



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE COCULTIVO DE FIBROBLASTOS Y CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES SOBRE
UN ANDAMIO BIOCOMPATIBLE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. HERNÁNDEZ GONZÁLEZ KARLA ESTEFANÍA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LGII**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

CD. MX., OCTUBRE, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE COCULTIVO DE FIBROBLASTOS Y CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES SOBRE
UN ANDAMIO BIOCOMPATIBLE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. HERNÁNDEZ GONZÁLEZ KARLA ESTEFANÍA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LGII

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., OCTUBRE, 2019

OFICIO CPCB/957/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 27 de mayo de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **HERNÁNDEZ GONZÁLEZ KARLA ESTEFANIA** con número de cuenta **307148854**, con la tesis titulada "**ANÁLISIS DE COCULTIVO DE FIBROBLASTOS Y CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES SOBRE UN ANDAMIO BIOCÓMPATIBLE**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ**:

Presidente: DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO
Vocal: DR. RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURÁN
Secretario: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
Suplente: DRA. MAGALI ESPINOSA CASTILLA
Suplente: DRA. MARTA ELENA CASTRO MANRREZA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 09 de septiembre de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX

Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

Quiero agradecer inmensamente a la Universidad Nacional Autónoma de México, porque más que una escuela, me ha brindado un hogar desde el bachillerato. Me siento totalmente orgullosa de pertenecer y de haber experimentado el ambiente universitario y aprovechado las ventajas que trae consigo. Agradezco especialmente al Posgrado en Ciencias Biológicas por el apoyo brindado a lo largo de este curso. Al proyecto CB-2016-01-287405 financiado por investigación ciencia básica SEP-CONACyT bajo la dirección de la Dra. María Cristina Velasquillo y el apoyo del Dr. Roberto Sánchez S.

Quisiera también mencionar al programa de becas CONACYT por el apoyo brindado (CVU: 782390) pues es un factor muy importante que me permitió estudiar el posgrado.

A mi tutora la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez por brindarme su tiempo y espacio para que esto pudiera suceder, pero sobre todo por su comprensión y apoyo. A mi comité tutor el Dr. Luis Felipe Jiménez García a quien tuve la fortuna de tener también como profesor y me dejó con un muy grato ejemplo de cómo se debe dar una clase, me volví a enamorar de la biología celular, muchas gracias.

Agradecimientos personales

Quisiera comenzar agradeciendo al Dr. Hernán Cortés Callejas y al Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre, por haberme asesorado y compartido conocimientos a lo largo de mi trabajo experimental.

Quiero agradecer profundamente el apoyo de las siguientes personas, por las cuales siento una gran admiración. Son mi fuente de inspiración pues tienen un equilibrio asombroso al ser sumamente profesionales pero también tener una excelente calidad humana:

Biól. Ana Brena

Biól. Violeta Santiago

Lic. Eréndira Mejía Valdespino

Dra. Magaly Espinosa Castilla

Dra. Gisela Ceballos Cancino

Dr. Rafael S. Saavedra Durán

M.C. Catalina Machuca

Lic. Fernanda del Alba

Lic. Alejandro Vega

Dedicatorias

To my husband,

Cj Walter-Hague por su gran amor incondicional que es el que me ha mantenido fuerte y positiva a lo largo de esta batalla.

I'm deeply thankful for all the support and patience, but overall, I want to recognize that I wouldn't have gotten this far if it wasn't for you, your love, and your perseverance. I appreciate all the effort you put into this so that I can reach my personal goals.

I want to dedicate this book to you especially, because its more than just a thesis to get my degree, it represents our relationship and how far we have come. I want to let you know that as much as I fought for this, I will fight for you and for us the same and more. You are the love of my life.

A mis padres, mi hermano y mis sobrinos, Son los pilares de mi vida.

A todas las mujeres que por motivos de género se han sentido en desventaja, amenazadas o han sido violentadas, pero que siguen respirando. Aunque también, quiero recordar a las tantas que por las mismas razones, dejaron de existir.

Del por qué una mala experiencia puede resultar en el motivo de tu futuro éxito

[...] No es la filosofía ni los libros donde se aclara nuestra naturaleza, sino en el fracaso o en el triunfo que el futuro nos tiene reservado, porque tanto lo uno como lo otro es consecuencia de las trampas, de las traiciones, de las puñaladas; de lo urdido por los demás en nuestra contra y de la astucia con la que conseguimos capitalizar ese odio: de la manera como sacamos ventaja o desventaja de las insidias ajenas y de las propias [...]

Del por qué deberías controlar el odio

[...] la envidia arrecia, madura la maldad, y entre permitirmos el éxito o dañarse ellos mismos, prefieren hasta inmolarse con tal de cerrarnos el paso: los demás son, frente a nuestros proyectos, kamikazes del odio, y peor reaccionan ante nuestro fracaso, pues, entonces, su mal disimulada de alegría nos lastima más que su envidia: nos hiere más su compasión fingida que sus burlas. **Cómo se esmeran para hacernos sentir que no pudimos, que nos falló el tesón y nos fallo el talento, porque deliberadamente malocultan la navaja con la que cortaron nuestros hilos de alpinistas, y si nos dan palmadas en la espalda, es para terminar de hundir los tronchados muñones de nuestras alas [...]**

[...] el odio también está en nosotros: no es tan sólo lo esencial del alma ajena: está en nuestra propia naturaleza que conspira, que mes a mes nos apaga el entusiasmo, que año tras año nos despoja de la fuerza y que, cuando triunfamos, en esas escasas y mediocres ocasiones, hace que los primeros indignos de lo conquistado seamos nosotros, pues lo logrado, sea lo que fuere, siempre se alcanza muy a pesar nuestro: sin que terminemos de entender cómo se tejieron las causas y cómo se pudieron superar nuestros errores. Nadie jamás está a la altura de su triunfo, por vano o por grande que sea. **Nunca lo alcanzado corresponde con los sueños.** Somos nosotros quienes envenenamos el éxito, quienes lo desinflamamos para que emerja la costumbre, la decepción fatigante que somos capaces de encontrar en lo que poseemos. No es extraño que nadie consiga alargar la felicidad o el placer más allá de unos minutos y, en cambio, la infelicidad y el dolor puedan prolongarse meses y hasta años [...]

Del por qué deberías perder el miedo al dolor

[...] Y también conviene distinguir entre dolores físicos y dolores morales, y no por que unos se prendan de las terminales nerviosas y nos arrojen beatamente a los médicos o los brujos, los analgésicos, a los somníferos, al opio, a la morfina; y los otros, mas bien, muerdan el alma y nos esclavicen al diván del psicoanálisis o al confesionario, sino por que según sea la jerarquía que establezcamos entre ellos, pertenecemos a un tipo peculiar de personas. **Así, quienes temen por encima de todo al dolor físico están**

destinados a ser esclavos de los poderosos, y quienes temen más a los dolores morales están destinados a ser esclavos de sí mismos. Frente al dolor, unos son títeres del miedo y otros, marionetas de la culpa [...]

FILOSOFÍA PARA INCONFOMES, ÓSCAR DE LA BORBOLLA

Y así considero que la vida es un caos, el éxito es completamente arbitrario pero la confianza lo es todo

*Dime vencedor Rapaz, vencido de mi
constancia, ¿Qué ha sacado tu arrogancia de
alterar mi firme paz? Que aunque de vencer
capaz es la punta de tu arpón, ¿qué importa el
tiro violento, si a pesar del vencimiento queda
viva la razón?*

*Tienes grande señorío; pero tu jurisdicción
domina la inclinación, mas no pasa el albedrío.
Y así librarne confío de tu loco atrevimiento,
pues aunque rendida siento y presa la libertad,
se rinde la voluntad pero no el consentimiento.*

*En dos partes dividida tengo el alma en
confusión: una, esclava a la pasión, y otra, a la
razón medida. Guerra civil, encendida, aflige el
pecho importuna: quiere vencer cada una,*

*y entre fortunas tan varias, morirán ambas
contrarias pero vencerá ninguna.*

*Cuando fuera, Amor, te vía, no merecí de ti
palma; y hoy, que estás dentro del alma, es
resistir valentía. Córrase, pues, tu porfía,
de los triunfos que te gano: pues cuando
ocupas, tirano, el alma, sin resistillo, tienes
vencido el Castillo e invencible el Castellano.*

*Invicta razón alienta armas contra tu vil saña,
y el pecho es corta campaña a batalla tan
sangrienta.*

*Y así, Amor, en vano intenta tu esfuerzo loco
ofenderme: pues podré decir, al verme expirar
sin entregarme, que conseguiste matarme mas
no pudiste vencerme.*

*Dime vencedor rapaz,
Sor Juana Inés de Azbaje*

Índice de contenido

Índice de figuras

Índice de tablas

Índice de abreviaturas

Resumen.....	1
Abstract.....	3
1.INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PIEL.....	5
1.1.2 LA EPIDERMIS	7
1.1.3 UNIÓN DERMOEPIDÉRMICA.....	9
1.1.4 LA DERMIS	10
1.2 FIBROBLASTOS Y SU IMPORTANCIA COMO PARTE DE LA PIEL.....	11
1.2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS FIBROBLASTOS	11
1.2.3 FIBROBLASTOS EN LA PIEL.....	13
1.2.4 CLASIFICACIÓN DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS.....	13
1.3 MATRIZ EXTRACELULAR.....	15
1.3.2 COLÁGENAS.....	16
1.3.3 Colágenas en la piel	18
1.3.4 Proteoglicanos	19
1.3.5 Glicoproteínas.....	19
1.4 HERIDAS CUTÁNEAS	20
1.4.2 MECANISMO DE REPARACIÓN DE LA PIEL.....	21
1.4.4 MECANISMOS MOLECULARES DE LA REPARACIÓN DE HERIDAS.....	28
1.4.5 FACTORES DE CRECIMIENTO ASOCIADOS A LA REPARACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS.....	31
1.5 CÉLULAS TRONCALES.....	34
1.5.2 Definición y origen.....	34
1.5.3 Células Troncales mesenquimales.....	36
1.6 CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO	36
1.6.2 Origen y localización.....	36
1.6.3 Características moleculares	39
1.6.4 Potencial terapéutico para la reparación de heridas en la piel	39
1.7 INGENIERÍA DE TEJIDOS Y MEDICINA REGENERATIVA	41
1.7.2 SUSTITUTOS DE PIEL DESARROLLADOS POR TE.....	42
1.7.3 BIOMATERIALES UTILIZADOS EN LOS SUSTITUTOS CUTÁNEOS.....	43

1.7.4 COLÁGENA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	44
1.7.5 EMPLEO DE MODELOS ANIMALES EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	45
1.8 PIEL PORCINA RADIO-ESTERILIZADA.....	46
2.OBJETIVO GENERAL.....	46
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES	46
3.ANTECEDENTES	47
4.HIPÓTESIS	49
5.METODOLOGÍA	50
5.1 Obtención de muestras	50
5.1.2 Aislamiento de fibroblastos	50
5.1.3 Separación de las capas epidérmicas	51
5.1.4 Procesamiento del tejido dérmico.....	51
5.1.5 Siembra de cultivos primarios de fibroblastos dérmicos	52
5.1.6 Inmunofluorescencia de fibroblastos dérmicos.....	53
- Tripsinización de células	53
- Siembra del ensayo	53
- Protocolo de inmunofluorescencia.....	53
- Análisis de la inmunofluorescencia.....	54
5.2 Aislamiento de ADMSC	54
5.2.2 Siembra de cultivos primarios de ADMSC	55
5.3 Generación de cocultivo sobre PPR.....	56
5.3.2 Marcaje de células	56
5.3.3 Obtención y preparación del andamio biocompatible.....	57
5.3.4 Siembra de células sobre el andamio	57
5.4 Detección de factores de crecimiento.....	59
5.4.2 Extracción de sobrenadantes.....	59
5.4.3 Detección de VEGF, FGFb y EGF	59
5.5 Determinación de la síntesis de proteínas de matriz extracelular	60
5.5.2 Extracción de RNA.....	60
5.5.3 Obtención del cDNA (Retrotranscripción)	62
5.5.4 PCR tiempo real para la detección de COL1A1 y COL3A1.....	62
6.RESULTADOS.....	63
7.DISCUSIÓN.....	70
8.CONCLUSIONES	74
9.LITERATURA CITADA.....	75
10.ANEXOS (resultados complementarios)	93

Índice de figuras

Figura 1. Micro-anatomía de la piel

Figura 2. Fotomicrografía de un corte histológico de la planta de un pie teñida con H&E

Figura 3. Morfología de fibroblastos

Figura 4. Fibroblastos dérmicos y la expresión de colágenas en cultivo

Figura 5. La superfamilia de las colágenas

Figura 6. Síntesis de colágena y formación de fibrillas de la matriz

Figura 7. Reparación de la piel

Figura 8. Procesamiento de una muestra de lipoaspirados para obtener ADMSC

Figura 9. Mecanismos de acción de las ADMSC en la reparación de la piel

Figura 10. ADMSC sembradas sobre amnios humano (RHA) y piel porcina radio-esterilizada (RPS)

Figura 11. Protocolo para obtener fibroblastos a partir de biopsias de piel

Figura 12. Inmunofluorescencia de 1B10 en fibroblastos

Figura 13. Protocolo para el aislamiento de ADMSC

Figura 14. Generación del cocultivo de HF y ADMSC sobre un andamio de PPR

Figura 15. Cultivo primario de fibroblastos humanos aislados a partir de piel de abdomen

Figura 16. Inmunofluorescencia con anti- α -1B10 en un cultivo de fibroblastos de piel de abdomen

Figura 17. Cultivo primario de células mesenquimales aisladas a partir de tejido adiposo de abdomen (ADMSC)

Figura 18. Cocultivo de HF y ADMSC sobre un andamio biocompatible

Figura 19. Determinación de factores de crecimiento presentes en el sobrenadante del cultivo de HF y ADMSC sobre PPR.

Figura 20. Extracción de RNA total de los cultivos celulares y obtención de cDNA

Figura 21. Análisis cuantitativo a partir de PCR tiempo real para los genes COL1A1 y COL3A1 en el cocultivo de HF y ADMSC sobre PPR.

Figura 22. Efectos de bFGF, VEGF y EGF sobre procesos asociados a la reparación de la piel

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los sustitutos biológicos

Tabla 2. Comparación de las propiedades de modelos in vivo para el estudio de la reparación de la piel

Tabla 3. Características de los anticuerpos para la detección de: bFGF, EGF y VEGF

Tabla 4. Características de las sondas para PCR tiempo real

Índice de abreviaturas

INR		Instituto Nacional de Rehabilitación
CENIAQ		Centro de
ININ		Instituto nacional de investigaciones nucleares
BTR		Banco de tejido radio-esterilizados
ECM	Extracelular matrix	Matriz extracelular
HF	Human Fibroblast	Fibroblastos humanos
FSP1	Fibroblast superficial protein	Proteína de superficie de fibroblastos
1B10		Anticuerpo monoclonal anti-FSP1 humano derivado de la clona:1B10
mRNA	Messenger Ribonucleic acid	Ácido ribonucléico mensajero
COL1A1		Gen: Codifica la cadena 1 A de colágena I
COL13A1		Gen: Codifica la cadena 1 A de colágena III
PDGF	Platelet derived growth factor	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TGF-β	Tumoral growth factor-β subunit	Factor de crecimiento tumoral factor β
bFGF	Basic fibroblast growth factor	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Factor de crecimiento vascular endotelial
EGF	Epidermal growth factor	Factor de crecimiento epidermal
GF	Growth factor	Factor de crecimiento
MSC	Mesenchymal stem cell	Células troncales mesenquimales
BMSC	Bone marrow stem cell	Células troncales mesenquimales de médula ósea
ADMSC	Adipose mesenchymal stem cell	Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo
SVF	Stromal Vascular Fraction	Fracción estromal vascular
TE	Tissue engineering	Ingeniería de tejidos
cDNA	Complementary desoxirribonucleic acid	Ácido desoxirribonucléico complementario
PPR		Piel porcina radio-esterilizada
ESC	Embryonic stem cells	Células troncales embrionarias
SSC	Somatic stem cells	Células troncales somáticas o adultas
RM	Regenerative medicine	Medicina regenerativa

RESUMEN

La reparación de la piel es un proceso muy complejo coordinado por una serie de señalizaciones moleculares estimuladas por la liberación de citocinas y factores de crecimiento por parte de células del tejido epidérmico, como los fibroblastos, que cumplen la función de re-estructurar la matriz extracelular mediante la degradación y depósito de proteínas que permitan procesos como la migración celular, proliferación y con ello la reconstrucción del tejido.

La interrupción del proceso de reparación genera heridas crónicas difíciles de sanar por sí solas. Frecuentemente las heridas que no sanan se estacionan en la transición entre las fases de inflamación y proliferación provocando que la re-epitelización de la herida quede incompleta. La cicatrización es el producto final del proceso de reparación común de los mamíferos y se caracteriza por la formación de un tejido fibrótico rico en colágena, que muchas veces resulta disfuncional y anti-estético. En ambos casos, la generación de heridas crónicas y cicatrices hipertróficas puede generar diferentes tipos de impacto a la salud.

El objetivo de la ingeniería de tejidos es la búsqueda de materiales con diferentes características químicas, físicas y biológicas, que tengan la capacidad para soportar el crecimiento celular y al mismo tiempo favorezcan procesos de reparación y regeneración.

Las células troncales derivadas de tejidos adultos son un recurso de gran potencial dentro del área de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos, gracias a sus propiedades para auto-renovarse y diferenciarse a distintos linajes celulares que permiten la regeneración y el re-establecimiento de la funcionalidad de órganos y tejidos dañados.

La multipotencialidad de las células troncales mesenquimales (MSC) y su capacidad para acelerar el proceso de reparación de diferentes tejidos a través de la secreción de factores de crecimiento y su transformación directa a ciertos tipos celulares se ha demostrado en numerosas investigaciones. En la última década el tejido adiposo se convirtió en un recurso biológico muy conveniente pues hasta hace pocos años se consideraba como un “tejido de desecho” proveniente de cirugías estéticas. Recientemente se dio a conocer su potencial terapéutico gracias a la abundancia relativa de MSC que contiene en comparación con la médula ósea, que representaba la principal fuente de ADMSC (por sus siglas en inglés células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo).

La piel porcina es un recurso que ha sido utilizado frecuentemente en el tratamiento de heridas y quemaduras en la piel, pues otorga una barrera temporal que protege, hidrata y previene infecciones. Recientemente el grupo de investigación del Dr. Sánchez-Sánchez, utilizó piel porcina radio-esterilizada como andamio dentro del área de ingeniería de tejidos y determinaron que es capaz de mantener la proliferación y viabilidad de células ADMSC. Este hecho se puede atribuir a la similitud que tiene con la piel humana en cuanto a la composición de la matriz extracelular compuesta principalmente por colágena I, sin embargo no hay estudios que lo soporten.

El objetivo de este trabajo fue generar un cocultivo de ADMSC y fibroblastos empleando piel porcina radio-esterilizada como andamio para evaluar el efecto de su interacción sobre la liberación de factores de crecimiento y la expresión de proteínas de matriz extracelular. Los resultados sugirieron que la PPR tiende a regular la producción del RNAm de Col I, Col III modificando su proporción, además estimula la liberación de VEGF, EGF y FGFb. Sin embargo es necesario realizar un mayor número de los experimentos para confirmar los resultados aquí presentados.

ABSTRACT

Skin wound healing is a dynamic and complex process which evolves at different phases and is highly regulated by molecular and cellular pathways. Epidermal cell populations like fibroblasts, for example, interact with cytokines and growth factors delivered to the injured area letting the activation of signaling cascades to remodel the extracellular matrix (ECM). Fibroblast is capable of degrading and producing distinct proteins in order to provide an environment which allows migration, proliferation and angiogenesis.

