, T. E., & Hagood, J. S. (2018). Epigenetic Regulation of Myofibroblast Phenotypes in Fibrosis. *Current pathobiology reports*, 6(1), 79–96. <https://doi.org/10.1007/s40139-018-0155-0>

Driskell, R. R., Jahoda, C. A. B., Chuong, C. M., Watt, F. M., & Horsley, V. (2014). Defining dermal adipose tissue. In *Experimental Dermatology* (Vol. 23, Issue 9, pp. 629–631).

<https://doi.org/10.1111/exd.12450>

Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr., et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009;457:277-280.

Eckes Beate, Roswitha Nischt, Thomas Krieg. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2010 3:4 1-11

Efe, J. A., et al. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), 5862-5867.

Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., & Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472(7342), 51-56.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 85(8), 348-362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>

Gao, L., Yang, L., Wang, L., Geng, Z., Wei, Y., Gourley, G., & Zhang, J. (2018). Relationship between the efficacy of cardiac cell therapy and the inhibition of differentiation of human iPSC-Derived nonmyocyte cardiac cells into Myofibroblast-like cells. *Circulation Research*, 123(12), 1313-1325. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313094>

García-Lepe, U. O., Torres-Dimas, E., Espinal-Centeno, A., Cruz-Ramírez, A., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2022). Evidence of requirement for homologous-mediated DNA repair during *Ambystoma mexicanum* limb regeneration. *Developmental Dynamics*, 251(6), 1035-1053. <https://doi.org/10.1002/dvdy.455>

Gómez-Abellán, P., Santos, C. G., Madrid, J. A., Milagro, F. I., Campion, J., Martínez, J. A., Luján, J. A., Ordovás, J. M. ^a, & Garaulet, M. (2011). Site-specific circadian expression of leptin and its receptor in human adipose tissue. *Nutr Hosp*, 26(6), 1394-1401. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.6.5305>

Gonzales, K. A. U., & Fuchs, E. (2017). Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. In *Developmental Cell* (Vol. 43, Issue 4, pp. 387-401). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.10.001>

Goulielmos, G., et al. (2017). Genetic predisposition to skin diseases: an overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 77(5), 847-865.

Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. In *Nature* (Vol. 453, Issue 7193, pp. 314-321). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature07039>

Hardie, W. D., Glasser, S. W., & Hagood, J. S. (2009). Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. In *American Journal of Pathology* (Vol. 175, Issue 1, pp. 3-16). American Society for Investigative Pathology Inc. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081170>

Hartoch RS, McManus JG, Knapp S, et al. Emergency management of chronic wounds. *Emerg Med Clin North Am*. 2007;25:203-221.

Henderson, N. C., Rieder, F., & Wynn, T. A. (2020). Fibrosis: from mechanisms to medicines. *NATURE*, 587(7835), 555-566. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/s41586-020-2938-9>

Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology*, 6, 425-456.

Hetzler, P. T., 3rd, Dash, B. C., Guo, S., & Hsia, H. C. (2019). Targeting Fibrotic Signaling: A Review of Current Literature and Identification of Future Therapeutic Targets to Improve Wound Healing. *Annals of plastic surgery*, 83(6), e92–e95. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000001955>

Hinz, B. (2010). The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics*, 43(1), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.020>

Hinz, B. (2015). Myofibroblasts. In *Experimental Eye Research* (Vol. 142, pp. 56–70). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.07.009>

Hinz, B., & Lagares, D. (2020). Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. In *Nature Reviews Rheumatology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 11–31). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0324-5>

Hinz, B., & Lagares, D. (2020). Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. In *Nature Reviews Rheumatology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 11–31). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0324-5>

Hishida, T., Yamamoto, M., Hishida-Nozaki, Y., Shao, C., Huang, L., Wang, C., Shojima, K., Xue, Y., Hang, Y., Shokhirev, M., Memczak, S., Sahu, S. K., Hatanaka, F., Ros, R. R., Maxwell, M. B., Chavez, J., Shao, Y., Liao, H. K., Martinez-Redondo, P., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2022). In vivo partial cellular reprogramming enhances liver plasticity and regeneration. *Cell Reports*, 39(4). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110730>

Huang, X., Yang, N., Fiore, V. F., Barker, T. H., Sun, Y., Morris, S. W., Ding, Q., Thannickal, V. J., & Zhou, Y. (2012). Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(3), 340–348. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-00500C>

Huber, N. L., & Peault, B. (2015). Human induced pluripotent stem cells: a new source for in vitro modeling of human development, disease, and therapy. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31, 563-592.

Iannaccone, F., & Solomon, J. A. (2015). Structure and function of the extracellular matrix in the development and maintenance of skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5276-5298.

Ishiguro, K., Kato, Y., Sato, Y., & Shimokawa, H. (2018). TGF- β 1-induced fibroblast-to-myofibroblast transition in the pathogenesis of cardiac fibrosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5, 7.

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428.

Kanitakis, J. (2001). John Libbey Eurotext - *European Journal of Dermatology - Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. <https://www.researchgate.net/publication/11279803>

Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T., & Iozzo, R. v. (2019). Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. In *Matrix Biology* (Vols. 75–76, pp. 1–11). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.08.007>

Khoo, T. S., Jamal, R., Abdul Ghani, N. A., Alauddin, H., Hussin, N. H., & Abdul Murad, N. A. (2020). Retention of Somatic Memory Associated with Cell Identity, Age and Metabolism in Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Reprogramming. In *Stem Cell Reviews and Reports* (Vol. 16, Issue 2, pp. 251–261). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09956-x>

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I. R., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K. C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T. J., Irizarry, R. A., Jung, N., ... Daley, G. Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467(7313), 285–290. <https://doi.org/10.1038/nature09342>

Kim, J., Kim, J., Lee, S. H., Koo, H., Kim, S., Lee, J. W., ... Lee, J. H. (2019). The role of AP-1 in myofibroblast activation. *Nature Communications*, 10, 5051.

Kim, W., Barron, D. A., Martin, R. S., Chan, K. S., Tran, L. L., Yang, F., Ressler, S. J., & Rowley, D. R. (2014). RUNX1 is essential for mesenchymal stem cell proliferation and myofibroblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(46), 13389–13394. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407097111>

Klimentidis, Y. C., & Begay, R. L. (2012). The evolutionary and physiological basis for variations in human subcutaneous fat distribution. *Obesity Reviews*, 13(1), 15–29.

Klimentidis, Y. C., & Begay, R. L. (2012). The evolutionary and physiological basis for variations in human subcutaneous fat distribution. *Obesity Reviews*, 13(1), 15–29.

Ko, J., & Kim, K. (2017). iPSC-derived neural cells for disease modeling and drug discovery. *Molecular Brain*, 10(1), 27.

Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., ... & Rubin, L. L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480(7378), 547–551.

Lendahl, U., Muhl, L., & Betsholtz, C. (2022). Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. In *Nature Communications* (Vol. 13, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30633-9>

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

Lim, K. M. (2021). Skin epidermis and barrier function. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 6, pp. 1–3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22063035>

Liu, F., Bayliss, G., & Zhuang, S. (2019). Application of nintedanib and other potential anti-fibrotic agents in fibrotic diseases. *Clinical science (London, England : 1979)*, 133(12), 1309–1320. <https://doi.org/10.1042/CS20190249>

Lapasset, L., Milhavel, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ät-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J. M., de Vos, J., Lehmann, S., & Lemaitre, J. M. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes and Development*, 25(21), 2248–2253. <https://doi.org/10.1101/gad.173922.111>

Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Moodie, M. L., Hall, K. D., Gortmaker, S. L., Swinburn, B. A., & Seidell, J. C. (2012). Overweight and obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obesity Reviews*, 13(1), 1-5.

Lun, A. T., Svensson, V., Ma, J., Kostov, V., Li, S., Teichmann, S. A., & Marioni, J. C. (2016). Single-cell transcriptomics reveals unique gene expression patterns in human myofibroblasts. *Nature Communications*, 7, 10418.

Lynch, M. D., & Watt, F. M. (2018). Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 128, Issue 1, pp. 26–35). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI93555>

Lynch, M. D., & Watt, F. M. (2018). Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 128, Issue 1, pp. 26–35). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI93555>

Ma, J., Lun, A. T., Kostov, V., Li, S., & Marioni, J. C. (2018). Single-cell RNA-sequencing reveals the transcriptional landscape of human myofibroblasts. *Nature Communications*, 9, 4708.

Marttala, J., Andrews, J. P., Rosenbloom, J., & Uitto, J. (2016). Keloids: Animal models and pathologic equivalents to study tissue fibrosis. In *Matrix Biology* (Vol. 51, pp. 47–54). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.01.014>

Meran, S., & Steadman, R. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *International Journal of Experimental Pathology*, 92, 158-167.

Meyer-ter-Vehn, T., Gebhardt, S., Sebald, W., Buttmann, M., Grehn, F., Schlunck, G., & Knaus, P. (2006). p38 inhibitors prevent TGF- β -induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(4), 1500–1509. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0361>

Micallef Ludovic, Nicolas Vedrenne, Fabrice Billet, Bernard Coulomb, Ian A Darby, Alexis Desmoulière. The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2012. (5)

Micallef, L., Vedrenne, N., Billet, F., Coulomb, B., Darby, I. A., & Desmoulière, A. (2012). The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 5(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-S1-S5>

Mienaltowski, M. J., & Birk, D. E. (2014). Structure, psychiatry, and biochemistry of collagens. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 802, 5-29.

- Monfort, A., Soriano-Navarro, M., García-Verdugo, J. M., & Izeta, A. (2013). Production of human tissue-engineered skin trilayer on a plasma-based hypodermis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(6), 479–490. <https://doi.org/10.1002/term.548>
- Muhl, L., Genové, G., Leptidis, S., Liu, J., He, L., Mocci, G., Sun, Y., Gustafsson, S., Buyandelger, B., Chivukula, I. v., Segerstolpe, Å., Raschperger, E., Hansson, E. M., Björkegren, J. L. M., Peng, X. R., Vanlandewijck, M., Lendahl, U., & Betsholtz, C. (2020). Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17740-1>
- Mustafi, S. B., Chakraborty, P. K., Dey, R. S., & Raha, S. (2009). Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt. *Cell Stress and Chaperones*, 14(6), 579–589. <https://doi.org/10.1007/s12192-009-0109-x>
- Nanba, D. (2019). Human keratinocyte stem cells: From cell biology to cell therapy. In *Journal of Dermatological Science* (Vol. 96, Issue 2, pp. 66–72). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.10.002>
- Nilforoushzadeh, M. A., Ahmadi Ashtiani, H. R., Jaffary, F., Jahangiri, F., Nikkhah, N., Mahmoudbeyk, <https://doi.org/10.5812/jssc.69080>
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K. I., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H., & Yamanaka, S. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*, 8(5), 409–412. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1591>
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., ... & Anversa, P. (2001). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10344–10349.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 3, pp. 221–233). <https://doi.org/10.1038/nrm2125>
- Pakshir, P., & Hinz, B. (2018). The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. In *Matrix Biology* (Vols. 68–69, pp. 81–93). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.019>
- Park, J. E., & Barbul, A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American Journal of Surgery*, 187(5 SUPPL. 1), S11–S16. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(03\)00296-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00296-4)
- Pascual-Calabuig, E., Martínez-Coria, H., Llorens-Martín, M., & Jessberger, S. (2017). Stem cell-based therapies for Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 23(11), 1386–1398.
- Prost-Squarcioni, C. (2006). Histology of skin and hair follicle. In *Medecine/Sciences* (Vol. 22, Issue 2, pp. 131–137). Editions EDK. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006222131>