When the normal wound healing progression through the different phases is disturbed, the wound may become chronic. Frequently non-healing wounds remain in a transition state between inflammation and proliferation phases while remodeling phases become impaired. Scarring is the final point of typical mammals healing and represents a fibrinogenous tissue rich in collagen. Even though scarring can result in useless and anti-aesthetic tissue. In both cases, chronic wounds and scarring tissues can generate significant health issues.

Engineering tissue combines alternative materials with a particular chemical, physical and biological characteristics to create scaffolds that support cell growth which promotes repair and regeneration processes. An ideal scaffold should possess excellent biocompatibility, biodegradability, and suitable mechanical properties.

Somatic stem cells represent an excellent resource for regenerative medicine and engineering tissue development. This is due to their remarkable capacity for self-renewal, as well as their ability to differentiate along multiple cell lineages maintaining the capacity of adult tissues to be replenished as a part of the normal process of homeostasis and repair in response to injury.

The multipotency of mesenchymal stem cells have shown effectiveness in enhancing the regeneration and repair of different tissues types by upregulating multiple growth factors and directly differentiating into particular cell types contributing to healing. Adipose-derived stem cells (ADSC) are a particularly attractive type of adult stem cell because this tissue is routinely discarded from liposuction procedures which are also relatively non-invasive and low risk. Furthermore, ADSC are easily harvested from the stromal vascular fraction obtaining higher yields compared to bone marrow.

Pork skin has been used as a protective barrier while keeping hydration which helps prevent infections. Recently Sánchez S. and his team proposed using pork skin that has been radio-sterilized like a scaffold to support ADMSC due to its capacity to maintain their viability and to promote proliferation. Leading to the hypothesis that the high similarity between pork and human ECM composition (mainly by collagen type I) plays an important role, although there is not an official scientific report on it.

The objective of this project was to generate an ADMSC and fibroblast co-culture, using a scaffold of radio-sterilized pork skin to evaluate the release of growth factor and the ECM-related protein expression. The results suggested PPR is regulating collagen I and III mRNA expression, modifying the proportion between them (against the control group) while stimulating VEGF, EGF and bFGF secretion.

In conclusion, it is necessary to run additional experiments to support the results presented in this project fully.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PIEL

La piel es un órgano complejo dinámico compuesto por diferentes tipos de células y estructuras especializadas. Es el órgano más extenso, en el ser humano adulto tiene en promedio un área de 2 m², su peso varía entre 3 y 4 kg; y su grosor promedio es de 4 mm. Recubre toda la superficie y es continua con la membrana mucosa de los sistemas respiratorio, digestivo y urogenital^{1,2}.

La piel está constituida por dos capas superpuestas que de la superficie a la profundidad son: la epidermis que deriva del ectodermo, la dermis de origen mesodérmico y entre la dermis profunda y la fascia (tejido conjuntivo), se encuentra el tejido subcutáneo o hipodermis que dependiendo del autor se considera o no parte de la piel^{1,3,4}. La piel posee anexos cutáneos especializados que comprenden: los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y sudoríparas (ecrinas y apocrinas) que en conjunto constituyen el sistema tegumentario⁵.

La epidermis es la capa más delgada de la piel, dependiendo del sitio anatómico mide entre 0.1 mm en los párpados y hasta 1 mm en las palmas de las manos y plantas de los pies mientras que la dermis mide entre 2 y 8mm (en los párpados es muy delgada y en la espalda es muy gruesa) **[Fig.1]**^{1,4-6}.

La piel cumple varias funciones relacionadas con su constitución de interfase entre el medio interno y el externo:

- Actúa como barrera protectora contra agentes físicos, químicos y biológicos del medio externo. Esta barrera es semi-permeable para sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas lo que permite que el cuerpo humano sea un sistema abierto que interactúa y reacciona con el medio externo.
- Provee de una eficaz protección contra la radiación ultravioleta mediante la producción de melanina, que funciona como una barrera física protectora que rodea al núcleo y dispersa los rayos ultravioleta reduciendo su absorción por la epidermis.
- Previene la deshidratación evitando la salida de líquido tisular manteniendo el equilibrio hidroeléctrico.
- Actúa como termorregulador mediante diferentes mecanismos que incluyen: la secreción de sudor, lo que propicia una disminución de la temperatura, la

pilo-erección que permite que una delgada capa de aire caliente permanezca en la superficie cutánea y la regulación del paso de sangre por el lecho capilar dérmico ya sea la vasoconstricción o vasodilatación.

- Es un órgano inmunológicamente activo, pues procesa sustancias antigénicas que se le presentan y genera respuestas locales y sistémicas.
- Transmite información sensitiva acerca del medio externo al sistema nervioso, gracias a la presencia de mecanoreceptores y terminaciones libres

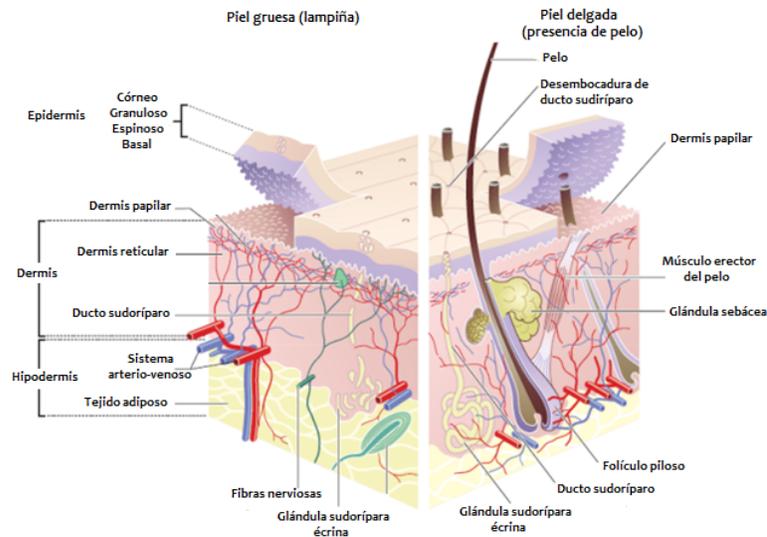


Figura 1. Micro-anatomía de la piel. La estructura primaria de la piel está compuesta por la epidermis, que es un epitelio estratificado plano cornificado que se renueva constantemente. La dermis compuesta por tejido conjuntivo denso altamente vascularizado, dentro de la cual se distinguen dos capas: la papilar, que dentro de sus funciones se encuentra el aportar nutrientes a la capa epidérmica y la reticular, que corresponde a la dermis profunda rica en colágena y otras proteínas de matriz extracelular que otorgan sostén y resistencia a la piel. La hipodermis es el tejido subcutáneo de origen adiposo y presenta grosores muy variables. Los derivados epidérmicos de la piel incluyen: Folículos pilosos y pelo, glándulas sudoríparas y sebáceas y uñas (no se muestran) que en conjunto constituyen un órgano muy complejo capaz de permitir la interacción del organismo interno con el ambiente externo.

Ross and Pawlina, 2015, Histología atlas y texto

1.1.2 LA EPIDERMIS

La epidermis es un epitelio plano estratificado en renovación constante que forma una capa córnea que otorga resistencia, es un tejido avascular que obtiene sus nutrientes a través de la dermis.

El 90% de la epidermis está constituida por células epiteliales llamadas queratinocitos, que tienen la particularidad de transformarse progresivamente al migrar a través de diferentes estratos (cornificación) organizadas en cinco niveles denominados: basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo. El estrato lúcido está presente únicamente en zonas de piel sometida a procesos de abrasión continua (palmas de las manos y plantas de los pies) **[Fig.2]**^{4,7,8}.

El **estrato basal**, es la capa más profunda y establece una sólida unión con la dermis subyacente a través de la membrana basal a la cual se encuentra anclada mediante hemidesmosomas y adhesiones focales (uniones entre células y ECM). Está compuesta por células con diferentes capacidades proliferativas⁹ dentro de las cuales encontramos a las células troncales epidérmicas, que poseen una alta capacidad proliferativa aunque sus ciclos celulares son generalmente largos (de 50-200 horas)², por lo que se dividen infrecuentemente. Se localizan en diferentes áreas del estrato basal (como en el bulbo del folículo piloso), las células troncales epidérmicas tienen la capacidad de responder ante la liberación diferentes factores de crecimiento liberados por el células del tejido cuando éste se ha dañado y así migrar y acelerar su crecimiento para regenerarlo¹⁰.

Como producto de la división asimétrica de las células troncales epidérmicas, se originan dos células hijas, una de ellas conservará las características de troncalidad mientras que la otra poseerá una capacidad proliferativa limitada, a éstas se les conoce como células amplificadoras transitorias que son las responsables del mantenimiento y crecimiento del epitelio pues se dividen con mayor frecuencia⁹.

El mecanismo de estratificación de la epidermis aún no se ha dilucidado completamente, sin embargo una de las teorías explica que las células epidérmicas usan su polaridad para realizar una división mitótica en dirección paralela a la membrana basal y de esta manera una de las células hijas es empujada hacia el estrato suprayacente y con ello pierde su capacidad proliferativa para comenzar su periodo de diferenciación a través del paso por los sustratos suprayacentes (proceso que tarda generalmente alrededor de 28 días), mientras que la célula hija restante permanecerá en la capa basal para continuar con el proceso¹¹.

Las células basales se caracterizan por su forma cuboidal, su núcleo es prominente con poca heterocromatina marginal, se encuentran unidas entre sí a través de

desmosomas, presentan vacuolas que contienen melanosomas pigmentados transferidos por los melanocitos que se encuentran intercalados entre ellas. En este estrato también encontramos células de Merkel que son mecanorreceptores muy importantes que se retomarán más adelante⁵

El **estrato espinoso**, esta formado de 5 a 10 capas de queratinocitos que son más grandes que en el estrato basal, tienen forma poliédrica y núcleos más grandes y redondos⁴. Además de su apariencia espinosa dada por la presencia de evaginaciones citoplasmáticas que permiten la unión célula-célula a través de desmosomas, las células que constituyen esta capa contienen cuerpos lamelares o de Odland, que son estructuras ovoides de 100-200 nm provenientes del Golgi y contienen enzimas hidrolíticas, inhibidores enzimáticos y láminas lipídicas formadas por fosfolípidos, glicosilceramidas y colesterol, las cuales liberarán su contenido en los estratos suprayacentes como precursores de la formación de la barrera de permeabilidad, cuya función es evitar el paso de líquido intersticial desde el medio interno hacia el medio externo, con lo que se evita la deshidratación. Esta barrera también impide el paso de moléculas y compuestos hidrofílicos desde el exterior, mientras las moléculas de naturaleza lipídica, como las hormonas esteroideas, fácilmente penetran en la piel^{2,5}.

Las células espinosas más superficiales aumentan de tamaño y se adelgazan en un plano paralelo a la superficie donde los núcleos también se alargan en lugar de ser redondos^{4,10}.

El **estrato granuloso**, es la capa más superficial de la porción no queratinizada y viable de la epidermis. Está constituida de 1-3 capas de queratinocitos aplanados cuyos núcleos son ovoides y de abundante heterocromatina. Contiene numerosos gránulos densos de queratohialina que poseen proteínas como la pro-filagrina. Conforme los queratinocitos van siendo desplazados hacia la superficie córnea, los queratinosomas crecen, se acercan al polo apical de la célula y se fusionan con la membrana plasmática; vierten su contenido en los espacios intercelulares entre las capas granulosa y córnea y por escisión enzimática se genera la filagrina, proteína matricial de los corneocitos que retrasa la pérdida de agua^{6,8,10}.

El punto final de la cornificación es un queratinocito muerto, con diferenciación terminal llamado corneocito. Carece de núcleo por la activación de endonucleasas, enzimas muy eficientes que degradan proteínas, ADN y ARN, sin embargo los queratinocitos apoptóticos se retraen antes de ser fagocitados por las células vecinas, mientras que se aplanan y se integran en la capa córnea.

El espacio extracelular está formado por agua y lípidos provenientes de los cuerpos lamelares que liberan su contenido a través de su fusión con la membrana

plasmática permitiendo la formación de entrecruzamientos proteicos a lo largo de la membrana interna de los queratinocitos^{8,10}.

El **estrato córneo** está formado de 18 a 21 filas de células, es la capa de espesor más variable pues se torna más gruesa en los sitios sometidos a un desgaste mayor, como ocurre en la formación de callos en las palmas de las manos y en los pulpejos de los dedos⁵, dando origen a un quinto estrato, el **estrato lúcido**, ubicado inmediatamente por debajo del estrato córneo, y por su naturaleza es considerado una subdivisión del estrato córneo.

Bajo condiciones basales, los queratinocitos requieren alrededor de 2 semanas para perder su núcleo y aproximadamente 2 semanas más para ser desplazados del estrato córneo, proceso llamado descamación.

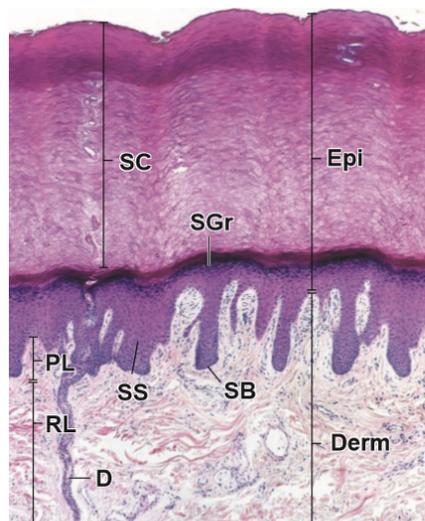


Figura 2. Fotomicrografía de un corte histológico de la planta de un pie teñida con H&E. Esta imagen muestra las capas de la piel gruesa, se ve la epidermis (Epi) que contiene un estrato córneo (SC) muy grueso. Se observa también el resto de los estratos de la epidermis (excepto el estrato lúcido) el estrato basal (SB), el estrato espinoso (SS) y el estrato granuloso (SGr). Se puede observar a la izquierda un conducto de glándula sudorípara (D) que atraviesa la dermis (Derm) para después seguir un trayecto a través de la epidermis. Se pueden observar los brotes epidérmicos en profundidad conocidos como crestas interpapilares y también las protusiones de tejido conjuntivo o papilas dérmicas. Debe tenerse en cuenta también la mayor celularidad de la dermis papilar (PL) y que los haces de fibras colágenas de la dermis reticular (RL) son más gruesos que los de la dermis papilar. 65 X.

Pawlina y Ross, 2015, Histología Atlas y texto

1.1.3 UNIÓN DERMOEPIDÉRMICA

El límite físico entre la dermis y la epidermis está establecido por la membrana basal que es una capa poroso semi-permeable que permite el intercambio de nutrientes y fluidos entre los dos tejidos.

La membrana basal da soporte a la capa epidérmica, regula la adhesión celular, la señalización que media el movimiento y crecimiento de queratinocitos y fibroblastos, determina la polaridad de crecimiento y la organización del citoesqueleto de las células basales^{12,13}.

Se pueden distinguir dos zonas que la conforman: la lámina lúcida y lámina densa. Las células basales de la epidermis se encuentran ancladas débilmente a la membrana basal lúcida mediante hemidesmosomas y está compuesta por proteínas como fibronectina, nidógeno, integrina $\alpha 6\beta 4$ y laminina 332 (laminina 5 en la nomenclatura antigua) que forman microfilamentos que se conectan a través de los desmosomas con la lámina densa subyacente compuesta por colágena IV, V y laminina III^{2,13}.

La unión dermoepitelial exhibe un contorno muy irregular (excepto en los párpados), tiene una forma ondulada resultado del aumento del tejido epidérmico y su proyección dentro de la dermis (crestas epidérmicas) y el tejido conjuntivo laxo que queda entre ellas recibe el nombre de papilas dérmicas⁵ **[Fig.1]**, estas interdigitaciones son las responsables de la formación de las huellas dactilares y los diferentes patrones en las palmas de las manos y las plantas de los pies².

1.1.4 LA DERMIS

La dermis es un sistema de fibras, filamentos y tejido conectivo amorfo cuya sustancia fundamental contiene glucosaminoglucanos y mucopolisacáridos ácidos, alberga una gran cantidad de nervios y redes vasculares que proveen nutrición y soporte a la epidermis. El componente celular más abundante son los fibroblastos aunque también encontramos macrófagos y mastocitos, y como respuesta a diferentes estímulos, podemos observar también células plasmáticas y leucocitos².

De acuerdo al grosor de las fibras de colágena, la celularidad y la vascularidad presentes en ellas, este tejido se divide en dos partes: la dermis papilar y la dermis reticular, que se encuentra dividida físicamente por el *Rete subpapiliare* que se refiere a un plexus vascular entre ambas capas⁴.

La dermis papilar es una delicada y desorganizada red de fibras delgadas de colágena tipo I, III y fibras elásticas inmaduras secretadas por fibroblastos inmersos en la matriz, además está compuesta por una gran cantidad de matriz intersticial constituida por ácido hialurónico y proteoglicanos^{4,14}.

La dermis reticular consiste en una red paralela a la superficie de la piel de tejido conectivo denso irregular, formado de gruesos haces de colágena I, III y en menor

cantidad V y fibras de elastina duras. Esta red, presenta un menor contenido celular y se extiende desde la base de la zona papilar hasta la hipodermis limitada por el plexus vascular *rete cutaneum* y su espesor varía dependiendo de la superficie corporal^{1,5,15}.

Los elementos que rellenan los espacios entre las fibras principalmente son: mucopolisacáridos, proteoglicanos e hialuronato. Estos componentes extrafibrilares proporcionan propiedades de hidrogel a la dermis, lo cual facilita el movimiento de fluidos, moléculas y células inflamatorias, así como resistencia a la compresión⁸.

1.2 FIBROBLASTOS Y SU IMPORTANCIA COMO PARTE DE LA PIEL

Los fibroblastos fueron descritos hace más de 50 años, se definen por su morfología estrellada y elongada, tienen la capacidad de crecer en monocapa y migrar sobre la superficie¹⁶⁻¹⁹ **[Fig.1]**. Morfológicamente se caracterizan por presentar un núcleo ovalado que contiene uno o dos nucleólos, un extenso retículo endoplásmico rugoso, un prominente aparato de Golgi y una gran cantidad de material citoplasmático granuloso^{18,20}.

Los fibroblastos son el tipo celular más común del tejido conjuntivo, otorgan estructura a través de la secreción de moléculas de matriz extracelular (ECM) como: colágenas, proteoglicanos y glicoproteínas, propias de los diferentes órganos y tejidos en los que se encuentren¹⁹. Son en gran parte responsables del mantenimiento y remodelación de la ECM a través de la secreción de una mezcla de moléculas bioactivas (factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas) que regulan procesos biológicos complejos como el desarrollo embrionario, envejecimiento, la reparación de heridas o el desarrollo de enfermedades ya sean fibróticas, cáncer de piel, psoriasis, entre otras²¹.

1.2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS FIBROBLASTOS

- **Morfología y marcadores**

Los fibroblastos se pueden originar a partir de las 3 capas blastodérmicas, sin embargo los de origen mesenquimal son más frecuentes y comparten muchas características con adipocitos, osteocitos y condrocitos lo que ha dificultado su identificación debido a la carencia de un marcador específico del linaje. Una

herramienta muy útil para su reconocimiento es el empleo de el anticuerpo anti-vimentina, que reconoce a un tipo de filamento intermedio muy abundante en fibroblastos, sin embargo, no es una propiedad única del linaje, pues también lo presentan células endoteliales y neuronas¹⁹.