Quan, T., & Fisher, G. J. (2015). Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: A mini-review. In *Gerontology* (Vol. 61, Issue 5, pp. 427–434). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000371708>

Rakita, A., Nikolić, N., Mildner, M., Matiassek, J., & Elbe-Bürger, A. (2020). Re-epithelialization and immune cell behaviour in an ex vivo human skin model. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56847-4>

Ramshaw, J. A., Shah, N. K., & Brodsky, B. (1998). Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *Journal of structural biology*, 122(1), 86-91.

Reilly, D. M., & Lozano, J. (2021). Skin collagen through the lifestages: importance for skin health and beauty. *Plastic and Aesthetic Research*, 2021. <https://doi.org/10.20517/2347-9264.2020.153>

Rita N. Gomes, Filipa Manuel, & Diana S. Nascimento. (2021). The bright side of fibroblasts: molecular signature and regenerative cues in major organs. *Npj Regenerative Medicine*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/pbidi.unam.mx:2443/10.1038/s41536-021-00153-z>

Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*, 99, 665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017.-Wound>

Roger, M., Fullard, N., Costello, L., Bradbury, S., Markiewicz, E., O'Reilly, S., Darling, N., Ritchie, P., Määttä, A., Karakesisoglou, I., Nelson, G., von Zglinicki, T., Dicolandrea, T., Isfort, R., Bascom, C., & Przyborski, S. (2019). Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of Anatomy*, 234(4), 438–455. <https://doi.org/10.1111/joa.12942>

Rognoni, E., & Walko, G. (2019). The Roles of YAP/TAZ and the Hippo Pathway in Healthy and Diseased Skin. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/cells8050411>

Scudellari, M. (2016). How iPS cells changed the world. *Nature*, 534, 310–312.

Serrano, A. L., Mann, C. J., Vidal, B., et al. (2011). Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. *Current Topics in Developmental Biology*, 96, 167–201.

Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 16, Issue 2, pp. 115–130). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>

Snyder, R. J., Lantis, J., Kirsner, R. S., Shah, V., Molyneaux, M., & Carter, M. J. (2016). Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use. *Wound Repair and Regeneration*, 24(4), 613–629. <https://doi.org/10.1111/wrr.12444>

Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009;136:964-977.

Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J., & Mirastschijski, U. (2017). Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. In *European Surgical Research* (Vol. 58, Issues 1–2, pp. 81–94). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000454919>

Sorrell, J.M., Baber, M.A., Caplan, A.I., 2007a. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell Tissue Res.* 327, 499–510.

Sorrell, J.M.; Caplan, A.I. Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2009, 276, 161–214.

Swarbrick, J. T., & Boylan, J. C. (2010). *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (Vol. 4). New York: Informa Healthcare.

Tai, Y., Woods, E. L., Dally, J., Kong, D., Steadman, R., Moseley, R., & Midgley, A. C. (2021). Myofibroblasts: Function, formation, and scope of molecular therapies for skin fibrosis. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom11081095>

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131:861-872.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126:663-676.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 183–193). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861–872.

Thannickal VJ, Zhou Y, Gaggar A, Duncan SR (2014) Fibrosis: ultimate and proximate causes. *J Clin Invest* 124:4673–4677. <https://doi.org/10.1172/JCI74368>

Theocharidis, G., Drymoussi, Z., Kao, A. P., Barber, A. H., Lee, D. A., Braun, K. M., & Connelly, J. T. (2016). Type VI collagen regulates dermal matrix assembly and fibroblast motility. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(1), 74–83. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.352>

Thompson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147.

Thulabandu, V., Chen, D., & Atit, R. P. (2018). Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 7(2), e307.
<https://doi.org/10.1002/wdev.307>

Tomasek James, Giulio Gabbiani, Boris Hinz, Christie Chaponnier and Robert A. Brown. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nat rev. Molecular Cell Biology* 2002 (3)

Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B. (2020). Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1–30). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>

Trounson, A., & DeWitt, N. D. (2016). Pluripotent stem cells progressing to the clinic. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 194–200). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2016.10>

Uberoi, A., Bartow-McKenney, C., Zheng, Q., Flowers, L., Campbell, A., Knight, S. A. B., Chan, N., Wei, M., Lovins, V., Bugayev, J., Horwinski, J., Bradley, C., Meyer, J., Crumrine, D., Sutter, C. H., Elias, P., Mauldin, E., Sutter, T. R., & Grice, E. A. (2021). Commensal microbiota regulates skin barrier function and repair via signaling through the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Host and Microbe*, 29(8), 1235-1248.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.011>

Van den Borne, S. W., Diez, J., Blankesteyn, W. M., et al. (2010). Myocardial remodeling after infarction: The role of myofibroblasts. *Nature Reviews Cardiology*, 7, 30-37.

Vargas, M. V., Heintz-Buschart, A., & Gage, F. H. (2018). Using iPSC-derived neurons to model neurological diseases. *Nature Neuroscience*, 21(4), 485-497.

Vierkötter, A., & Krutmann, J. (2012). Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 227–231. <https://doi.org/10.4161/derm.19858>

Von der Thüsen, J. H., Mersmann, S., & Ehmke, H. (2018). Myofibroblasts in fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 315(3), C309-C318.

Von der Thüsen, J. H., Mersmann, S., & Ehmke, H. (2018). Myofibroblasts in fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 315(3), C309-C318.

Vorstandlechner, V., Laggner, M., Kalinina, P., Haslik, W., Radtke, C., Shaw, L., Lichtenberger, B. M., Tschachler, E., Ankersmit, H. J., & Mildner, M. (2020). Deciphering the functional heterogeneity of skin fibroblasts using single-cell RNA sequencing. *FASEB Journal*, 34(3), 3677–3692.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902001RR>

Wang, S., Drummond, M. L., Guerrero-Juarez, C. F., Tarapore, E., MacLean, A. L., Stabell, A. R., Wu, S. C., Gutierrez, G., That, B. T., Benavente, C. A., Nie, Q., & Atwood, S. X. (2020). Single cell

transcriptomics of human epidermis identifies basal stem cell transition states. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18075-7>

Wang, Y., Hu, Y., Huang, X., & Liu, Y. (2017). The role of CTACK in myofibroblast migration and activation during wound healing. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(9), 1891-1900.

Wang, Y., Li, S., Zhao, J., Li, Q., Xu, C., Wu, H., Zhu, Z., & Tian, L. (2021). Snail-mediated partial epithelial mesenchymal transition augments the differentiation of local lung myofibroblast. *Chemosphere*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128870>

Werner, S., Keller, L., & Pantel, K. (2020). Epithelial keratins: Biology and implications as diagnostic markers for liquid biopsies. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 72). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.09.001>

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., ... & Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448(7151), 318-324.

Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, 25(2), 92–98. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>

WYNN, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Molecular and Cellular Themes in Inflammation and Immunology*, 214(2), 199–210.

Xu, C., Wang, X., & Pramanik, M. (2020). Imaging technologies and transdermal delivery in skin disorders (Vol. 1).

Xu, X., Yang, X., Yang, J., Sun, Y., Yang, X., Zhang, J., ... Li, J. (2020). Inhibition of TGF- β 1-induced myofibroblast activation reduces the risk of cardiovascular events in mice with hypertension. *Hypertension*, 76(2), 539-548.

Yamanaka, S. (2007). Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. In *Cell Stem Cell* (Vol. 1, Issue 1, pp. 39–49). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.012>

Yamanaka, S. (2020). Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. In *Cell Stem Cell* (Vol. 27, Issue 4, pp. 523–531). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>

Yoshida, Y., & Yamanaka, S. (2017). Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later. In *Circulation Research* (Vol. 120, Issue 12, pp. 1958–1968). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311080>

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318:1917-1920.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-1920.

Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., Thomson, J. A., & Smith, A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(12), 1129-1133.

Zhao, Y., & Chen, S. (2020). Generation of human-induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts using episomal vectors. *Molecular Medicine Reports*, 21(3), 1762-1768.

Zhu, Z., Ding, J., & Tredget, E. E. (2016). The molecular basis of hypertrophic scars. In *Burns and Trauma* (Vol. 4, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1186/s41038-015-0026-4>

Zhang, Y., & Wang, S. (2016). iPSC-derived models of neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(12), 741-754.

Zhao, L., Wang, J., Liu, Y., Wang, Y., & Hu, Y. (2019). The role of IGF-I signaling in myofibroblast proliferation and differentiation. *Cell Signal*, 51, 38-46.

Zhao, X., Kwan, J. Y. Y., Yip, K., Liu, P. P., & Liu, F.-F. (2020). Targeting metabolic dysregulation for fibrosis therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 19(1), 57-75. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/s41573-019-0040-5>

Zhao, X., Zhang, X., & Liu, D. (2021). Collagen peptides and the related synthetic peptides: A review on improving skin health. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 86). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104680>

Zhao, Y., Lu, S., Gao, S., & Li, W. (2014). Stem cells and tissue engineering in cardiovascular disease. *BioMed Research International*, 2014, 1-9.

Zhu, Z., Ng, D. W. H., Park, H. S., & McAlpine, M. C. (2021). 3D-printed multifunctional materials enabled by artificial-intelligence-assisted fabrication technologies. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 6, Issue 1, pp. 27-47). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-00235-2>

Zouboulis, C. C., & Makrantonaki, E. (Eds.). (2013). *Encyclopedia of skin and skin disorders* (2nd ed.). Berlin: Springer.