Uno de los marcadores más empleados para su identificación es la proteína de superficie de fibroblastos (FSP1, por sus siglas en inglés), descrita por primera vez en 1976 por Vaheri A **et al**; en dónde reportaron que se puede localizar ya sea intracelularmente distribuida en el citoplasma, en la superficie celular asociada a estructuras fibrilares, sobre el sustrato de crecimiento formando una red fibrilar que se extiende fuera del cuerpo celular y de manera soluble en el medio extracelular²². Aunque, años más tarde se reportó la presencia de ésta proteína en otros linajes celulares (células endoteliales, musculares, plasmáticas y condrocitos). En 1995, Saalbach A. **et al**; desarrollaron un anticuerpo monoclonal (MoAbs) para proteínas de superficie de fibroblastos que desde entonces ha sido un recurso muy empleado para el estudio de este linaje celular²³ **[Fig.3]**.

A pesar de su abundancia los fibroblastos habían sido considerados de “poca importancia” pues se llegó a pensar que eran un grupo celular uniforme e inerte y por ello la carencia de estudios profundos que caractericen las diferentes poblaciones sin embargo, en la última década se han diversificado las investigaciones en este sentido.

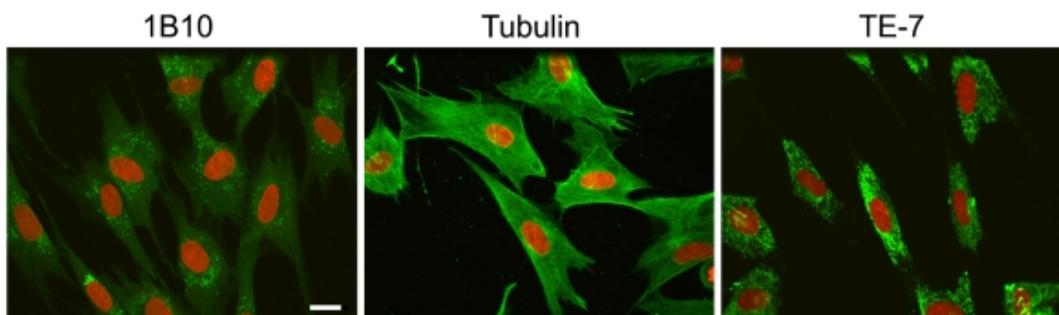


Figura 3. Morfología de fibroblastos. Los fibroblastos son un linaje celular que se define por su morfología estrellada y elongada, tienen la capacidad de crecer en monocapa y migrar sobre la superficie. La imagen nos muestra fibroblastos humanos cultivados en monocapa e incubados con los anticuerpos: 1B10 (FSP1), anti-tubulina y TE-7 (anti- vimentina) cuyos antígenos se encuentran presentes en fibroblastos normales en crecimiento.

An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue, Goodpaster T. et al., 2008.

1.2.3 FIBROBLASTOS EN LA PIEL

La piel es un órgano heterogéneo dentro del cual se pueden distinguir áreas anatómicas con características particulares como: crecimiento de pelo, grado de cornificación, espesor de la dermis, etc. Por ejemplo, el área palmo-plantar carece de folículos pilosos pero presenta una mayor concentración de glándulas ecrinas y al ser una zona de abrasión constante, los fibroblastos en estas áreas influyen sobre los queratinocitos para formar un estrato córneo hiper-queratinizado.

Esta heterogeneidad es establecida de acuerdo a las diferentes interacciones entre el epitelio y el mesénquima específico del sitio anatómico que es definido por los fibroblastos residentes. Las estrechas interacciones epitelio-mesénquima¹, no son propias de la piel, se trata de un suceso de gran importancia en todos los órganos epiteliales, por ejemplo: los fibroblastos del área urogenital inducen la diferenciación de epitelio de la próstata hacia precursores de la glándula prostática, ó aquellos fibroblastos presentes en el metanefros que inducen la diferenciación a nefronas en el riñón, otro claro ejemplo, son los fibroblastos que se encuentran en la dermis papilar y que son capaces de formar folículos pilosos, característica que se pierde en fibroblastos que se encuentran en la capa papilar²⁴.

1.2.4 CLASIFICACIÓN DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS.

Se conocen como fibroblastos dérmicos (DF, por sus siglas en inglés) a aquellos que forman parte de la dermis en la piel, diferentes estudios han demostrado que se trata de un grupo celular heterogéneo que se ha clasificado en subpoblaciones de acuerdo a diferentes criterios:

- Profundidad de la dermis (Cormack 1987)
- Origen embrionario (Le Lièvre and Le Douarin, 1975)
- Expresión genética y sitios anatómicos (Chang 2002)

En este trabajo tomaremos como referencia la primera clasificación que divide a los fibroblastos de acuerdo a la ubicación anatómica que ocupan dentro del tejido dérmico.

Se ha establecido que en los primeros 0.3 mm se localiza la población de fibroblastos papilares (PF) y los próximos 0.7 mm los reticulares (RF)^{25,26}. El cultivo y propagación de éstas poblaciones han demostrado que los fibroblastos residentes

¹ Se conocen como interacciones epitelio-mesénquima a la red de comunicación establecida entre las poblaciones celulares ya sean homo ó heterotípicas del epitelio y aquellas que conforman el tejido conectivo que se encuentra entre los órganos y tejidos (mesénquima).

de cada capa presentan ciertas diferencias, por ejemplo, los PF tienen la capacidad de dividirse más rápidamente que aquellos que componen la capa reticular²⁵⁻²⁷, además de alcanzar una mayor confluencia pues tienen una inhibición de contacto parcial²⁶.

- Los fibroblastos dérmicos papilares, ocupan la zona superficial de la dermis e incluyen aquellas células que regulan el crecimiento de pelos y del músculo erector
- Los fibroblastos dérmicos reticulares, ocupan la parte más profunda de la dermis, sintetizan la mayor parte de la ECM fibrilar²⁴.

Las diferencias más evidentes entre una capa dérmica y otra, se observan en la composición y organización de la ECM determinadas por las subpoblaciones celulares que las componen.

La ECM papilar se caracteriza por ser delgada y presentar fibras de colágeno tipo I y III poco organizadas que contrastan con las fibras reticulares de mayor densidad y organización²⁶ [Fig.4]. Estudios inmuno- histoquímicos han permitido describir a mayor profundidad las diferencias moleculares existentes, por ejemplo: la decorina que es un proteoglicano de la matriz se encuentra más expresada en la capa papilar y por el contrario microfibrillas de versicano son más abundantes en la capa reticular.

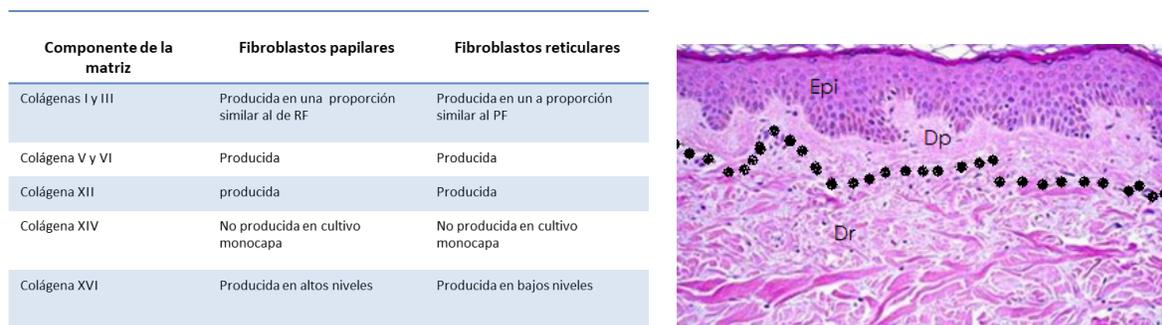


Figura 4. Fibroblastos dérmicos y la expresión de colágenos en cultivo. La dermis se encuentra justo debajo de la capa epidérmica (Epi) de la piel y está compuesta por dos capas funcionales: papilar (Dp) y reticular (Dr), conformadas por diferentes poblaciones de fibroblastos, que poseen capacidades diferentes de secreción de proteínas de matriz. La tabla nos muestra las diferentes capacidades de secreción de colágeno de los fibroblastos en monocapa. La capa papilar se caracteriza por ser delgada y presentar finas fibras de colágeno poco organizadas que contrastan con las fibras densas de la dermis reticular de mayor organización.

Como ya se mencionó anteriormente los fibroblastos son importantes reguladores de la homeostasis de los diferentes órganos y tejidos de los que forman parte. Esta regulación es posible gracias a la gran habilidad que poseen para establecer una

comunicación celular eficaz y constante (ya sea con células de su mismo linaje u otro tipo de células circundantes) y su consecuente capacidad para modificar la matriz extracelular.

La comunicación celular se refiere al mecanismo que permite la influencia de una célula determinada sobre el comportamiento de otra. Es una característica adquirida por los organismos vivos desde etapas muy tempranas y que resultó indispensable para el establecimiento de organismos multicelulares.

Independientemente de la naturaleza de la señal, la célula blanco o receptora puede responder gracias a la presencia de receptores protéicos, que en su mayoría son proteínas transmembranales que se unen a la molécula señalizadora o ligando de manera específica.

La relación entre la interacción de moléculas señalizadoras y moléculas receptoras tienen la capacidad de estimular o inhibir diferentes procesos celulares a través de la activación de una cascada de señalización intracelular que culmina con alguna modificación en el comportamiento de la célula receptora por ejemplo: la reorganización del citoesqueleto, el crecimiento o la diferenciación celular, la apoptosis, etc. Estas particulares respuestas forman parte de un proceso dinámico en el cual múltiples eventos pueden estar sucediendo al mismo tiempo y su combinación es el resultado de procesos biológicos complejos como el desarrollo embriológico, envejecimiento, la reparación de heridas, etc²⁸.

1.3 MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular consiste en una compleja red de macromoléculas tejido – específicas que se interconectan para formar una estructura estable que otorga las propiedades mecánicas de cada tejido. Según Mouw JK (2014), la ECM se define como el conjunto de todas las moléculas secretadas por las células y que son inmovilizadas en el espacio extracelular, incluyendo factores de crecimiento, citocinas y moléculas de adhesión²⁹.

La ECM separa y mantiene la diferenciación y homeostasis de los diferentes órganos y tejidos del cuerpo, determina y controla diferentes procesos celulares como: proliferación, adhesión, diferenciación, migración, polaridad y apoptosis mediante la regulación sobre la abundancia de los factores de crecimiento y sus receptores, el nivel de hidratación, el pH del microambiente, etc³⁰.

La ECM está compuesta por una serie de moléculas que difieren bioquímica y estructuralmente que en conjunto forman el matrisoma, dentro del cual al menos se consideran 300 proteínas (43 subunidades de colágenas, alrededor de 36

proteoglicanos, 200 glicoproteínas) conocidas como “núcleo del matrisoma” que corresponde a moléculas estructurales básicas que forman la ECM y representan del 1 al 1.5% del proteoma en mamíferos³¹.

Dentro de éstas proteínas de matriz, la más abundante en el cuerpo humano es la colágena que comprende alrededor del 77% del peso seco de la piel (libre de tejido adiposo)³².

1.3.2 COLÁGENAS

Se han identificado 29 tipos diferentes de colágena, cada una se compone por una triple hélice de cadenas polipeptídicas de tipo α de las cuales se conocen alrededor de 40 diferentes que dan origen a distintas estructuras supramoleculares **[Fig 5]**.

La estructura de triple hélice de las colágenas es dextrógira, es decir, que se forma hacia el sentido de las manecillas del reloj, cada una de las cadenas contiene uno o varios dominios² de repeticiones Gly-X-Y en donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido, aunque generalmente estos sitios son ocupados por prolina e hidroxiprolina respectivamente y se conoce como dominio colagénico.

Algunas moléculas colagénicas ensamblan 3 cadenas α iguales (homotrómeros) y otras están compuestas por dos o tres cadenas α diferentes (heterotrómeros), que determinan las propiedades mecánicas de las fibras que las contienen así como su asociación con otras proteínas estructurales que resultan en la formación de la estructura básica de la ECM^{29,33,34}.

² Dominio. Se refiere a una secuencia de aminoácidos específica y conservada que se repite a lo largo de una cadena polipeptídica, sin embargo su función puede variar de una proteína a otra.

Fig. 5 La superfamilia de las colágenas

Las colágenas se han dividido de acuerdo a su longitud, el número de dominios espiralados colagénicos y módulos no colagénicos y la arquitectura de ensamblaje

Clase	Tipo	Descripción
Fibrilar	I,II,III,V,XI,XXIV,XXVII	Forman parte de matrices fibrosas como la de la piel, el hueso, cartílago y ligamentos
FACIT	IX,XII,XIV,XVI,XIX,XX,XXI,XXII	Colágenas asociadas a fibras, se encuentran formando puentes asociándose a col I y II
Membrana basal	IV	Estructuras en forma de red que se encuentran asociadas a proteínas de la membrana basal y lamininas
Cadena larga	VII	Anclan fibrillas asociadas a la membrana basal
Filamentosas	VI	Forman microfibrillas
Cadena corta	VIII, X	Forman estructuras hexagonales
Multiplexinas	XIII, XVII, XXIII	Contienen múltiples dominios de triple hélice con interrupciones que contienen glicosaminoglicanos
MACIT	XIII, XVII, XXIII	Son proteínas transmembranales que contienen dominios intracelulares

Las colágenas tipo I y III componen el 90 y 10% respectivamente la dermis, mientras que la colágena V representa el 2% y otros tipos de colágenas como la colágena IV, VII, XVII se encuentran de manera normal en la piel pero en mucho menores proporciones.
Mouw JK et al. 2014 , Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction

Las colágenas forman una de las familias más grandes genética, estructural y funcionalmente. Estas proteínas se transcriben en RNA mensajeros (mRNA por sus siglas en inglés) permitiendo la síntesis del precursor polipeptídico (cadenas α) que contienen secuencias de reconocimiento para entrar al retículo endoplásmico y posteriormente al Golgi, en donde son sometidas a una serie de modificaciones post-traduccionales que corresponden a la hidroxilación de residuos de prolina y lisina seguida de la glicosilación (adición de galactosa y glucosilgalactosa) de ciertos residuos hidroxilisina.

La formación de residuos de hidroxiprolina a lo largo de las cadenas α es indispensable para su correcto plegamiento pues son sitios que permiten la formación de puentes de hidrógeno intercatenarios que estabilizan la hélice y las interacciones electrostáticas entre las lisinas en el espacio extracelular ^{33,35,36}.

Los precursores de colágena (pre-colágenas) son secretados por exocitosis conteniendo en sus extremos las terminaciones amino y carboxilo que serán removidos por acción de metaloproteinasas específicas, las cuales permiten la maduración de la colágena seguida de su alineamiento y la formación de fibrillas en el espacio extracelular ^{29,33,34} **[Fig 6]**.

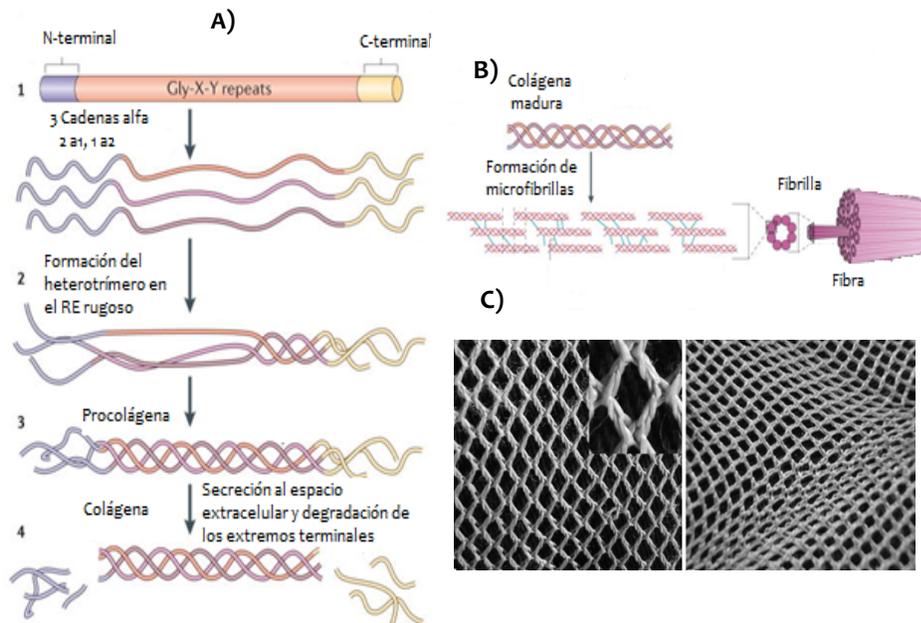


Figura 6. Síntesis de colágena y la formación de fibrillas de la matriz. A) La estructura básica de la colágena esta dada por cadenas α formadas por una serie de repeticiones Gly-X-Y (1) y los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminal. Las cadenas pueden ser de tipo 1 o 2 y se intercalan para originar triples hélices ya sean homotrimeros o heterotrimeros dentro del RE rugoso(2). Después de una serie de modificaciones post- traduccionales en el Golgi, se origina la procólágena que será liberada al espacio extracelular (3) Una vez fuera de la célula y por actividad de proteasas, las terminaciones amino y carboxilo son escindidas de la molécula y se obtiene la colágena madura (4). B) Esta sección representa la formación de microfibrillas, fibrillas y finalmente las fibras de colágena, mecanismo que ocurre gracias a la actividad de enzimas lisil oxidasas que catalizan la formación de enlaces covalentes entre moléculas de colágena y que son estabilizados por moléculas como FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple hélices) y SLRPs (small leucine-rich repeat proteoglycans) que otorgan resistencia al tejido. C) Representación de la organización en forma de red de las fibras de colágena en la piel, basada en el trabajo de Gibson et al. En donde también se muestra la distribución 3D de la red.

Mouw JK et al. 2014, Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction

1.3.3 Colágenas en la piel

La colágena I es una molécula heterodimérica compuesta por 2 cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, están codificadas por los genes: COL1A1 y COL1A2 respectivamente. Cada cadena contiene más de 1014 aminoácidos, su longitud aproximada es de 300nm y tiene una amplitud de 1-5 nm. Cuenta con 3 dominios: N-terminal no colagénico (N-telopéptido), dominio central colagénico y dominio C-terminal no colagénico (C-telopéptido). El dominio central abarca el 95% del total de la molécula.

La colágena III estructuralmente es un homotrímero compuesto por tres cadenas $\alpha 1$ codificadas por el gen COL3A1 y también la podemos encontrar en la dermis. Contiene 129 residuos siendo un poco más larga que la colágena I. Ambos tipos de colágena pertenecen a la clase fibrilar ^{37,38}.

1.3.4 Proteoglicanos

Los proteoglicanos son moléculas que se encuentran rellenando los espacios entre las fibras de colágena, son moléculas no fibrilares que se caracterizan por poseer un centro protéico que se une covalentemente a cadenas de glucosaminoglicanos (GAGs) que otorgan hidratación y lubricación, pues son cadenas de disacáridos cargados negativamente que facilitan la interacción y captura de cationes divalentes y moléculas de agua.

Los GAGs se clasifican de acuerdo a la estructura básica de carbohidratos es decir su distribución y densidad a lo largo de la proteína central, dentro de los principales subtipos se encuentran: condritin sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato, y ácido hialurónico.

Los proteoglicanos como el versicano, agregano, decorina, perlecano, regulan el ensamblaje a fibras de colágena y además sirven como reservorios de factores de crecimiento y junto con los GAGs están implicados profundamente en procesos como hemostasis, transporte y absorción de lípidos, crecimiento y migración celular, desarrollo, etc²⁹.

1.3.5 Glicoproteínas

Como se ha mencionado anteriormente, la ECM es una red interconectada de moléculas estructurales y no estructurales, las conexiones existentes en la matriz corresponden a interacciones proteína-proteína y proteína-carbohidrato que en conjunto otorgan fuerza y resistencia a la matriz.