Anexo 1: Información general experimental

Tabla 1. Información de los genes analizados para el ensayo RT-PCR

Gen	Oligo Secuencia 5'-3'	Oligo Secuencia 3'-5'	TM	Longitud del amplicon
TGF β -1	TGCAAGTGGACATCAACGGG	GCACGATCATGTTGGACAGC	59°C	2421
Colágena tipo I	TGACGAGACCAAGAAGCTGCC	GCACCATCATTCCACGAGC	59°C	3639pb
α -SMA	ACTGCCTTGGTGTGTGACAA	TCCAGTTGGTGATGATGCC	59°C	934pb

Created with SnapGene®

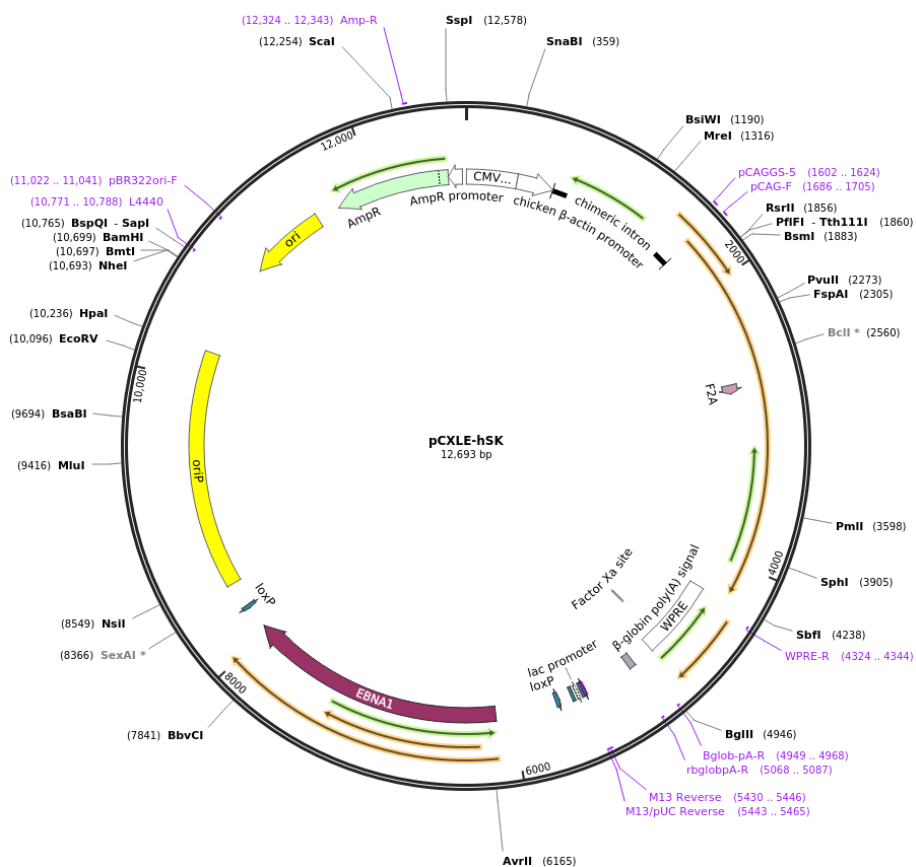


Diagrama del plásmido pCXLE-hSK

Created with SnapGene®

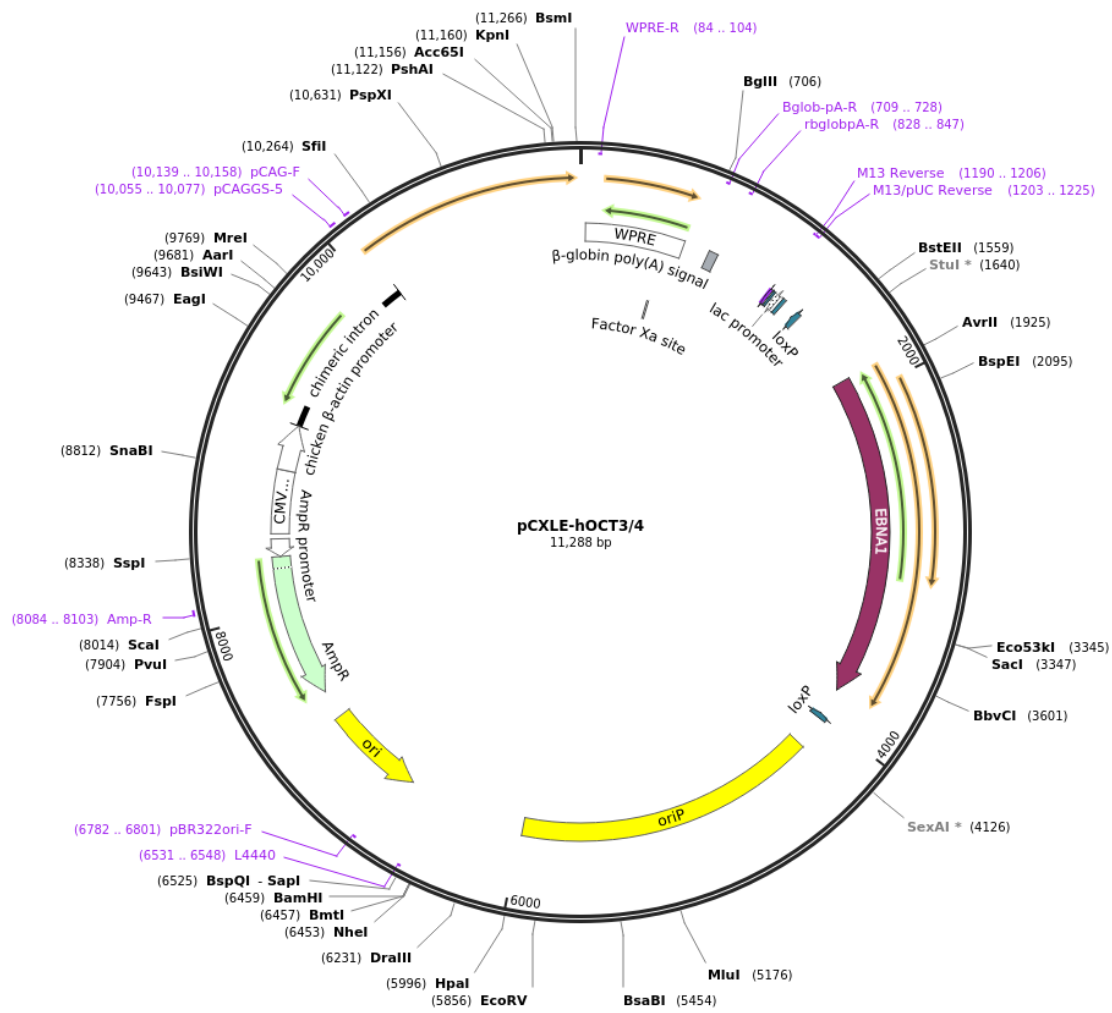


Diagrama del plásmido pCXLE-hOCT3/4

Created with SnapGene®

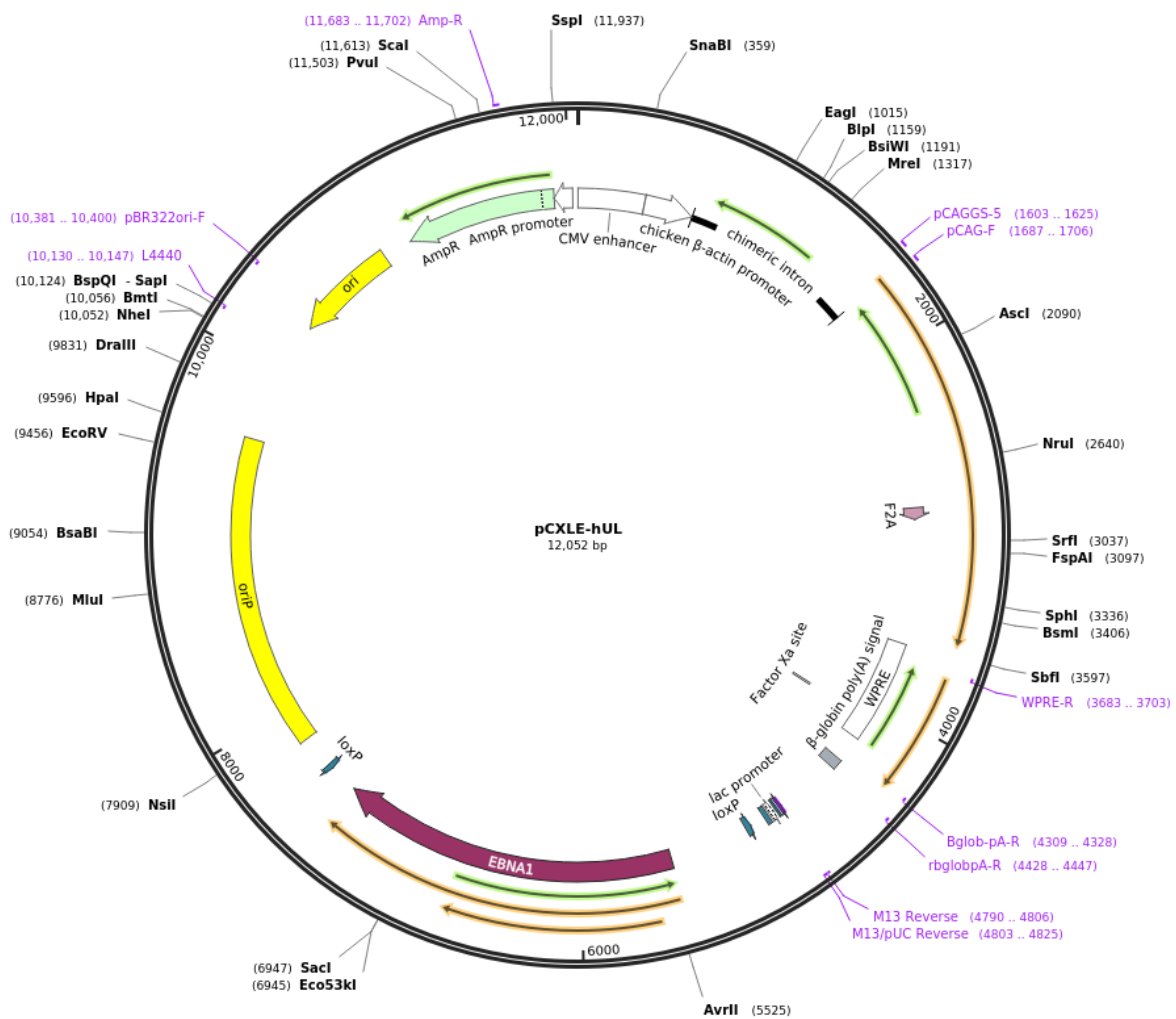


Diagrama del plásmido pCXLE-hUL

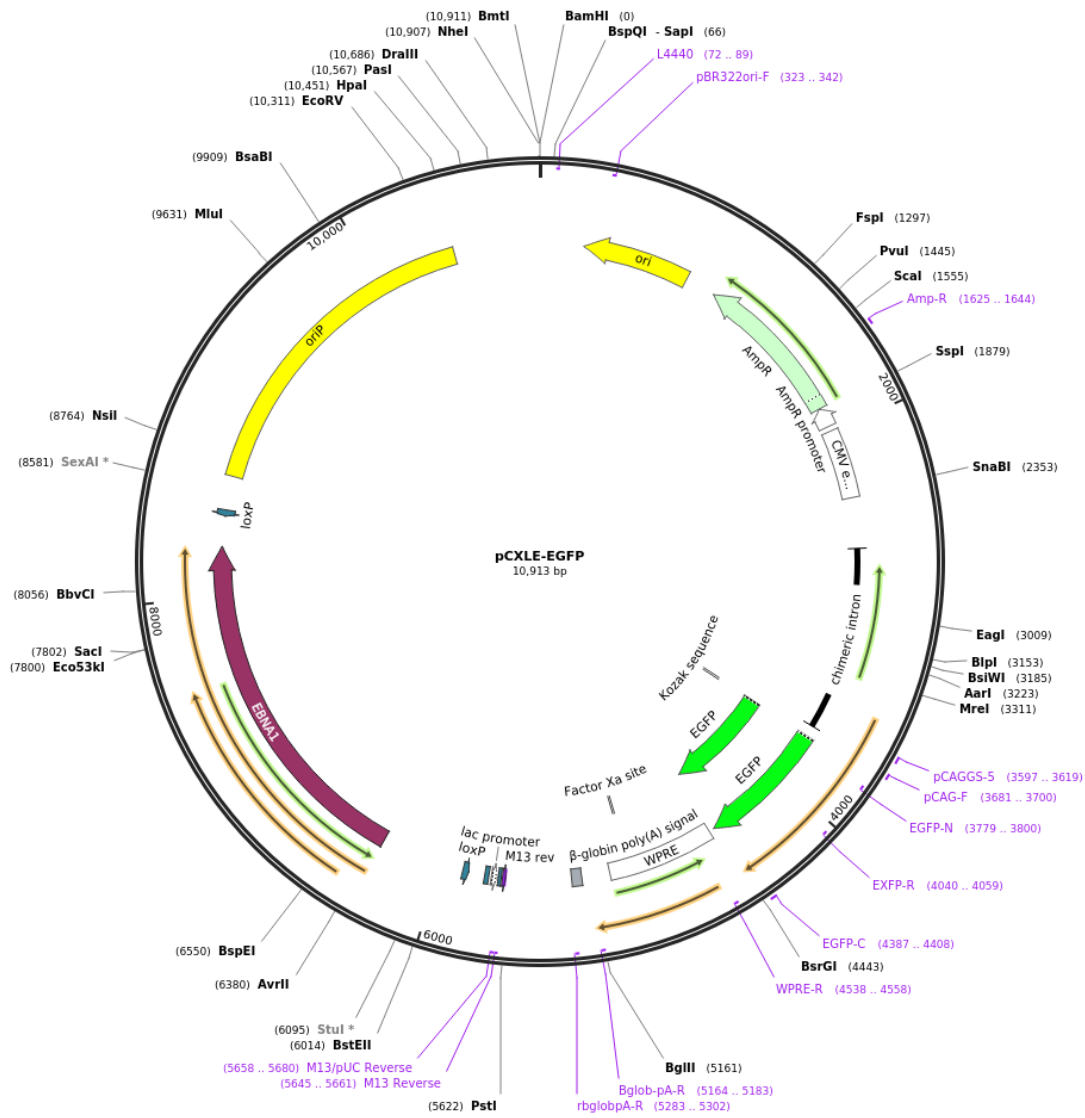


Diagrama del plásmido pCXLE-EGFP

Anexo 2: Consentimiento informado









Instituto Nacional
de Rehabilitación

"2014. Año de Octavio Paz"

Carta de consentimiento informado:


Debido a que usted tiene una cicatriz hipertrófica, ha sido invitado para participar en un protocolo de investigación médica titulado **"PARTICIPACIÓN DE LA PROTEINA CINASA C EN LA PROLIFERACIÓN DE MIOFIBROBLASTOS HUMANOS DIFERENCIADOS DE CELULAS PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS (iPS), REPROGRAMADAS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON CICATRIZ HIPERTROFICA"** a realizarse en el Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados, Instituto Nacional de Rehabilitación, que tiene como objetivo Estudiar el papel de la PKC en la proliferación de miofibroblastos humanos, diferenciados a partir de células pluripotenciales inducidas (iPS), reprogramadas de fibroblastos de pacientes con cicatriz hipertrófica. Su participación es voluntaria y en caso de no aceptar no compromete su atención médica. Su participación en este proyecto le otorgará el siguiente beneficio: evaluación molecular de la cicatriz hipertrófica y como podría llegar a mejorar o eliminar la hipertrofia en la cicatrización, de esta manera se podrán emitir sugerencias específicas sobre sus labores en la vida diaria. El paciente recibirá información actualizada obtenida durante la investigación. Por eso, en este documento le explicamos en qué consiste la toma de la biopsia de piel; léalo atentamente y consulte con su médico todas las dudas que usted tuviera.