Las glicoproteínas contribuyen a la cohesión entre los diferentes componentes estructurales de la ECM y con las mismas células inmersas en ella, permitiendo la unificación de los diferentes componentes en un solo sistema. Como ejemplos de glicoproteínas presentes en la piel podemos mencionar: fibronectina, fibrina, laminina etc.

La fibronectina es una glicoproteína heterodimérica constituida por unidades diméricas unidas por un puente disulfuro que forman polímeros largos organizados en repeticiones de 3 dominios diferentes (I,II y III) dentro de los cuales el dominio III abarca más de la mitad de su estructura completa.

La fibronectina contiene sitios de unión a fibrina, heparina, colágena, integrinas entre otros dominios de la superficie celular, por lo cual es un intermediario tanto de las conexiones entre las moléculas de la ECM así como de las interacciones matriz-célula. La fibronectina se puede encontrar en los tejidos como fibras insolubles pero también de forma soluble en fluidos como la sangre.

En el caso de los fibroblastos, la fibronectina se asocia con integrinas a través del dominio fibrilar Arg-Gly-Asp (RGD) en sitios específicos llamados adhesiones fibrilares, que son adhesiones focales que se conectan intracelularmente con filamentos de actina y junto con la actividad de la proteína motora miosina, generan una tensión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, con lo cual las fibras de fibronectina se estiran exponiendo una mayor cantidad de dominios de unión tanto a otras fibras como a integrinas, de esta forma el citoesqueleto de actina funciona como estimulador de la polimerización de fibrina y el ensamblaje de la ECM²⁹.

1.4 HERIDAS CUTÁNEAS

Las heridas cutáneas según Lazarus (1994), se definen como una discapacidad anatómica-estructural y funcional de la piel, que varían en su etiología y tratamiento. Las heridas se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios, uno de ellos es el tiempo de reparación.

Dentro de esta clasificación podemos distinguir las heridas cutáneas agudas, que tienen la cualidad de seguir un proceso complejo y ordenado a través del cual restauran su integridad anatómica y funcional dentro de los primeros 5 y 30 días después de la lesión.

Se conocen como heridas crónicas al resultado del fracaso del proceso de reparación en el cual no se logra el restablecimiento anatómico-funcional del tejido, debido a la interrupción del mismo por ciertos factores como una infección, hipoxia, necrosis, etc. Este tipo de heridas generalmente se desarrollan en personas que sufren quemaduras, neuropatías, insuficiencia venosa y arterial, entre otros ^{39,40}.

Los agentes causales de heridas pueden ser internos o externos. Las heridas internas provienen ya sea por la disfunción del sistema nervioso o inmune, o por la falta de sangre, oxígeno o nutrientes esenciales como es el caso de enfermedades crónicas (diabetes, arteroesclerosis, etc.). Las heridas externas son causadas por diferentes elementos que se pueden clasificar de acuerdo a su etiología en: mecánicos, químicos, térmicos, por radiación y eléctricos.

Otra de las clasificaciones más empleadas es aquella otorgada de acuerdo a la profundidad de la herida, pueden ser:

- Superficiales, cuando afectan solamente la capa epidérmica
- Parcialmente profundas, cuando la afección va desde la epidermis y llega hasta la dermis ya sea papilar o que llegue hasta la dermis reticular.
- Profundas, se extiende desde la epidermis, la dermis, hipodermis e incluso músculo y hueso.

La profundidad es una característica empleada generalmente para determinar el tratamiento adecuado que la persona afectada debe seguir. Las lesiones superficiales normalmente no requieren ningún tipo de tratamiento especial, sin embargo, debido a la naturaleza de la piel como una barrera protectora, una herida profunda compromete su funcionalidad al volverla susceptible a procesos de colonización por microorganismos patógenos y con ello la contracción de infecciones que imposibiliten su restauración por lo cual requieren de terapias de complejidad variable^{41,42}.

1.4.2 MECANISMO DE REPARACIÓN DE LA PIEL

La habilidad de responder frente al daño tisular a través de la reparación del mismo, es una propiedad característica de todos los organismos multicelulares.

La reparación es un proceso dinámico y complejo que involucra procesos de inflamación, quimiotaxis³ celular, mitosis epidermal, dermal y vascular, neovascularización, síntesis de ECM y la remodelación del tejido cicatrizante. Involucra una serie de eventos coordinados y estrictamente controlados que se caracterizan por ser etapas que se traslapan unas con otras **[Fig.7]**, por lo cual muchos de los mecanismos celulares ocurren simultáneamente:

- ✓ Hemostasis, comienza inmediatamente después del daño al tejido.
- ✓ Inflamación, inicia poco después de la primera etapa.
- ✓ Proliferación comienza dentro de los primeros días consecuentes y comprende la mayor parte de la reparación.
- ✓ Remodelación da lugar a la formación de cicatrices y puede tomarse semanas, meses e incluso años en concluir

³ Quimiotaxis. Se refiere a la habilidad de las células para dirigir su locomoción de acuerdo a un gradiente de concentración de sustancias atractantes o repelentes.

- HEMOSTASIS

La hemostasis se define literalmente como el arresto del sangrado (por su origen del griego hemo= sangre y stasis= detención), establece el inicio del proceso de reparación y como resultado de la interacción entre plaquetas, vasos sanguíneos y proteínas adhesivas, forma un tapón que detiene el sangrado, estabiliza el tejido y otorga una superficie adecuada para el desarrollo de las etapas consecuentes.

La disrupción causada a los vasos sanguíneos del área afectada ocasiona la inmediata extravasación de sangre que comienza llenando el área dañada con plasma y elementos celulares, especialmente plaquetas. Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos sin núcleo en forma de disco derivados de megacariocitos que contienen tres tipos de gránulos:

- ✓ Gránulos α , que contienen fibrinógeno, fibronectina, PDGF y TGF- α y moléculas involucradas en la cascada de coagulación como el Factor V y VIII
- ✓ Gránulos δ que contienen ATP, ADP, calcio, histamina y epinefrina
- ✓ Gránulos λ (lisosomas)

Bajo el estímulo de daño al epitelio, las plaquetas se adhieren a la capa sub-endotelial a través del factor von Willebrand (vWF), su adhesión es una señal de activación lo cual estimula su degranulación. Mientras que el denominado Factor III (proteína transmembranal de células endoteliales y fibroblastos) se activa físicamente tras la disrupción de las paredes epiteliales, lo que provoca su exposición en la superficie que al entrar en contacto con la sangre forma un complejo con elementos presentes en el fluido sanguíneo (Factor VIIa) permitiendo el comienzo del proceso de coagulación.

La coagulación es una cascada de activación enzimática en donde un grupo de serina/proteasas ocasionan la ruptura serial de moléculas inertes presentes normalmente en la sangre en forma de zimógeno. La trombina es una de estas enzimas que se encuentra al final de la cascada y es muy eficiente en la conversión de fibrinógeno a monómeros fibrina que se ensamblan espontáneamente para formar una matriz de alta resistencia que corresponde al tapón primario.

El tapón primario, está formado por colágena, plaquetas, trombina y fibronectina y funciona como una barrera física que detiene la hemorragia de forma inmediata y durante el proceso de reparación servirá como reservorio de factores de crecimiento y una superficie que permite la migración celular^{43,44}.

La activación de las células endoteliales, la degranulación de plaquetas y formación del tapón primario estimulan la liberación de diferentes factores de crecimiento como

PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) y factores quimiotácticos que estimulan la migración de fibroblastos, queratinocitos, neutrófilos y monocitos⁴⁵⁻⁴⁷.

- INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso vital en respuesta al daño, infección o trauma en general a cualquier tejido u órgano. Una reparación exitosa depende del correcto transcurso de una serie de eventos que involucran una fase fluida y una celular.

La fase fluida consiste en la vasoconstricción transitoria la cual permite la coagulación, seguida de la dilatación sostenida de arteriolas, capilares y vénulas que permiten el incremento del flujo sanguíneo, seguido del aumento de la permeabilidad de las paredes de los vasos sanguíneos que dan lugar a la respuesta celular, pues permiten que diferentes leucocitos entre ellos linfocitos atraídos por la activación de neutrófilos y monocitos residentes, penetren en el área afectada⁴⁸.

La respuesta inflamatoria se puede dividir en dos etapas : La fase temprana con el reclutamiento de neutrófilos y la fase tardía con la transformación de monocitos y el reclutamiento de linfocitos^{45,47}.

- Fase temprana inflamatoria

Como respuesta a la previa liberación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 y TNF- α) las células endoteliales comienzan a expresar diferentes moléculas de adhesión como ICAM-1 y E-selectina, y a través de la interacción con diferentes integrinas expresadas por neutrófilos que llegan por el torrente sanguíneo (rodamiento) se adhieren a la superficie del endotelio dañado y se introducen al tejido (diapédesis). La transvasación de los neutrófilos dentro de los compartimentos alveolares, es una señal de activación^{49,50}.

La principal función de los neutrófilos es limpiar el área afectada a través de su capacidad fagocitaria que elimina detritos celulares y la secreción de proteasas que degradan la matriz no viable como: elastasa, catepsina G, proteinasa 3, activador plasminógeno tipo uroquinasa y moléculas como eicosanoides, péptidos catiónicos y radicales libres derivados de la vía mieloperoxidasa que funcionan como agentes antimicrobianos cruciales para los procesos subsecuentes, pues heridas con un desbalance bacteriano generalmente no logran sanar ^{47,51}. Adicionalmente, los neutrófilos secretan factores como TNF- α , IL-1 β e IL-6 que amplifican la respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento de otras células inflamatorias⁴⁵.

-Fase tardía inflamatoria

Estudios *in vitro*, han demostrado que los neutrófilos tienen la capacidad de cambiar el fenotipo y perfil de expresión de citocinas de monocitos, lo que permite su diferenciación a macrófagos maduros y una correcta respuesta inmune durante el proceso de reparación⁴⁵.

Los macrófagos activados, secretan TNF- α e IL-1 β , ambos estimulan fibroblastos para el depósito de ECM, migración y específicamente IL-1 es un factor mitogénico y favorece la expresión de metaloproteinasas (MMPs) que degradan la matriz colagénica, mientras suprime la expresión de sus inhibidores TIMPs (Inhibidores de metaloproteinasas).

El último grupo celular inmune en entrar al sitio de la herida en la etapa inflamatoria son los linfocitos, que son atraídos alrededor de las 72 horas después de la lesión mediante la acción de IL-1, componentes del complemento y productos de la escisión de la inmunoglobulina G (IgG).

Las células inflamatorias en conjunto liberan otros factores de crecimiento como TGF- β , TGF- α , EGF, bFGF, que permiten la migración de fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales al tejido dañado para comenzar la etapa proliferativa que aumenta la celularidad de la herida.

- PROLIFERACIÓN

La fase de proliferación comienza el tercer día después de la lesión y continúa hasta 2 semanas posteriores. Es caracterizada por la migración de queratinocitos y fibroblastos que secretan una nueva ECM que da estructura a la formación del tejido granuloso⁴⁷. Los procesos ocurridos en esta fase se explican con detalle a continuación.

Los primeros fibroblastos aparecen en la zona de la herida a los 3 días atraídos por factores como TGF- β y PDGF. Una vez en la herida, proliferan rápidamente y producen proteínas de la matriz como hialuronano, fibronectina, proteoglucanos y procolágenas tipo I y III además de factores como IGF-1, bFGF, TGF- β , PDGF y KGF⁵².

Las moléculas que componen la colágena I, se encuentran fuertemente asociadas y formando fibras muy resistentes a la degradación proteolítica por la mayoría de las enzimas, excepto la MMP-1, que es secretada por diferentes leucocitos entre la fase inflamatoria y proliferativa y cuya actividad degradativa es regulada por la expresión de TIMP-1 liberado por fibroblastos estimulados por TGF- β ⁵³. Para los últimos días de la primera semana, la ECM de fibrina habrá sido reemplazada por una matriz rica en colágena otorgando una superficie más laxa que facilita la migración celular.

La acumulación de fibroblastos en la matriz dérmica (fibroplasia) gracias a los factores quimiotácticos tanto de los propios fibroblastos (CTGF) como de neutrófilos y macrófagos mediante la secreción de COX2 y MCP1, respectivamente, permiten la formación del tejido granuloso^{47,52}.

El tejido granuloso está formado por una matriz provisional generada por fibroblastos que reemplaza la ECM de fibrina formada inicialmente, por una de ácido hialurónico, fibrinógeno, fibronectina, colágena I y III, ésta última representa del 30 al 40% de la composición total. El tejido granuloso se encuentra altamente vascularizado y ofrece el microambiente adecuado para la reparación, pues posee una alta actividad metabólica que acelera la proliferación celular y la síntesis de proteínas, lactato y CO₂.

Bajo la influencia de TGF- β , los fibroblastos sufren un cambio de fenotipo a miofibroblastos, que se caracterizan por expresar microfilamentos de actina comunes como F, β , γ y particularmente α -SMA, además de filamentos intermedios de vimentina, desmina, laminina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e integrinas específicas⁵⁴. Estas características adquiridas permiten la unión de los fibroblastos a fibronectina y colágena sobre la matriz para llevar a cabo la contracción del tejido aproximando los extremos mediante la acción cíclica de ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina⁴⁷.

La maduración del tejido granuloso se entiende como la remodelación de la matriz que lo compone con la finalidad de regresar al estado basal del tejido cutáneo esto implica la reducción de macrófagos y miofibroblastos que son eliminados por apoptosis marcando el inicio de la siguiente etapa^{45,55}.

- REMODELACIÓN

La remodelación es la última fase del proceso de reparación tisular y comprende el periodo más largo, comienza aproximadamente a partir del día 21 y puede tardar en finalizar de 1 a 2 años, o incluso más en algunos casos⁴⁷.

La remodelación comprende procesos altamente controlados de degradación y síntesis de proteínas; en donde finaliza la maduración del tejido granuloso que se refiere al término de eliminación de los miofibroblastos así como el reemplazo de las proteínas que conforman la ECM. En esta etapa la colágena III es degradada por acción de metaloproteinasas sintetizadas por neutrófilos, macrófagos y fibroblastos presentes, y es reemplazada por colágena tipo I. La acumulación de colágena, disminuye la densidad de los vasos sanguíneos y el tejido granuloso gradualmente madura para producir una cicatriz. La colágena se deposita formando conglomerados, que al inicio del proceso de reparación se encuentran altamente desorganizados, sin embargo, la nueva matriz formada cuenta con una mayor orientación de fibras que se traslapan unas con otras y que finalmente logran una mayor organización en los etapas finales de la remodelación, ésta característica otorga una mayor rigidez al neot Tejido, pues aproximadamente las fibras de colágeno ganan un 80% de fuerza en comparación con el tejido natural^{47,52}.

En esta etapa de remodelación, los queratinocitos y las células troncales epiteliales que se encuentran localizadas en los folículos pilosos y en la lámina basal de la epidermis adyacente no dañada, juegan un papel sumamente importante pues se encargan de repitelizar el área afectada a través de su migración desde los extremos. Una vez cubierta el área de la herida, una inhibición por contacto inicia la proliferación y diferenciación de los queratinocitos para formar el tejido estratificado característico de la epidermis⁵⁶

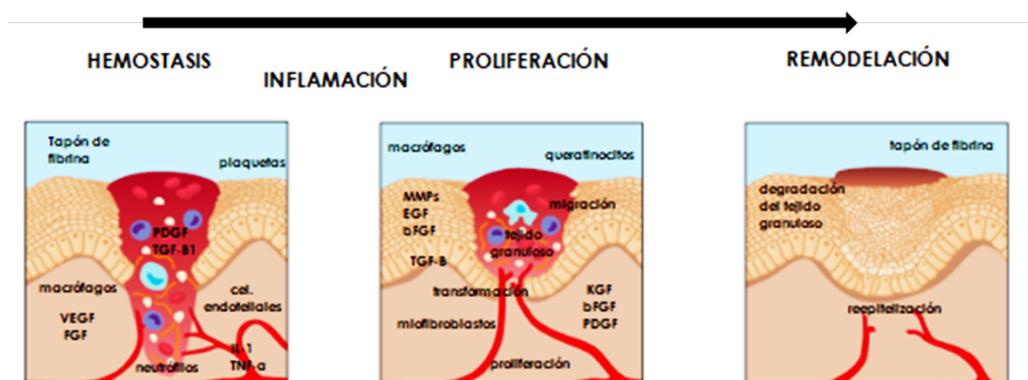


Figura 7. Reparación de la piel. El proceso de reparación de la piel está coordinado por una serie de cascadas de señalización celular que estimulan procesos simultáneos como: proliferación, migración, degradación y remodelación de la matriz celular. Con motivos didácticos se puede dividir en diferentes etapas coordinadas que se traslapan entre sí y que en conjunto determinan el éxito de la reparación del tejido.

En los mamíferos la culminación de la reparación origina una cicatriz compuesta por tejido granuloso y fibroso, que presentan una baja calidad en la reconstitución de la

matriz que consiste en fibras densas de colágena organizadas paralelamente que carecen de funcionalidad, en contraste con las fibras finas en forma de red características de la piel normal no afectada.

Dentro del reino animal ciertas especies como el ajolote y el pez cebrá tienen la capacidad de responder ante el daño regenerando las partes afectadas, es decir poseen un mecanismo de reparación libre de cicatrización.

Uno de los más grandes retos dentro de la biología de la reparación de heridas está enfocado precisamente en lograr inducir la regeneración de la piel después de ser dañada. Una de las posibles respuestas a esta interrogante se puede encontrar asociada al proceso de reparación en embriones, que se caracteriza por generar una respuesta rápida y eficiente produciendo nuevo tejido en lugar de una cicatriz^{57,58}

Esta habilidad de reparación libre de cicatrización fue publicada por primera vez en 1970 en un estudio llevado a cabo en fetos de conejo⁵⁹ y se ha confirmado en numerosas ocasiones en diferentes organismos^{60,61} incluyendo humanos⁶². En el caso de estos últimos, la dermis fetal tiene la habilidad de regenerar una matriz de colágena idéntica al tejido original, incluyendo la formación de los diferentes apéndices dérmicos como glándulas sebáceas y folículos pilosos, capacidad que se pierde a las 24 semanas de gestación cuando ya se han formado las capas dermo-epidérmicas, la epidermis ya se encuentra estratificada y presenta muchos de los anexos cutáneos de la piel adulta, por lo cual difícilmente se puede diferenciar una de la otra⁵⁷.

Existen muchas teorías alrededor de la capacidad de los embriones humanos para regenerarse, inicialmente esta característica se atribuyó a la naturaleza del ambiente intra-uterino, rico en fluido amniótico, ácido hialurónico y factores de crecimiento, sin embargo esta teoría se ha refutado en diferentes experimentos por ejemplo: el empleo de marsupiales que terminan su desarrollo fuera del útero y sin embargo preservan la característica regenerativa⁶³, otro experimento se llevó a cabo mediante la exposición de heridas cutáneas de borregos adultos a un ambiente rico en fluido amniótico y a pesar de ello desarrollaron cicatrices⁶⁴.

Durante la reparación prenatal en embriones humanos, los niveles de factores de crecimiento varían en comparación con el adulto, por ejemplo, los niveles de PDGF, TGF- β y bFGF son muy bajos, mientras que IGF-II presenta niveles considerablemente más altos, y prácticamente la infiltración de células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos es nula. En cuanto a la matriz extracelular, en las heridas fetales es rica en ácido hialurónico, no hay producción de colágena III lo cual permite recuperar la organización basal de las fibras de colágena I sin

desarrollar un tejido granuloso, es decir, no hay depósito de colágena I debido a que los fibroblastos no proliferan a tal grado de observar una fibrosis como ocurre en el adulto, esto se ha vinculado a la carencia de TGF- β que estimule su diferenciación^{58,65,66}.