Asimismo, usted recibirá información sobre los resultados obtenidos durante su tratamiento. Cabe señalar que por su participación no será revelada su identidad y que será resguardada cualquier información relacionada con usted.

En su primera visita será valorado clínicamente, posteriormente se realizará la limpieza de la lesión y se fotografiará la herida para tener el registro inicial. La lesión se dividirá en dos secciones equivalentes que serán tratadas de dos formas distintas. Además, antes del tratamiento de cada sección se obtendrá una biopsia de 4 mm de diámetro y de espesor total (sólo de la región de la cicatriz). En este procedimiento se le aplicará anestésico local e inyectable para que no tenga dolor.

Complicaciones


En todo procedimiento médico siempre puede haber complicaciones. El mayor riesgo asociado a su participación en este estudio son las molestias que puede sentir en el lugar de



Hospital Certificado:
Consejo de Salubridad General
2012-2015



División de Rehabilitación Ortopédica
Centro Colaborador de la OPS/OMS para
la Investigación y Rehabilitación Médica
2011-2015



Certificado ECMX-0540/09
ISO 9001:2008
2012-2015

Calz. México Xochimilco No. 289, Col. Arenal de Guadalupe, C.P. 14389, Delegación Tlalpan, México, D.F.
Tel.: (55) 5999 1000 www.inr.gob.mx

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional
de Rehabilitación

"2014. Año de Octavio Paz"

la toma de biopsia, sin embargo, no existen riesgos considerables en su integridad. En el caso de que algún daño o complicación llegaran a presentarse usted recibirá el tratamiento médico correspondiente e indemnización por parte de la institución de acuerdo a la ley general de salud, siempre y cuando el daño causado reportado haya sido directamente por este estudio. Las probables complicaciones que se pueden presentar por su participación en este protocolo es la infección en la herida, por causas ajenas a los tratamientos. De observarse alguna complicación ésta será tratada inmediatamente por su mismo médico e institución o puede llamar al teléfono 59 99 10 00 ext. 14303 (Dr. Francisco Ferreira Aparicio) o 14706 (Dr. Alejandro Cabrera Wrooman, responsable del proyecto)

Notas Importantes

Este estudio no involucra un apoyo económico para el paciente. El paciente tiene la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en la investigación, sin que por ellos se creen prejuicios para continuar su cuidado y tratamiento en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Si usted tiene una pregunta o requiere aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación tiene la garantía de que el médico responsable de su cuidado podrá solucionar su petición. Si se considera que la herida pudiera presentar infección o se aprecia profundización, se realizará el lavado del área y el paciente recibirá el tratamiento de rutina. La disponibilidad del tratamiento médico queda restringida al presupuesto del área médica del Instituto Nacional de Rehabilitación y en el caso que amerite indemnización legalmente será cubierto por el INR.

Si por alguna causa se requiere de materiales u otro gasto adicional, éste será absorbido por el presupuesto de la investigación. El presente documento de consentimiento informado se extiende por duplicado y un ejemplar se entregará al paciente que participará en la investigación.

Declaración de consentimiento

Paciente

Yo Sr./Sra. Valdivia Tovar Ximena Camila he leído la hoja de Consentimiento informado que me ha entregado el/la Dr./Dra. Francisco Ferreira y he comprendido las explicaciones que se me han ofrecido. El médico que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas y preguntas que le he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar



Hospital Certificado:
Consejo de Salubridad General
2012-2015



División de Rehabilitación Ortopédica
Centro Colaborador de la OPS/OMS para
la Investigación y Rehabilitación Médica
2011-2015



Certificado ECMX-0540/09
ISO 9001:2008
2012-2015

Calz. México Xochimilco No. 289, Col. Arcañal de Guadalupe, C.P. 14389, Delegación Tlalpan, México, D.F.

Tel.: (55) 5999 1000 www.inr.gob.mx

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



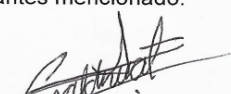
Instituto Nacional
de Rehabilitación

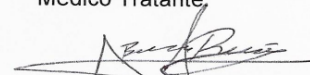
"2014. Año de Octavio Paz"


ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto y no crearé perjuicios para continuar con mi cuidado y tratamiento.

Por ello, manifiesto que me considero satisfecho(a) con la información recibida y que comprendo la indicación y los riesgos de este tratamiento/procedimiento. Y en tales condiciones CONSIENTO que se me realice el tratamiento antes mencionado.


D. Francisco Ferreira
Médico Tratante,


El/ La Paciente


René Fernando Abarca Buis
Testigo (nombre, dirección y firma)


Edna Ayerim Mandujano Tinoco
Testigo (nombre, dirección y firma)



Hospital Certificado:
Consejo de Salubridad General
2012-2015



División de Rehabilitación Ortopédica
Centro Colaborador de la OPS/OMS para
la Investigación y Rehabilitación Médica
2011-2015



Certificado ECMX-0540/09
ISO 9001:2008
2012-2015

Calz. México Xochimilco No. 289, Col. Arenal de Guadalupe, C.P. 14389, Delegación Tlalpan, México, D.F.
Tel.: (55) 5999 1000 www.inr.gob.mx