El estudio del proceso de reparación prenatal resulta interesante, sin embargo tomando en cuenta las diferencias fisiológicas entre éste y el estado post-natal dentro de las que podemos mencionar: un sistema endocrino diferente, la inexistente estimulación antigénica, inmadurez del sistema inmunológico, un hígado no desarrollado metabólicamente, entre otras, son características muy evidentes que resultan en dos sistemas incomparables.

Por otro lado, a mediados de los 90s diferentes investigaciones se enfocaron en comparar fluidos extraídos de heridas agudas y crónicas. De estos estudios, se concluyó que independientemente de la etiología a nivel molecular, las heridas crónicas comparten ciertas características como la excesiva producción de citocinas pro-inflamatorias, una alta actividad de ROS y de proteasas así como el decremento de sus inhibidores, la deficiente actividad de factores de crecimiento y presencia de células senescentes, así como la contracción de infecciones persistentes^{51,67,68}.

Gracias a todas las investigaciones anteriores, actualmente sabemos que los diferentes procesos celulares involucrados en el cierre y reparación de una herida cutánea, son mediados por citocinas, factores de crecimiento, proteasas y hormonas que construyen el microambiente adecuado para llevar a cabo una reparación exitosa sin embargo, un mínimo desbalance en alguno de estos factores interfiere con la restauración del tejido con la posibilidad de originar heridas crónicas.

1.4.4 MECANISMOS MOLECULARES DE LA REPARACIÓN DE HERIDAS

Los fibroblastos son esenciales para el mantenimiento y la regulación del proceso de cierre de una herida, se encuentran involucrados en todas las etapas que lo conforman desde la formación de un tapón de fibrina que evite la pérdida de líquidos, el depósito de una matriz celular temporal capaz de soportar la migración celular así como el tránsito de las diferentes citocinas y factores de crecimiento involucrados, hasta la reducción del perímetro del área afectada a través de su transformación y expresión de α -SMA que permite la contracción de la herida.

A nivel molecular, la actividad transcripcional de genes que promueven estos procesos celulares han recaído principalmente en la activación de la vía de TGF- β y Wnt que también son las más estudiadas en este sentido.

- VÍA DE SEÑALIZACIÓN TGF- β

La familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) fue descrita por primera vez por de Larco y Todaro en 1978, quienes otorgaron este nombre a un conjunto de moléculas secretadas por células tumorales con la capacidad de promover su transformación⁶⁹. Años más tarde, se descubrió que estas moléculas no eran propias de células tumorales sino que también eran secretadas por células no transformadas y que regulan procesos como el desarrollo y la reparación de tejidos^{70,71}.

TGF- β es una citocina pleiotrópica secretada por fibroblastos y células epiteliales tejido-específicas cuya actividad depende del contexto fisiológico. Comprende 3 isoformas clásicas β 1, β 2 y β 3, aunque la familia completa cuenta con alrededor de 40 moléculas con estructuras y funciones similares dentro de la cual se incluye a BMP (bone morphogenetic protein)⁷². Cuando alguno de estos ligandos se une al receptor T β RII de tipo cinasa serina/treonina, permite su interacción con T β RI y su consecuente fosforilación y activación. T β RI activado inicia una cadena de fosforilaciones río abajo ya sea de las proteínas denominadas Smad que regulan la vía canónica o una vía no transcripcional independiente de éstas que corresponde a la vía no canónica con capacidad para activar diferentes cascadas como: MAPK, JNK, Akt/PKB, GTPasas pequeñas entre otros factores.

Las Smads son proteínas intracelulares en mamíferos se han descrito 9 diferentes que se clasifican en 3 grupos de acuerdo a sus estructuras y funciones. Las RSmad (receptor-activated) que incluyen las formas 1,2, 3, 5 y 8; las co-Smad que únicamente comprende a Smad-4 y las Smad inhibitorias que corresponden a las formas 6 y 7.

Una vez que el receptor ha sido activado, fosforila alguna de las RSmad (acción que depende del ligando y del sitio anatómico), TGF- β generalmente puede fosforilar a Smad 2 ó 3, provocando un cambio conformacional en la proteína que permite su interacción con la co-Smad 4 para formar un complejo que se transloca al núcleo y funciona como un regulador de transcripción ya se promoviendo directamente la expresión de genes como Col1A1, Col3A1 o a través de su interacción con otros

factores de transcripción, co-activadores, co-represores, etc. Por lo cual las Smads se consideran como moléculas que integran las señales de otras vías^{73,74}.

La actividad biológica de TGF- β ha sido estudiada ampliamente, y se sabe que tiene efectos sobre la proliferación, diferenciación, producción y remodelación de la ECM, quimiotaxis, producción de factores de crecimiento y hormonas, etc⁷⁴.

En la década de los 80's se llevaron a cabo diferentes investigaciones en torno a la implicación de TGF- β y la reparación de heridas en donde se observó que TGF- β estimula la angiogénesis, inflamación, quimiotaxis y la deposición de ECM en fibroblastos^{71,75,76}. Estos resultados fueron confirmados años después mediante el empleo de heridas crónicas como modelo de estudio⁷⁷.

Actualmente se cuenta con evidencias muy sólidas de que TGF- β promueve la secreción de diferentes proteínas de matriz como: fibronectina, colágena, condritina, biclicano, decorina, osteopontina, osteonectina, tenascina, trombospondina entre otras⁷². Además, favorece el depósito de ECM a partir del estímulo de la secreción de PAI-1 y TIMPs que inhiben la función de proteasas como la colagenasa que degradan la matriz^{78,79}. Otros estudios han demostrado que el tratamiento con TGF- β induce cambios en la expresión de integrinas en diferentes tipos celulares modificando las interacciones célula-matriz^{70,72,80}.

- IMPLICACIONES LAS VÍAS WNT Y TGF-B EN EL COMPORTAMIENTO DE LOS FIBROBLASTOS DENTRO DEL PROCESO DE REPARACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS

En un estado de reparación de la piel, los niveles de β -catenina en fibroblastos se encuentran generalmente elevados al igual que los del complejo TCF/LEF (factor celular T / factor potenciador linfoidal) que es uno de los factores de transcripción blanco de β -catenina y promotor de los genes Ciclina D1, MT1-MMP y MMP-7 (ó Dkk-1) en el desarrollo embrionario⁸¹.

Diferentes estudios han demostrado que la vía de Wnt/ β -catenina estimula el desarrollo de enfermedades fibróticas y la transición epitelio-mesénquima en diferentes tipos de cáncer⁸²⁻⁸⁵. Sin embargo, los factores que regulan los niveles de β -catenina en fibroblastos no se han esclarecido completamente. Se sabe que la ECM tiene una gran influencia sobre muchos procesos intracelulares gracias a los diferentes estudios realizados en células de origen mesenquimal que han demostrado que la colágena I y III son capaces de estimular la acumulación de β -catenina y en consecuencia su translocación al núcleo⁸⁶⁻⁸⁸. Otro estudio demostró

que fibroblastos bajo el estímulo de bFGF, activan la vía canónica de Wnt, así como la acumulación de β -catenina en el núcleo⁸⁹.

Por otro lado el estudio de TGF- β en el proceso de reparación ha revelado que particularmente TGF- β 1 aumenta su expresión durante los primeros días y disminuye durante la fase de re-epitelización. Uno de los efectos más estudiados de TGF- β es la transformación de miofibroblastos, lo cual se ha comprobado en numerosas ocasiones tras la estimulación de fibroblastos con TGF- β 1 que comienzan a expresar α -sma y a producir colágena, efecto que se le ha atribuido a Smad3⁹⁰⁻⁹³. El estudio de fibroblastos provenientes de cicatrices hipertróficas además de la persistente cantidad de TGF- β 1, también mostró una alta fosforilación de Smad2 y 3⁹⁴⁻⁹⁶, también se ha demostrado que β -catenina inhibe la migración de queratinocitos mientras promueve la proliferación en fibroblastos y que esta regulación es dependiente de TGF- β , pues ratones null para Smad3 mostraron un mayor grado de re-epitelización y reducción del área de la herida, con una reducida cantidad de fibroblastos^{97,98}.

En la última década han surgido estudios que demuestran que las vías de Wnt/ β -catenina y TGF- β se encuentran interactuando en el proceso de reparación de heridas cutáneas, con lo cual se ha establecido que ambas vías regulan positivamente la proliferación de fibroblastos y que el efecto de TGF- β es parcialmente regulado por β -catenina⁹⁹. Un trabajo publicado en el 2009 demostró que β -catenina junto con TGF- β en fibroblastos regulan positivamente la proliferación, migración, formación de una matriz rica en colágena y su contracción dentro del proceso normal de reparación de la piel¹⁰⁰. En resumen, la mayoría de las investigaciones realizadas en este sentido, sugieren que mientras β -catenina tiene un papel regulador predominante en migración y proliferación, TGF- β lo tiene en el depósito y contracción de la ECM pero ambas vías se encuentran interconectadas.

1.4.5 FACTORES DE CRECIMIENTO ASOCIADOS A LA REPARACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS

- Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

En 1974, Gospodarowics aisló una proteína que aceleraba la proliferación de fibroblastos bovinos extraídos de la glándula pituitaria y la denominó FGF¹⁰¹. Posteriormente, en 1986 Abraham et al, analizó el cDNA de FGF humano y estableció que el FGF básico es una estructura de una sola cadena polipeptídica de 17 kDa con afinidad al fósforo¹⁰². Actualmente se tienen registrados 22 miembros de la misma familia que transducen sus señales a través de 4 receptores

transmembranales de tipo tirosina-cinasa que se unen a sus ligandos con diferentes afinidades.

Estas moléculas controlan diferentes procesos como: proliferación, migración, diferenciación, sobrevivencia, y al mismo tiempo contribuyen con procesos biológicos complejos como el desarrollo embrionario y la reparación del tejido cutáneo^{101,103,104}.

FGF2 o FGF básico (bFGF) es una molécula esencial para el proceso de reparación. Se han desarrollado diferentes estudios *in vivo* con ratones knock-out y deleciones para el gen que lo codifica y sus receptores. Los resultados han mostrado diferentes anomalías en la piel, concluyendo que la pérdida de bFGF ocasiona la pérdida de glándulas sebáceas, defectos en los folículos pilosos, una reparación de la piel retardada y la progresión de fibrosis dermal¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Otras investigaciones han comprobado que los niveles de expresión de bFGF se incrementan en heridas agudas mientras que existe una baja expresión en heridas crónicas y en pacientes con úlceras venosas^{109,110}. Con base en todo lo anterior, se sabe que es importante para la formación del tejido granuloso, la reepitelización y remodelación del tejido^{111,112}. Estudios *in vitro* han demostrado que bFGF regula la síntesis y deposición de proteínas de la ECM, incrementa la migración de queratinocitos y fibroblastos y los estimula para producir colagenasa^{113,114}.

- Factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF)

El factor de crecimiento vascular (VEGF) es conocido por ser un potente factor que estimula la neovascularización o angiogénesis que se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos. Es sintetizado por queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, plaquetas, neutrófilos y macrófagos en respuesta a estímulos de IL-1, TGF- α , KGF, TGF- β 1, EGF, PDGF, bFGF¹¹⁵⁻¹²⁰.

El VEGF se une a dos diferentes receptores, VEGF2 (KDR) que es un receptor que media la quimiotaxis y la proliferación de células endoteliales *in vitro* y VEGF1 (Flt-1) un receptor que organiza el ensamblaje de los vasos y posiblemente regula la permeabilidad vascular¹²¹⁻¹²³. Estos receptores son de tipo tirosina-cinasa y se expresan normalmente en células endoteliales, y en particular VEGF1 también se expresa en células hematopoyéticas como monocitos y macrófagos.

De acuerdo con diferentes estudios, los ratones deficientes de VEGFR2 desarrollan una falla en el crecimiento de vasos sanguíneos y mueren antes de nacer, lo que indica que VEGF es un factor esencial para el desarrollo del sistema vascular¹²².

Por otro lado, la deficiencia de VEGFR1 en ratones exhibe un crecimiento excesivo y desorganización de los capilares sanguíneos, lo que sugiere que tiene una regulación negativa sobre el desarrollo embrionario¹²⁴.

VEGF es una molécula que regula gran parte de los procesos celulares que ocurren a lo largo del cierre de una herida incluyendo etapas tempranas y tardías, por lo cual su expresión resulta particularmente esencial. Aunque sabemos que estos procesos celulares son eventos aleatorios, por motivos didácticos mencionaré los procesos de acuerdo al orden de las etapas empleadas para describir la reparación de heridas.

En primer lugar VEGF es liberado por células endoteliales inmediatamente después de haber sufrido una disrupción en el tejido, lo cual estimula la adhesión y agregación de plaquetas promoviendo la coagulación. Al mismo tiempo, promueve la degradación de la matriz celular mediante el estímulo de la secreción de MMP-1 y MMP-2 y mantiene un balance a través de la secreción de TIMP-1. VEGF tiene la capacidad de regular la migración celular a través de otros factores como la vasodilatación y permeabilidad de los vasos, además de ser una molécula que regula la expresión de integrinas que participan en el proceso quimiotáctico.

La formación de la red vascular que inerva el tejido granuloso, es otro evento de gran prioridad para el proceso de reparación, pues los capilares sanguíneos son la vía por la cual diferentes nutrientes y oxígeno son transportados al sitio de la herida. Se ha comprobado en diferentes ocasiones que los ambientes hipóxicos contribuyen a la liberación de VEGF además de aumentar la expresión de su receptor en células endoteliales¹²⁵.

- Factor de crecimiento epidérmico (EGF).

La familia EGF comprende varios factores mitógenicos muy conocidos entre ellos encontramos al factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), el EGF de unión a heparina (EGF-HB) y otros integrantes no tan populares como la amfiregulina, epiregulina, betacelulina y neuroregulina, entre otros. La familia EGF tiene la capacidad de unirse a 4 receptores diferentes que forman homo o heterodímeros tras su interacción con el ligando.

La participación de EGF en procesos de reparación fue analizada primero por Grotendorst et al; quien detectó EGF en fluidos de heridas de ratas y demostró su actividad quimiotáctica en células endoteliales¹²⁶. EGF es secretado por plaquetas, macrófagos y fibroblastos y se encuentra sobre expresado en heridas agudas. EGF actúa de manera parácrina sobre queratinocitos y se ha descrito que tiene un efecto

mitogénico además de promover la migración lo cual acelera la reepitelización y aumenta la fuerza de tensión en las heridas¹²⁷⁻¹³¹.

Los factores de crecimiento (GF) son moléculas señalizadoras solubles que controlan respuestas celulares a través de su unión a receptores transmembranales específicos de su célula blanco y la activación de diferentes vías de señalización que culminan con algún cambio en el comportamiento celular. Dentro de la triada de la ingeniería de tejidos además de los andamios y los factores de crecimiento las células juegan un papel fundamental para la generación de tejidos que reparen o regeneren las heridas. Entre ellas mencionaremos además de la participación de los fibroblastos al potencial de las células troncales en los procesos de reparación.

1.5 CÉLULAS TRONCALES

1.5.2 Definición y origen

Como parte de la homeostasis de los órganos y tejidos se requiere del reemplazo de células muertas para mantenerlos y/o regenerarlos cuando están dañados. Esto ocurre gracias a que existen poblaciones celulares quiescentes e indiferenciadas denominadas células troncales, que se pueden distinguir del resto por tener dos características muy particulares:

- La capacidad de diferenciación, que es un proceso mediante el cual las células pasan de un estado indiferenciado a la adquisición de una forma y función particular especializada dentro de un órgano o tejido
- La auto-renovación, que se refiere a la capacidad de dividirse y mantener la potencialidad troncal en sí misma y transmitirla a su progenie¹³²

De esta forma cuando una célula troncal se autorrenueva origina una célula idéntica que mantendrá su potencialidad y otra que se diferenciará para adquirir un fenotipo específico de acuerdo a las condiciones bajo las cuales se encuentre.

De acuerdo a su origen, las células troncales se pueden dividir en embrionarias (ESC), que permiten el desarrollo del embrión, y somáticas (SSC) que perduran en el cuerpo adulto¹³³.

Las células troncales también se han dividido de acuerdo a su potencialidad, que depende de su origen embrionario y de su especificación a lo largo del desarrollo. Esta clasificación en orden jerárquico comprende:

Células troncales totipotentes: Generan todas las células que conforman a los diferentes órganos y tejidos del cuerpo y también aquellas células de los tejidos extra-embrionarios (células del trofoblasto). Ejemplo: cigoto (es la única célula totipotente)

Células pluripotentes: Pueden dar origen a células de las tres capas embrionarias. Ejemplo: células troncales embrionarias (ESC).

Células multipotentes: Se pueden diferenciar a distintos linajes celulares de una misma capa germinal, ya sea que provengan del: endodermo, mesodermo o ectodermo Ejemplo: células troncales hematopoyéticas (HSC).

Células unipotentes: Generan un solo tipo celular de una capa germinal específica. Ejemplo: células troncales espermáticas (SPC).

El comienzo del estudio de las células troncales se remonta al inicio de los años 60's gracias al estudio de las células involucradas en el desarrollo embrionario realizado por Cole R y Edwards R.G. , et al¹³⁴; quienes describieron las primeras características morfológicas y fisiológicas que diferenciaban a este linaje de las células diferenciadas.

Para la obtención de ESC se requiere necesariamente de la destrucción de un blastocisto y las células obtenidas tienen la capacidad para formar un ser vivo "*de novo*" al implantarse *in vitro* en el útero¹³⁵.

El empleo de ESC como alternativa terapéutica generó mucha controversia pues desde el punto de vista ético no es viable el uso de embriones implantados como recurso para la obtención de células troncales. Por otro lado se considera, que no cumplen con la característica de autoregeneración que incluye el concepto estricto de célula troncal actual. Si bien, estas células tienen un alto potencial de diferenciación, no se ha podido comprobar que tengan la capacidad de mantenerlo *in vivo* a pesar de tener una división asimétrica durante el desarrollo embrionario.

Por estas razones se ha optado por el empleo de SSC con fines terapéuticos. Hasta la fecha se han aislado células troncales a partir de muchos tejidos adultos como: tejido conectivo como el periosteo, membrana sinovial, pericitos, piel, sangre periférica, ligamento periodontal, decidua de los dientes y cordón umbilical¹³³.

1.5.3 Células Troncales mesenquimales

El estudio de las células troncales mesenquimales comenzó a partir de la identificación de un nicho celular denominado CFU-f (derivado del inglés: colony forming unit-fibroblast) dentro del tejido hematopoyético por Friedestein y su equipo de trabajo, quienes establecieron la heterogeneidad de la composición de la médula ósea y las identificaron como células no fagocíticas con capacidad para adherirse a superficies plásticas y una morfología similar a la de los fibroblastos¹³⁶.

Inicialmente se consideró que la función de este nicho celular se limitaba a formar el microambiente requerido por las células del tejido hematopoyético^{136,137}, sin embargo, no expresan marcadores endoteliales ni hemantopoyéticos por lo cual se trataba de una población única. Además, se descubrió su capacidad mutlipotente para diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, condrocitos y adipocitos, células que forman el mesénquima del cuerpo, por lo que se les otorgó el nombre de células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (BMSC por sus siglas en inglés)^{138,139}.

Desde entonces el estudio de las células BMSC se convirtió en el foco principal para el desarrollo de la medicina regenerativa pues a diferencia de las ESC, su obtención no implica la intervención de un embrión o feto en desarrollo, y sus características troncales se han comprobado *in vivo* e *in vitro*, por lo cual su investigación se extendió rápidamente.

1.6 CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

1.6.2 Origen y localización

Se le conoce como tejido adiposo a aquel que se encuentra formado en su mayoría por células de grasa multi-funcionales o adipocitos que forman parte del tejido conectivo laxo. Se encuentra rodeando los diferentes aparatos y sistemas del cuerpo proporcionando protección.

Los adipocitos tienen la capacidad de regular procesos metabólicos y endócrinos a través de la secreción de moléculas bio-activas (adipocinas) que tienen efectos autócrinos y parácrinos permitiendo su integración funcional con células no grasas.

Los adipocitos se clasifican comúnmente de acuerdo a su color en estado vivo: blanco y pardo (aunque actualmente se cuenta con una clasificación más detallada, no se mencionará en este escrito pues no está dentro de los objetivos del proyecto) que cumplen con diferentes funciones fisiológicas.

El tipo pardo se encuentra en grandes cantidades y rodeando los órganos internos durante la etapa fetal y disminuye a lo largo de la primera década de vida variando sus cantidades de acuerdo al lugar anatómico. Los adipocitos pardos se caracterizan por presentar múltiples gotas lipídicas en su citoplasma y una alta capacidad metabólica para oxidar ácidos grasos y generar calor que contribuye a la termorregulación del cuerpo.

El tejido adiposo blanco, es el tipo predominante en el ser humano que cumple con las funciones de: almacenamiento de energía, aislamiento térmico, amortiguación y secreción de hormonas. Lo podemos encontrar en mayores cantidades debajo de la piel del abdomen, glúteos, axilas, muslos y mamas no lactantes.

El tejido adiposo es de origen mesenquimal y los adipocitos representan alrededor del 90% de su composición, el resto comprende: fibroblastos, macrófagos, pericitos, y células endoteliales vasculares. En las paredes del endotelio vascular a lo largo de las inervaciones del tejido adiposo se encuentra una población de células troncales mesenquimales (ADMSC por sus siglas en inglés) que a través de la liberación de citocinas que tienen efecto sobre los adipocitos y sobre la matriz extracelular, permiten la regeneración y mantenimiento del tejido adiposo ¹⁴⁰.

Las ADMSC se lograron aislar a partir de la fracción vascular (SVF por sus siglas en inglés) de muestras de tejido adiposo gracias al método desarrollado inicialmente por Rodbell en 1966 ¹⁴¹ mientras que su potencial troncal fue comprobado por primera vez en el 2001 por **Zuk et al** ¹⁴², quien describió su capacidad para diferenciarse a los tres diferentes linajes mesenquimales (osteocitos, condrocitos y adipocitos) ¹⁴³.

Se considera SVF al sedimento que se obtiene después de someter una muestra de tejido adiposo a una digestión enzimática con colagenasa seguida de su centrifugación, como resultado se forma un botón celular en la base del tubo, el cual comprende una mezcla heterogénea de células que conforman el tejido adiposo. Mientras tanto, los adipocitos son lisados y reducidos a vesículas de aceite que tienden a flotar sobre la superficie por lo cual se pueden separar fácilmente para retener la fracción estromal **[Fig. 8]** ^{140,144}.

La SVF está compuesta por aproximadamente 37% leucocitos (CD45⁺), 35% ADMSC (CD31⁻, CD34⁺, CD45⁻), 15% células endoteliales (CD31⁺, CD34⁺, CD45⁻) y otras células (CD45⁻, CD31⁻, CD34⁻). Se tiene reporte de que dentro de 200ml de

tejido se obtienen alrededor de 0.1-1 billones de células nucleadas de las cuales al menos 10% corresponden a ADMSC. El rendimiento depende del estado físico de la muestra a procesar, pues los lipo-aspirados obligan al tejido a pasar a través de una delgada cánula que provoca la disrupción de los capilares sanguíneos y las investigaciones han demostrado que su abundancia relativa disminuye hasta en un 50% en comparación con las muestras sólidas, las cuales involucran la remoción de la piel junto con el tejido adiposo y de esta manera se previene la degeneración del tejido¹⁴⁰.

La densidad de ADMSC obtenidas por gramo de tejido también varía entre especies⁴⁷, como referencia se tienen algunos estudios en ratones que han mostrado que existe una mayor densidad de ADMSC en el tejido adiposo blanco que en el pardo, además de presentar un fenotipo diferente. Se ha observado que dentro del tejido blanco, el rendimiento de aislamiento del tejido subcutáneo ha sido mayor en comparación con el visceral.

Las ADMSC obtenidas a partir de abdominoplastías han demostrado un alto grado de plasticidad pues además de diferenciarse a linajes mesenquimales comunes, se han logrado obtener fenotipos neuronales y cardiacos que sugieren un potencial pluripotente^{143,145,146}.



Figura 8. Procesamiento de una muestra de lipoaspirado para obtener ADMSC

Gimble JM, et al 2007

1.6.3 Características moleculares

La Asociación Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció una serie de criterios estándar para identificar células multipotentes mesenquimales estromales, dentro de las cuales se incluyeron:

- Capacidad de adherirse a la superficie y crecer en monocapa
- Expresión de los marcadores: CD105, CD73 y CD90
- La ausencia de marcadores hematopoyéticos como: CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR
- Capacidad para diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos^{147,148}

Comparaciones directas entre el inmuno-fenotipo de ADMSC y BMSC han revelado que existe un 90% de similitud entre éstas. Aunque las investigaciones en ADMSC han encontrado perfiles de expresión en función del tiempo de cultivo, una de las moléculas que ha variado constantemente es CD34 presente únicamente en fases tempranas de células obtenidas a partir del tejido adiposo y ausente en BMSC^{144,146}.

1.6.4 Potencial terapéutico para la reparación de heridas en la piel.

Las células troncales, poseen una capacidad intrínseca para secretar factores de crecimiento y citocinas que actúan de manera parácrina sobre células circundantes, puede estimular las poblaciones celulares residentes del tejido receptor y promover la activación o inhibición de ciertas vías de señalización, así como el reclutamiento de células troncales endógenas al sitio de reparación promoviendo su diferenciación al linaje requerido y de esta manera promover y acelerar la respuesta al daño¹⁴⁹⁻¹⁵².

Las ADMSC son una de las poblaciones troncales adultas más prometedoras en el área de la medicina regenerativa gracias al conjunto de beneficios que ofrecen, los cuales incluyen:

- El proceso de aislamiento es relativamente sencillo. La muestra biológica se obtiene fácilmente a través de un proceso quirúrgico estético rutinario no

invasivo al que se someten muchas personas diariamente y por lo tanto, causa muy pocas molestias al donante.

- Ofrecen un alto rendimiento. El proceso de aislamiento es sencillo y se pueden obtener al rededor 5,000 cel/g de tejido, teniendo en cuenta que de un solo lipo-aspirado se pueden obtener alrededor de 3 L, posiciona al tejido adiposo como un recurso con mayor viabilidad en comparación con las células troncales provenientes de médula ósea en donde únicamente se extraen de 100-1000 cel/g y la disponibilidad de tejido a extraer, es mucho menor pues existen una serie de riesgos en términos clínicos ¹⁵³
- Poseen propiedades inmuno-reguladoras. Las ADMSC tienen la capacidad de poder evadir al sistema inmunológico a través de mecanismos que aún no se conocen completamente, pero se ha comparado muchas veces con el sistema de evasión de las células tumorales.

En ambientes inflamatorios son capaces de secretar factores solubles inmuno-reguladores como: IL-10, IL-6, IL-8, TGF β -1, HGF, PGE,IDO y galectinas entre otros; y moléculas de membrana como: HLA-G1, PD-L1, ICAM-I, VCAM-I y Jagged-I. Bajo condiciones no inflamatorias, las MSC carecen de moléculas de MHC II además de la ausencia de moléculas co-estimuladoras como: CD40, CD80, CD86 importantes para la activación de linfocitos T.

Todas estas propiedades que en conjunto tienden a disminuir la respuesta inmunológica pues regulan la diferenciación, maduración y activación de células del sistema inmune como células dendríticas, células NK, promueven la diferenciación de linfocitos T poblaciones anti-inflamatorias (Th2 Y Treg) mientras disminuyen la de linfocitos CD4⁺, CD8⁺, Th1 y Th17¹⁵⁴⁻¹⁵⁷.

Las numerosas investigaciones acerca de las características de las ADMSC que pueden ser aplicadas con fines terapéuticos, han logrado comprobar algunos de los mecanismos de acción como alternativa terapéutica para el tratamiento de heridas, demostrando que tienen la capacidad para promover la migración celular, angiogénesis e inhibir la formación de cicatrices hipertróficas^{149,158-160}.

Las ADMSC regulan el proceso de reparación de la piel mediante mecanismos diferentes **[Fig.9]** :

- Efectos parácrinos. Las ADMSC secretan factores de crecimiento como: VEGF, KGF, FGF, PDGF, HGF, TGF- β , los cuales estimulan fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales. La secreción de citocinas anti-inflamatorias regulan la respuesta inmunológica. Como resultado final se ha observado un aumento en el grado de epitelización, la formación del tejido granuloso y la de nuevos capilares sanguíneos, que mejoran tanto la apariencia estética como el funcionamiento del neo-tejido.
- Trans-diferenciación. Se refiere a la diferenciación directa a células de la piel que se requieren para la reconstrucción del tejido afectado como células epiteliales, queratinocitos y fibroblastos.

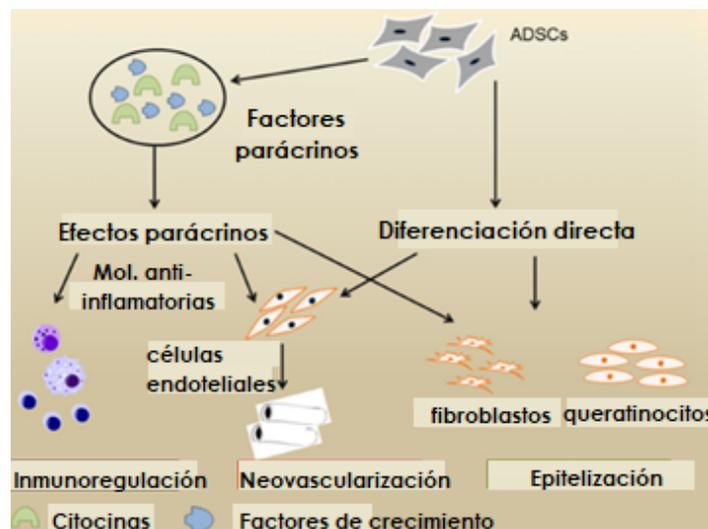


Figura 9. Mecanismos de acción de las ADMSC en la reparación de la piel. Las propiedades de las ADMSC para liberar citocinas y factores de crecimiento permite el estímulo de células endógenas del tejido dañado, promoviendo procesos como: la neovascularización y la epitelización mientras regula la respuesta inflamatoria mediante la secreción de moléculas anti-inflamatorias. Otro posible mecanismo de acción es la diferenciación directa a células de la piel como fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales.

Wagar UI Hassan, 20014

1.7 INGENIERÍA DE TEJIDOS Y MEDICINA REGENERATIVA

Para definir medicina regenerativa (RM) citaré el concepto de A.S Daar (2007); en donde la define como un campo interdisciplinario de la investigación y su aplicación clínica, enfocado en la reparación, reemplazo o regeneración de células, tejidos y órganos para restablecer su correcto funcionamiento como resultado de cualquier causa, incluyendo defectos congénitos, enfermedades, traumas en general y envejecimiento. Para ello usa la combinación de diferentes tecnologías disponibles

como: moléculas solubles, terapia génica, terapia con células troncales, ingeniería de tejidos, la reprogramación celular o la combinación de los anteriores^{161,162}.

La ingeniería de tejidos (TE) es considerada como un área dentro de la RM y se define como: aquella ciencia interdisciplinaria que aplica los principios y métodos de la bioingeniería, materiales y sustitutos biológicos para el mantenimiento, reestablecimiento y mejoramiento de las funciones de los tejidos dañados. La TE involucra la combinación de células vivas y andamios ya sean naturales o sintéticos que permitan la formación de constructos tridimensionales funcionales estructural y mecánicamente de igual o mejor forma que el tejido a reemplazar^{162,163}.

En otras palabras, la ME pretende lograr la diferenciación de las ADMSC en células de la piel dañada con efectos de reparación y para ello se requiere de los lineamientos establecidos por la ingeniería de tejidos que permita la evaluación del potencial terapéutico de las ADMSC.

El desarrollo de dicho constructo requiere de la cuidadosa selección de los elementos requeridos:

- ✓ Andamio
- ✓ Factores de crecimiento
- ✓ Matriz extracelular
- ✓ Células

Para llevar a cabo el diseño del constructo con posible aplicación terapéutica, se deben de tomar en cuenta los requerimientos metabólicos y biomecánicos del tejido a reemplazar. Para ello se debe establecer un protocolo que evalúe las propiedades biofísicas y mecánicas del material que se pretenda utilizar, tomando en cuenta las propiedades biológicas y biomecánicas intrínsecas del tejido nativo así como el microambiente al que se encontrará expuesto el constructo una vez implantado. Finalmente, se puede definir el éxito funcional del tejido antes y después de la aplicación del constructo¹⁶².

1.7.2 SUSTITUTOS DE PIEL DESARROLLADOS POR TE

Los sustitutos de piel son una solución eficaz inicialmente para proteger heridas profundas de la piel. Se refieren a un conjunto de materiales heterogéneos desarrollados por la TE que tienen la capacidad de reemplazar las funciones de la piel ya sea temporal o permanentemente mientras colaboran con el reestablecimiento del tejido después de sufrir un daño.

Los sustitos de piel se pueden clasificar como se muestra en la tabla 1.

Características	Tipo de sustituto
ORIGEN	-Biológico -Sintético (Biodegradable o no)
DURACIÓN	-Temporal -Permanente
ESTRUCTURA ANATÓMICA	-Epidérmico -Dérmico -Mixto o compuesto
COMPOSICIÓN	-Celular -Acelular

Tabla 1 Clasificación de los sustitutos biológicos

1.7.3 BIOMATERIALES UTILIZADOS EN LOS SUSTITUTOS CUTÁNEOS

La ingeniería de tejidos busca diseñar andamios celulares que mimeticen el funcionamiento de la matriz extracelular natural del tejido, pues es la superficie que permite mantener la homeóstasis, guiar el desarrollo y dirigir la regeneración. Por estas razones se ha explorado el empleo de proteínas que permitan esta semejanza.

La selección de biomateriales es crucial para el desarrollo de un constructo biológico. Idealmente un buen material tendría que cumplir con ciertas características importantes como: no ser tóxico, ser bio-compatible, promover procesos celulares favorables y que posea propiedades físicas y químicas adecuadas; Hubbell JA (2003) añadió que hay que tomar en cuenta la susceptibilidad proteolítica, la habilidad de unirse a factores de crecimiento y la bioadhesividad^{163,164}.

Como se observa en la figura 11 una de las clasificaciones de los sustitutos biológicos se refiere al origen del material empleado para el constructo y se han dividido en biológicos y sintéticos.

Dentro de los materiales biológicos encontramos:

- ✓ Colágena
- ✓ Gelatina
- ✓ Fibrina
- ✓ Elastina
- ✓ Ácido hialurónico
- ✓ Quitosano
- ✓ Sílica

Y como algunos ejemplos de materiales sintéticos podemos mencionar:

- ✓ Ácido poligálico (PLGA)
- ✓ Poli ϵ coprolactona
- ✓ Poli glicol etileno
- ✓ Poliuretano

1.7.4 COLÁGENA COMO MATERIAL BIOLÓGICO

Uno de los materiales biológicos más populares utilizado como soporte de crecimiento para constructos biológicos es la colágena. Su éxito se atribuye a que es una proteína muy abundante y natural de la piel que a través de sus secuencias Arg-Gly-Asp (RGD) reconoce receptores superficiales en las células permitiendo su anclaje y con ello el desarrollo del microambiente requerido. Las propiedades de la colágena varían según su origen, pero generalmente conserva su capacidad para formar entrecruzamientos, característica que confiere propiedades mecánicas relevantes, como fuerza de tensión^{165,166}.

Uno de los inconvenientes de este biomaterial es que tiende a encogerse en medios acuosos, lo cual puede interferir con su actividad terapéutica. Por ello se han desarrollado diferentes técnicas de secado y entrecruzamiento basadas en métodos químicos, enzimáticos o el empleo luz UV; los cuales favorecen su integridad y estabilidad; como una opción alterna, surgió el empleo de otros biomateriales como: condritina 6 sulfato, ácido hialurónico, quitosano, etc, que al mezclarlos refuerzan sus propiedades.

Los sustitutos comerciales disponibles, normalmente utilizan colágena de origen bovino, piel porcina, intestino, mucosa de vejiga, cola de rata y pescado. Una vez obtenida esta se puede hacer parte del andamio a través de procesos como: liofilización, electro-centrifugación y bio-impresión^{166,167}. Como ejemplo de algunos sustitutos comerciales que emplean colágena en diferentes presentaciones y condiciones se encuentran: Kollagen®, Integra®, Metriderm®, Ez Derm®, Terudermis®, Apligraf®, OrCell®, entre otros.

La gelatina es una forma desnaturalizada de colágena obtenida a través de la hidrólisis de colágenas fibrosas, en consecuencia, la gelatina está compuesta principalmente por prolina, glicina e hidroxiprolina. Gracias a que se caracteriza por retener sus propiedades químicas pero con una mayor solubilidad, este material se ha añadido a diferentes biomateriales con el fin de potenciar las interacciones del

andamio con las células. Otra ventaja es su bajo potencial antigénico, lo cual es muy importante al momento de su aplicación además del riesgo de contraer infecciones cruzadas pues se trata de un material inocuo.

1.7.5 EMPLEO DE MODELOS ANIMALES EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

A pesar de los avances que se han logrado dentro del área de biomateriales y el desarrollo de tecnología como las impresiones 3D, el estudio de procesos complejos como la reparación de la piel, requieren de modelos *in vivo* que permitan simular las condiciones biológicas naturales y de esta forma refleje una respuesta ante el estímulo creado, y de esta forma evaluar el potencial o eficacia de nuevas terapias.

Encontrar modelos animales resulta complicado pues los experimentos *in vivo* suelen representar altos costos y sin embargo no elimina el rango de error debido a las diferencias entre estos organismos y el hombre. Algunos de los modelos animales empleados para el desarrollo de sustitutos de la piel son: ratón, rata, puerco de guinea y puerco común.

Especie	Ancho (mm)	Densidad de folículos pilosos	Anclaje de la piel	Mecanismo de reparación
Humano	2.97	Baja	Estrecho	Re-epitelización
Cerdo de Guinea	1-2	Alta	Ausente	Contracción
Ratón	0.7	Alta	Ausente	Contracción
Rata	2.09	Alta	Ausente	Contracción
Cerdo doméstico	2.5	Baja	Estrecho	Re-epitelización

Tabla 2 Comparación de las propiedades de modelos *in vivo* para el estudio de la reparación de la piel

La tabla resume las características de la piel de cada uno de los modelos y se puede observar la similitud del cerdo con el humano. La piel en ambos organismos se encuentra firmemente anclada al tejido subcutáneo, la profundidad de la epidermis en los humanos varía entre los 20-120 μm , mientras que la del cerdo va de 30-140 μm y se caracteriza por la ausencia de glándulas ecrinas¹⁶⁸. Además de las características anatómicas también comparten aspectos fisiológicos comunes como el sistema inmune, la irrigación vascular del tejido y la re-epitelización como mecanismo de reparación de heridas¹⁶⁹.

Los modelos porcinos han sido ampliamente usados en el área de investigación para el tratamiento de enfermedades infecciosas¹⁷⁰, el impacto de la exposición a rayos UVB¹⁷¹, quemaduras¹⁷², reparación de heridas^{173,174}, incluso el estudio de células troncales⁵⁶, entre otras.

1.8 PIEL PORCINA RADIO-ESTERILIZADA

En el Banco de tejidos radio esterilizados del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) se procesa la piel de cerdo con el fin de obtener apósitos biológicos. La piel es obtenida de animales sanos en una planta de sacrificio y posteriormente es trasladada al banco de tejidos, en donde se limpia, se desinfecta y se corta en láminas. Una vez lista, la piel es empaquetada y se envía a la Planta de irradiación gamma del ININ para esterilizarla. Los apósitos irradiados son almacenados en el BTR y a través del control de calidad interno, se verifica que todo el proceso se llevó a cabo bajo los lineamientos establecidos y finalmente se envían a los hospitales o institutos en donde son utilizados en el tratamiento de pacientes con heridas difíciles de sanar.

2.OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un cocultivo de fibroblastos (HF) y células troncales mesenquimales (ADMSC) sobre un andamio biocompatible y evaluar la producción de moléculas que participan en el proceso de reparación de heridas en la piel

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener y caracterizar fibroblastos humanos dérmicos (HF)
2. Obtener células troncales mesenquimales derivadas de remanentes de tejido adiposo humano (ADMSC)
3. Estandarizar el cocultivo de ADMSC y HF sobre piel de cerdo radio-esterilizada (PPR) como andamio biocompatible.
4. Evaluar la liberación de bFGF, VEGF, EGF
5. Evaluar la expresión de Col I y III

3. ANTECEDENTES

La piel es una barrera protectora multifuncional de gran importancia, las heridas graves en este órgano pueden llegar a causar secuelas importantes sobre la salud e incluso la muerte. La reparación correcta de la piel depende de diferentes tipos celulares imprescindibles para la cicatrización de la herida, sin embargo por diferentes razones esta capacidad puede verse comprometida bajo diferentes circunstancias como: quemaduras profundas, una gran extensión de piel pérdida, úlceras crónicas, etc; difíciles de repararse por sí solas¹⁷⁵.

Este tipo de heridas representa uno de los problemas médicos y sociales más complicados debido a que la condición del paciente generalmente es muy vulnerable y dolorosa. El correcto tratamiento suele ser caro pues requiere de periodos largos de hospitalización y el empleo de productos sofisticados como sustitutos de piel, coberturas temporales, medicamentos, etc, que incrementan el costo.

El desarrollo de la ingeniería de tejidos en este sentido, se ha enfocado en la búsqueda de diferentes recursos biológicos y/o sintéticos que en conjunto promuevan la reparación de heridas en la piel con diferentes etiologías difíciles de tratar.

Un material biológico celular ideal para su uso terapéutico tendría que cumplir con los siguientes criterios:

- Se encuentra en grandes cantidades (de millones a billones)
- Se pueden obtener a partir de un procedimiento poco invasivo
- Tiene la capacidad para diferenciarse a múltiples linajes celulares de forma controlada y reproducible
- Puede ser transplantedo de manera efectiva al paciente, ya sea de forma autóloga o alogéna
- Puede ser producido de acuerdo a la guía actual de buenas prácticas de manufactura¹⁷⁶.

Las células troncales mesenquimales son una población quiescente que se ha caracterizado e identificado en distintos tejidos adultos como aquellas provenientes de la médula ósea, sin embargo, el procedimiento para obtenerlas es un requiere de anestesia local para la obtención de una biopsia de <10ml a través de una incisión en la piel y la penetración de una jeringa en el hueso ya sea de las crestas iliacas, el esternón o el fémur.

Según diferentes estudios después del procedimiento clínico el paciente tiene que mantener seca el área por al menos 48hrs y un chequeo frecuente, pues dentro de los riesgos se pueden derivar: hemorragias, dolor persistente, reacciones anafilácticas y fracturas en el área de la biopsia ¹⁷⁷.

Las ADMSC en comparación con las BMSC se pueden obtener de forma muy sencilla pues además de ser un tejido abundante en el cuerpo humano es considerado un “tejido de desecho” cuando proviene de cirugías estéticas. Según la Isaps (International Society of Aesthetic Plastic Surgery) México ocupa la cuarta posición en cirugías estéticas realizadas a nivel mundial, dentro de las cuales la liposucción es la segunda más popular con alrededor de 1,573,680 intervenciones en el 2017¹⁷⁸.

Por lo tanto, hablamos de un recurso con alta disponibilidad, que se puede aprovechar para la obtención de células troncales mesenquimales útiles en el campo de la medicina regenerativa. Dentro de sus ventajas biológicas se encuentran:

- Se pueden obtener de 100-1000 células por gramo de tejido
- Son estables en cultivo *in vitro* a largo plazo (conservan un cariotipo diploide hasta 100 veces la duplicación del número inicial de la población)
- Su capacidad proliferativa es similar a la de las BMSC (de 40 a 120h desde la fase log hasta el crecimiento)
- Tienen propiedades inmuno-reguladoras que tienden a disminuir la inflamación¹³³

En un artículo publicado por Sánchez S y colaboradores en el 2015, se reportó por primera vez el empleo de piel porcina radio-esterilizada (PPR) como andamio para el crecimiento de células ADMSC.

En este trabajo se evaluó la viabilidad, adhesión, proliferación y migración de dos andamios diferentes: amnios (RHA) y piel porcina (RPS). La **[Fig.10]** muestra los resultados obtenidos en esta investigación en donde se concluyó que la piel porcina radio-esterilizada es capaz de mantener una viabilidad celular por arriba del 90% además de mantener el perfil proliferativo de las células, lo que sugiere que la PPR tiene un gran potencial para ser empleada como andamio para la generación de sustitutos biológicos de piel¹⁵⁴.

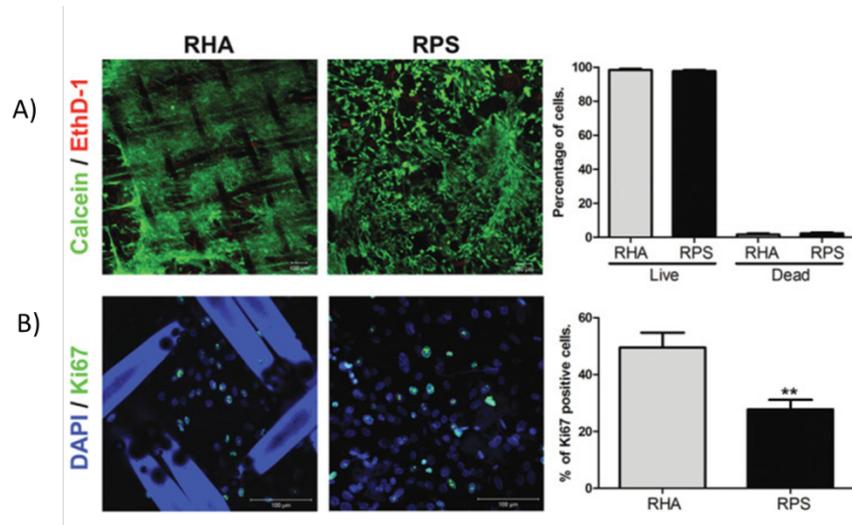


Figura 10. ADMSC sembradas sobre amnios humano (RHA) y piel porcina radio-esterilizada (RPS). A) Ensayo de viabilidad por calceína (verde) y homodímero de etidio (rojo). B) Ensayo de proliferación por detección del Anti- α -Ki67 (verde), los núcleos se muestran en azul (DAPI)

Sánchez S, et al, 2015

La piel porcina se ha empleado popularmente como una cobertura temporal de heridas ya que se trata de un recurso accesible económicamente y sencillo de manipular además de que mantiene la humedad del tejido pues evita la pérdida de líquidos y al mismo tiempo reduce el riesgo de infecciones.

Los resultados anteriormente mostrados [Fig. 10] sugieren que la PPR podría resultar en un excelente andamio biológico a un bajo costo comparado con los que existen actualmente, para el desarrollo de un constructo biológico, que ofrezca una ECM natural con una composición similar a la piel humana que optimice la interacción entre fibroblastos y ADMSC para en conjunto, favorecer procesos asociados a la reparación de heridas en la piel.

4. HIPÓTESIS

La combinación del cocultivo de HF y ADMSC con el empleo de PPR como andamio biocompatible regulará la liberación de factores de crecimiento y la expresión de proteínas de matriz extracelular como resultado de su interacción, este constructo podría resultar relevante para el estudio y tratamiento de heridas cutáneas.

5.METODOLOGÍA

5.1 Obtención de muestras

Para el desarrollo del presente trabajo se obtuvieron muestras de piel y tejido adiposo a partir de lipoplastías provenientes de pacientes sanos (hombres y mujeres) entre los 20 y 50 años, con previa firma de conocimiento informado.

Las muestras se transportaron de diferentes hospitales al laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) que pertenece al Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). Para ello, se colocaron en contenedores esterilizados con medio de cultivo DMEM (*Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium*) libre de suero y 10% de Antibiótico-Antimicótico (*Gibco Antibiotic-Antimycotic 100X*).

5.1.2 Aislamiento de fibroblastos

A partir de la dermis de las biopsias, se obtuvieron cultivos primarios de fibroblastos por el método de digestión enzimática. Esta técnica se basa en el empleo serial de dos enzimas: la primera separa la epidermis de la dermis y la segunda disgrega las células de la dermis por su capacidad para degradar colágena.

Las biopsias fueron procesadas dentro de una campana de flujo laminar (Thermo Scientific 1300 series A2) para conservar su esterilidad. Una porción de la muestra fue transferida a una caja Petri y se le agregó un poco de medio de cultivo para mantener su humedad. El tejido adiposo de las biopsias fue retirado mecánicamente empleando tijeras y pinzas de disección y para facilitar el acceso de la enzima al tejido, se le hicieron cortes verticales delgados, obteniendo una forma de "falda hawaiana". La muestra se colocó en un tubo falcon de 50 ml y se sometió a una serie de 3 lavados por inmersión vigorosa con 20 ml de PBS 1X (Gibco R) y 10% de A.A (100X) cada uno para eliminar cualquier resto de tejido adiposo y sanguíneo.

5.1.3 Separación de las capas epidérmicas

Se preparó una solución de dispasa II (0.5U/mg, Gibco Dispase) para lo cual se agregaron 3mg a 10ml de PBS 1X, la solución se hizo pasar por un filtro de 0.22 μ previo a su uso. La solución de dispasa fue añadida al tubo de la muestra y se mantuvo en un agitador orbital a una temperatura de 37°C por aproximadamente 1:30 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se puede observar a simple vista la separación de las capas dérmica (un tejido blanco grueso) y epidérmica (tejido fino color pardo), en el caso de que las capas no se hayan separado por sí solas, la muestra fue colocada nuevamente en una caja Petri y separada mecánicamente usando pinzas de relojero.

5.1.4 Procesamiento del tejido dérmico

El tejido dérmico fue colocado en una caja Petri para ser disgregado mecánicamente con la ayuda de pinzas y tijeras de disección. Los fragmentos dérmicos fueron colocados en un tubo falcon de 50 ml y al cual se le agregaron 10ml solución de HBSS (Solución salina equilibrada de Hank's) (Gibco) con 1% de colagenasa tipo II⁴ (Worthington Biochemical Corporation). El tubo se colocó en un agitador orbital a 210rpm durante 24 horas a 37°C.

⁴ La colagenasa tipo II es una enzima purificada a partir de la bacteria *Clostridium histolyticum*, que tiene la capacidad de degradar las uniones entre las triple hélices que conforman las colágenas solubles e insolubles sin dañar las células.

Cultivo de fibroblastos para su expansión

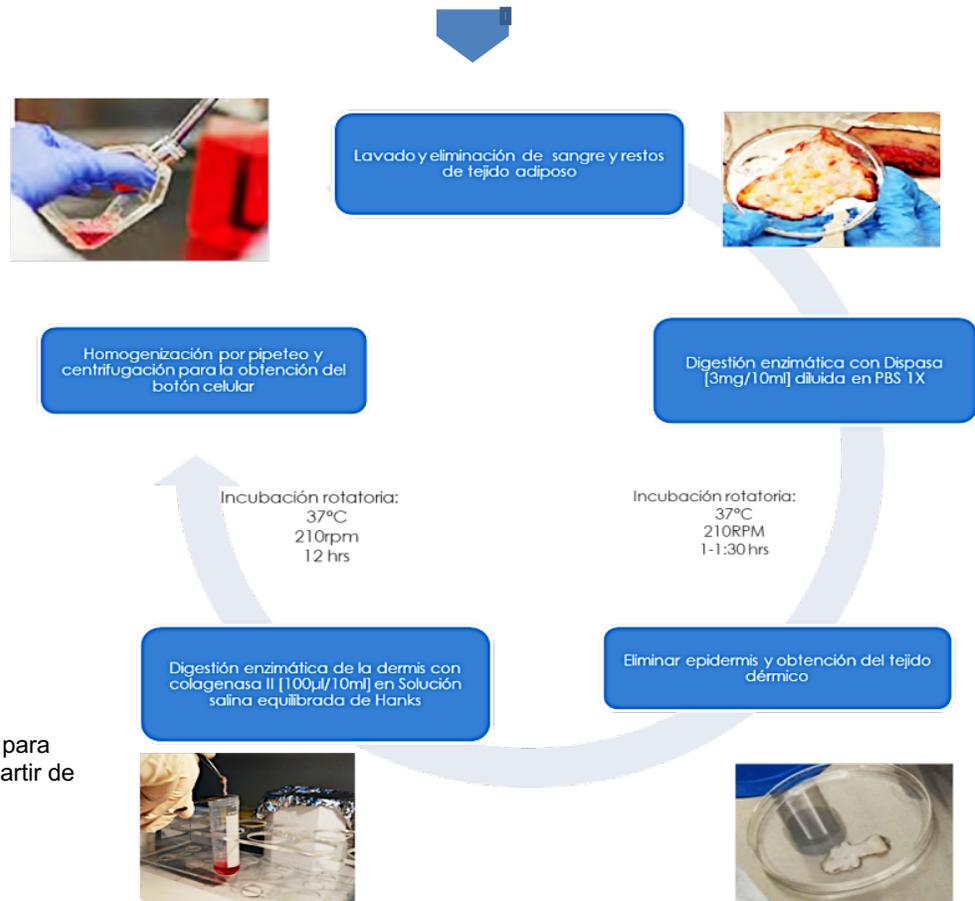


Figura 11. Protocolo para obtener fibroblastos a partir de biopsias de piel.

5.1.5 Siembra de cultivos primarios de fibroblastos dérmicos

Después de 24 horas de digestión enzimática se obtuvo una solución densa, viscosa y blanquecina, la cual se hizo pasar por un filtro de 70 µM. A la solución filtrada se le agregó un volumen equivalente de medio suplementado (DMEM + 1% A.A) con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco). El tubo se sometió a centrifugación a 1500rpm durante 5 minutos para obtener un botón celular. El sobrenadante fue desechado y el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio suplementado y se continuó con el conteo celular.

Con una micropipeta se tomó una alícuota de 10 µl del stock y se mezcló con 10 µl de azul tripano, la solución fue colocada en una cámara de Neubauer y se hizo el conteo y los cálculos correspondientes para sembrar a una densidad de 10,000 cel/cm² en cajas de cultivo de 75 cm². Los cultivos se mantuvieron en medio suplementado a 37 °C en una incubadora (Nuair, Auto flow, NU-4750) humedad relativa del 95% y 5% de CO₂ (condiciones estándar). Para el mantenimiento y

expansión de los cultivos se cambió el medio cada tercer día y se hicieron subcultivos por tripsinización cuando la confluencia se encontraba entre el 80 y 90%.

5.1.6 Inmunofluorescencia de fibroblastos dérmicos

- Tripsinización de células

Las células fueron desprendidas de la caja de cultivo, para ello, se retiró el medio por decantación y se les agregó 1 ml de PBS 1X para hacer 2 lavados haciendo movimientos circulares suaves. Después de los lavados, se les añadió una solución de tripsina-EDTA al 0.25% (1X, Gibco) diluida en PBS 1X (2-3:5) y se mantuvo por 7-10 min dentro de la incubadora. Una vez que las células se encontraban en solución, el contenido fue transferido a un tubo falcon de 15 ml para centrifugarse y obtener el botón celular el cual se resuspendió en 1 ml de DMEM libre de suero y se realizó el conteo celular para hacer los cálculos necesarios y obtener la cantidad total de células requeridas para el ensayo correspondiente.

- Siembra del ensayo

Se tomaron 5×10^5 células del stock obtenido y se sembraron 9 pozos con 50,000 células cada uno en una placa de 96. Se les agregaron 50 μ l de medio suplementado y se dejaron incubando bajo las condiciones estándar durante 24 horas.

- Protocolo de inmunofluorescencia

Al día siguiente la placa se sacó de la incubadora y con una micropipeta se retiró el medio (condiciones no estériles) y se hicieron 3 lavados con PBS 1X para eliminar los restos de medio de cultivo. Posteriormente las células se fijaron con 200 μ l PFA (paraformaldehído) al 4% a temperatura ambiente (TA) por 10 min. y después se lavaron nuevamente 2 veces con PBS 1X. Las células fueron permeabilizadas con 20 μ l de 0.1% de Tween diluido en PBS 1X (PBST) por 30 minutos a TA. Se retiró la solución permeabilizante y se hicieron 3 lavados con PBS 1X para después añadir la solución de bloqueo (PBS 1X, 0.1% Tween y 2% SFB) la cual se dejó actuar por 30 minutos a TA. Se procedió a retirar la solución de bloqueo y agregar el anticuerpo primario (Ab) anti-proteína de superficie de fibroblastos humanos (clona 1B10 Sigma no. F4771) diluido en solución de bloqueo en una proporción 1:150. La placa se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se retiró el Ab primario e inmediatamente se hicieron 3 lavados de 20 min con PBS 1X manteniendo la placa en un agitador orbital a TA. Después se añadió el Ab secundario FITC- α -mouse diluido en PBST con 8% BSA en una

proporción 1:200. La placa se envolvió en papel aluminio para evitar el contacto con la luz y se incubó por 2 horas a TA. Se retiró la Ab secundario y se hicieron 3 lavados con PBS 1X por 20 min cada uno manteniéndose en agitación orbital suave a TA. Finalmente los pozos se incubaron con DAPI (Merck, 25mg/ml) por 5 min a TA, se hicieron 3 lavados con PBS 1X y las células se observaron en un microscopio de fluorescencia vertical (ZEISS AXIO).

- Análisis de la inmunofluorescencia

El porcentaje de la expresión de 1B10 se determinó por conteo de las células positivas y negativas observadas en una fotografía representativa de cada cultivo de las cuales se obtuvo un solo promedio y se graficaron los datos (ANEXO 1).

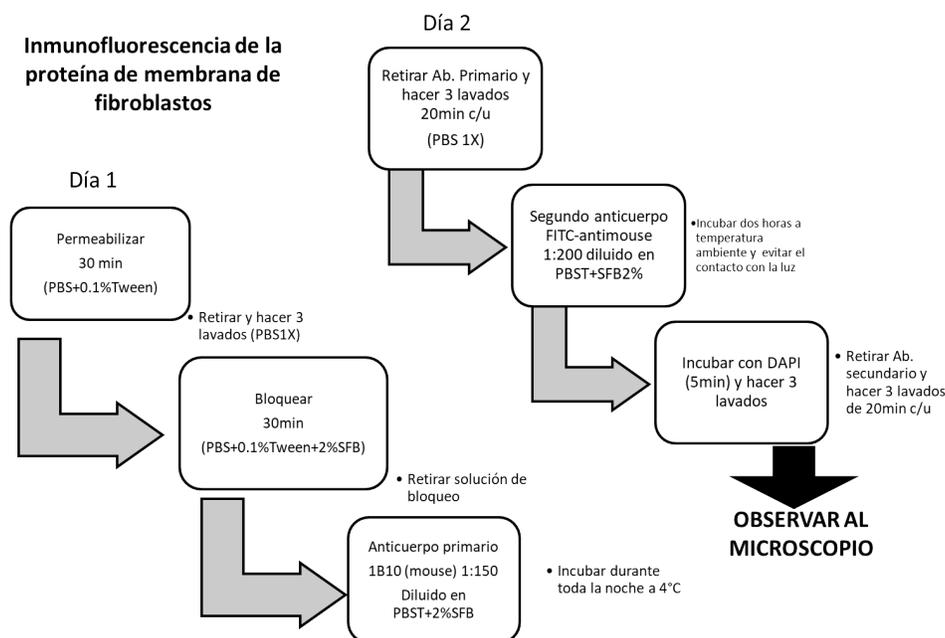


Figura 12. Inmunofluorescencia de 1B10 en fibroblastos

5.2 Aislamiento de ADMSC

Para el aislamiento de células troncales mesenquimales de tejido adiposo (ADMSC), se implementó la técnica inicialmente establecida por Martin Rodbell (1964) cuyo protocolo fue ajustado y estandarizado en el laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ), y que bajo la dirección del Dr. Roberto Sánchez S. se publicó un artículo

en el 2015 (ANEXO 2-3) que demuestra la identidad de las células obtenidas por este protocolo que a continuación se explica.

Como se mencionó anteriormente, las muestras fueron donadas por pacientes de lipoplastías y transportadas al INR, una vez dentro del laboratorio se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento (no mayor a 2 días después de su obtención).

Las muestras se trabajaron en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar, de la biopsia total se tomó solo una fracción de aproximadamente 20 mg de tejido adiposo el cual se colocó en una caja Petri y se lavó de 2-5 veces con PBS 1X y 1% A.A hasta haber eliminado la mayor cantidad de sangre.

Una vez limpio el tejido, se procedió a su disgregación mecánica empleando tijeras y pinzas de disección hasta obtener fragmentos pequeños que se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml y al cual se le agregó una solución al 1% de colagenasa tipo 2 (Worthington Biochemical Corporation) diluida en 10 ml de DMEM libre de suero. El tubo fue incubado a 37°C en agitación constante 250-270 rpm por aproximadamente 40-60 min. Una vez transcurrido el tiempo se le agregaron 10 ml de medio suplementado para desactivar la enzima.

En el tubo se puede distinguir a simple vista una fase acuosa, la cual se retiró con una pipeta de 10 ml y se hizo pasar por un filtro de 70 µm; el contenido se recolectó en un nuevo tubo el cual se centrifugó a 1500 rpm por 5 min para obtener el botón celular. El sobrenadante fue desechado y el botón se resuspendió en 1ml de medio suplementado y se continuó con el conteo celular.

5.2.2 Siembra de cultivos primarios de ADMSC

Con una micropipeta se tomó una alícuota de 10µl del stock celular aislado y se mezcló con 10 µl de azul tripano, la solución fue colocada en una cámara de Neubauer y se hizo el conteo y los cálculos correspondientes para sembrar a una densidad de 10,000 cel/cm² en cajas de cultivo de 25 cm². Los cultivos se mantuvieron en medio suplementado con 15% de SFB a 37 °C en una incubadora (Nuair, Auto flow, NU-4750) humedad relativa del 95% y 5% de CO₂.

Para el mantenimiento y expansión de los cultivos se cambió el medio cada tercer día y se hicieron subcultivos cuando la confluencia se encontraba entre el 80 y 90%.

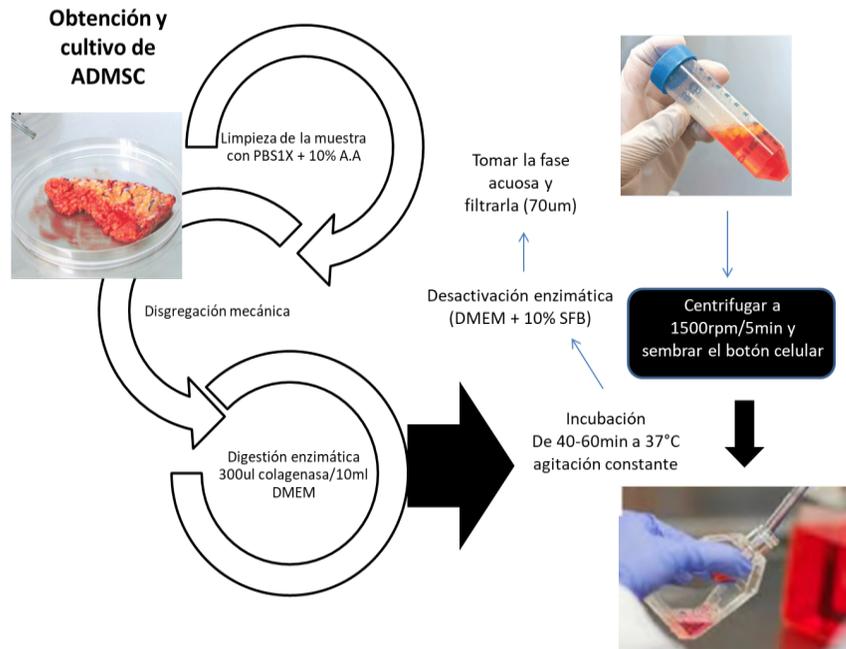


Figura 13. Protocolo para el aislamiento de ADMSC

5.3 Generación de cocultivo sobre PPR

5.3.2 Marcaje de células

Los cultivos primarios de fibroblastos y ADMSC se expandieron para obtener la cantidad de células requeridas (para la generación del cocultivo se emplearon células no mayores al pase 5).

Con la finalidad de distinguir las poblaciones celulares y poder observar su presencia sobre el andamio, las células se tiñeron con diferentes marcadores fluorescentes. Los fibroblastos fueron marcados con CellTracker™ color verde (*Green CMFDA diacetato de 5-clorometilfluoresceína*) y MitoTracker (*Thermo Fisher*) color rojo para las ADMSC.

Para ello se obtuvo una alícuota con la cantidad total de células requeridas para el ensayo, las cuales se colocaron en un tubo eppendorf de 1 ml y se resuspendieron en la cantidad de medio DMEM libre de suero necesario para completar un volumen de 500 μ l y al cual se le añadieron 2 μ l del marcador correspondiente (CellTracker para fibroblastos y MitoTracker para ADMSC). Las células fueron incubadas según las indicaciones del proveedor: 20-30', 37°C (CellTracker), 5', 37°C y 15' a 4°C (MitoTracker).

Una vez transcurrido el tiempo indicado, se removió la solución de tinción mediante centrifugación y se agregaron 250 μ l de medio fresco libre de suero a cada tubo, las células en suspensión se pipetearon suavemente con la finalidad de lavar el exceso de solución marcadora este paso se repitió dos veces y después del segundo lavado, las células fueron resuspendidas en la cantidad de medio requerido para la siembra del cocultivo.

5.3.3 Obtención y preparación del andamio biocompatible

La PPR fue empleada como apósito biocompatible para la siembra del cocultivo de HF y ADMSC. La PPR se obtuvo en el ININ (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares); consiste en una hoja delgada de fácil manipulación empaquetada estérilmente. En la PPR se puede distinguir la cara epidérmica (rasposa) y la dérmica (lisa).

La manipulación de la PPR se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar para mantener su esterilidad. Con el fin de obtener diferentes apósitos para el experimento, se marcaron (sobre la cara epidérmica) y cortaron círculos de 2 cm de diámetro con el uso de lápiz de grafito y tijeras de disección (material previamente esterilizado). Estos apósitos se colocaron sobre la base de los pozos de una placa de 12 **[Fig.14]**.

5.3.4 Siembra de células sobre el andamio

De acuerdo a los objetivos del proyecto, se contemplaron 6 diferentes condiciones experimentales por duplicado: HF sembrados sin andamio (HF), fibroblastos sembrados sobre el andamio (HF/PPR), ADMSC sembradas sin andamio (ADMSC), ADMSC sembradas sobre el andamio (ADMSC/PPR), cocultivo sin andamio (ADMSC/HF) y cocultivo sobre el andamio (ADMSC/HF/PPR) **[Fig.14]**.

Tanto para las células solas como en cocultivo, se sembraron a una densidad total de 1×10^6 por pozo, en el caso del cocultivo fue en una proporción 1:1. Para ello, la cantidad total de células (500×10^3 por línea celular en el cocultivo) se resuspendieron en 20 μ l de medio libre de suero. Antes de ser colocadas sobre la PPR fueron mezcladas 3 veces con la pipeta y se fueron tomando alícuotas de 5 μ l las cuales se sembraron en forma de gotas que se esparcieron por toda la superficie del andamio (tomar en cuenta la capilaridad del agua), de esta forma se sembraron

el resto de los pozos. Para conservar la humedad de los cultivos, se le agregó de 5-10 μ l de medio suplementado al perímetro de cada pozo.

La placa fue incubada en condiciones estándar por 1 hora aproximadamente para permitir la adhesión de las células al andamio (la humedad del cultivo se fue monitoreando durante este tiempo y se agregó más medio suplementado en los casos que se requirió).

Después de que las células se adhirieron, se completó el volumen con medio DMEM 1% A.A y 1% SFB hasta un volumen de 1.5 ml por pozo. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones estándar durante 16 horas para las determinaciones posteriores.

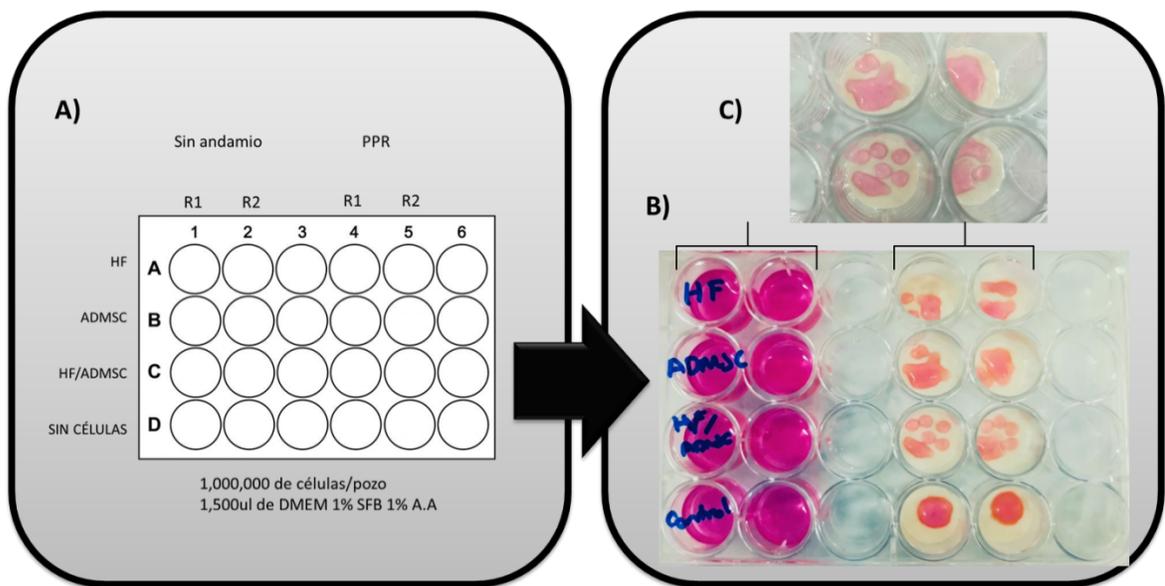


Figura 14. Generación del cocultivo de HF y ADMSC sobre un andamio de PPR. A) Representación gráfica del ensayo para la evaluación del cocultivo de HF y ADMSC sobre PPR. Se sembraron 1×10^6 células en total por cada pozo. Se contemplaron 6 condición experimentales: fibroblastos sin andamio (HF), fibroblastos sembrados sobre el andamio (HF/PPR), ADMSC sembradas sin andamio (ADMSC), ADMSC sembradas sobre el andamio (ADMSC/PPR), cocultivo sin andamio (ADMSC/HF) y cocultivo sobre el andamio (ADMSC/HF/PPR) las cuales se sembraron por duplicado (R1, R2). B,C) Para sembrar las células sobre el andamio, la cantidad total de células se re-suspendió en 20 μ l y se sembraron por goteo procurando cubrir toda la superficie, se dejaron transcurrir 40 minutos para su adhesión al andamio PPR. Finalmente se completó el volumen con medio fresco y se mantuvieron en incubación con las condiciones estándar.

5.4 Detección de factores de crecimiento

5.4.2 Extracción de sobrenadantes

Para evaluar los factores de crecimiento secretados durante el periodo de incubación, se obtuvieron los sobrenadantes. El sobrenadante de cada condición se dividió en 10 alícuotas de 150 µl cada una las cuales se congelaron a -80 °C para su posterior análisis.

5.4.3 Detección de VEGF, FGFb y EGF

Para el análisis de la concentración de factores de crecimiento en los sobrenadantes del cocultivo, se empleó la técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) sándwich.

Los anticuerpos empleados se enlistan a continuación, los cuales previo a su uso fueron reconstituidos de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	ORIGEN
FGFb (PrepoTech)	FGF-básico humano	Conejo
EGF (PrepoTech)	EGF-humano estándar	Conejo
VEGF (PrepoTech)	VEGF-humano estándar	Conejo

Tabla 3. Características de los anticuerpos empleados para la detección de: bFGF, EGF y VEGF

Para comenzar, en una placa ELISA se colocaron 50 µl de medio (previamente descongelado) de cada condición por triplicado. Se procedió a colocar al anticuerpo de captura los cuales fueron diluidos a las concentraciones recomendadas por el proveedor de acuerdo a sus características particulares. EL ab de captura se dejó incubar durante toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se aspiró el sobrenadante y el pozo se lavó usando 300 µl de buffer de lavado (0.05% Tween en PBS 1X) por pozo, se hicieron 4 lavados de 20 min en agitación orbital constante.

Después se colocaron 300 µl del buffer de bloqueo (1% BSA en PBS 1X) el cual se dejó incubar a TA por 1 hora. Durante este periodo de tiempo se prepararon las diluciones del anticuerpo estándar correspondiente para formar la curva patrón.

Una vez pasado el tiempo de incubación, por decantación se eliminaron los sobrenadantes y los pozos se lavaron 4 veces nuevamente de la misma forma que se mencionó anteriormente. Se procedió a agregar cada pozo 150 µl tanto de las diluciones estándar como de las muestras problema correspondientes.

Después de al menos 2 horas de incubación, las muestras se descartaron por decantación y se hicieron 3 lavados más. Finalmente se añadió el ab de detección que se dejó incubar durante 2 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 100 µl de avidina conjugada con-HRP (Thermo fisher, 2.5mg/ml) en proporción 1:6000 a cada pozo. Una vez transcurridos al menos 30 minutos, con cuidado se aspiró el contenido y se hicieron 4 lavados más. Finalmente se agregaron 100 µl de ABTS (Liquid substrate solution, Sigma) e inmediatamente se leyó la placa en un lector ELISA a una longitud de onda de 405 nm cada 5 min durante 45 min.

Los datos únicamente fueron graficados, pues se requiere de la replicación del experimento, para poder obtener una *n* significativa estadísticamente.

5.5 Determinación de la síntesis de proteínas de matriz extracelular

Para determinar la síntesis de proteínas de matriz extracelular se midió la expresión de mRNA para colágena I y III en los diferentes cultivos empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo (PCR, por sus siglas en inglés).

5.5.2 Extracción de RNA

La extracción del material genético se llevó a cabo a las 16 horas de cultivo, para ello se empleó el RNeasy mini kit (Qiagen) el cual permite el aislamiento de RNA a partir del uso de una columna con alta afinidad para retener RNA mayor a 200 pb lo que enriquece la concentración de mRNA.

Para llevar a cabo este ensayo, se siguieron las instrucciones del proveedor y el protocolo fue ajustado al proyecto como se explicará a continuación.

Una vez que el medio fue retirado y se lavaron con cuidado los pozos con PBS 1X para eliminar los restos de medio de cultivo y a continuación las células fueron tripsinizadas (siguiendo el mismo procedimiento que se mencionó anteriormente) para obtener el botón celular.

- Para el caso de los cultivos sobre PPR⁵, el andamio se recortó en pequeños pedazos con el uso de pinzas y tijeras de disección. Los fragmentos se colocaron dentro de tubos eppendorf de 2 ml, y se les agregaron 500 µl de PBS 1X y se lavaron por inmersión para eliminar el medio de cultivo. EL PBS fue descartado y posteriormente se les añadieron 500ul de tripsina. Después de 5-7 min los tubos se agitaron en un vórtex por aproximadamente 30 s. y se retiraron los pedazos de PPR con pinzas de disección. Los tubos se centrifugaron por 5 min a 1500 rpm para obtener el botón celular.
- A partir de este punto, las muestras de mantuvieron el hielo durante todo el proceso

Los botones celulares fueron resuspendidos en 330 µl de buffer RLT (preparado con mercaptoetanol previamente como lo indica el manual). Las muestras se homogenizaron haciéndolas pasar por una jeringa de 5 a 7 veces y se transfirieron a tubos nuevos para eliminar los detritos celulares. Para continuar, se agregó 1 volumen de etanol al 70% (330 µl) y se homogenizó con la ayuda de la micro pipeta para después transferir las muestras a las columnas del Kit. Las cuales se centrifugaron por 15 s a 8,000 rpm. El sobrenadante fue desechado y se añadieron 87 µl de DNAsa procurando cubrir toda la membrana con la micropipeta (cuidando no tocar la membrana con la punta). Después se agregaron 350 µl del buffer RW1. Se incubaron las muestras de 10-15 min y se centrifugaron 15 s a 8,000 rpm.

Posteriormente el sobrenadante fue descartado y se agregaron nuevamente 350 µl de buffer RW1 para volver a centrifugar por 15 s a 8,000 rpm, el sobrenadante fue descartado y se añadieron 500 ul de RPE y centrifugarse por 15 s a 8,000 rpm desechando el sobrenadante para después añadir un volumen más de 500 µl del mismo búfer pero esta vez se centrifugó por 2 min a 8,000 rpm. Esta vez el tubo fue desechado junto con el sobrenadante y se usó un tubo Eppendorf nuevo para recolectar el material genético contenido en la columna añadiendo 30 µl de agua libre de RNAsas sobre la columna que se centrifugó por 1 min, después se agregaron 20 µl más para asegurar extraer la mayor cantidad de material genético. El volumen final se dividió en alícuotas que se congelaron a -80 °C para su posterior

⁵ Para estandarizar el aislamiento de RNA de las células sobre el andamio, se agregó un control (PPR sin células) el cual se sometió al mismo procedimiento.

análisis. La integridad del RNA se verificó mediante un gel de agarosa al 1% (se cargaron 3 μ l de RNA más 2 μ l de buffer de carga para todas las muestras).

5.5.3 Obtención del cDNA (Retrotranscripción)

Para la retrotranscripción se tomó una de las alícuotas del RNA extraído por cada muestra, el RNA fue cuantificado con un nanodrop, y los datos fueron registrados para posteriores cálculos.

Para este paso se empleó el kit High Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del proveedor con los detalles que mencionaré a continuación: el RNA se empleó una concentración de 500 ng/ μ l, al cual se le añadió 1 μ l de Buffer DEPC y el volumen se completó con agua libre de RNasas hasta 10 μ l, para luego combinarse con el master mix (2X) preparado como lo indica el manual, obteniendo un volumen final de 20 μ l (1X).

5.5.4 PCR tiempo real para la detección de COL1A1 y COL3A1

Las sondas empleadas para este ensayo fueron diseñadas específicamente para los genes COL1A1 (que codifica para la cadena pro- α 1 de la colágena I) y para COL3A1 (que codifica para la cadena pro- α 1 de colágena III) (Applied Biosystems). Para normalizar la expresión genética, se empleó el gen Pol2 (que codifica para RNA polimerasa II). Las especificaciones de las sondas se muestran en la tabla 5.

TARGET	REPORTERO	QUENCHER
POL2	VIC	NFQ-MGB
COL1A1	FAM	NFQ-MGB
COL3A1	FAM	NFQ-MGB

Tabla 4. Características de las sondas para PCR tiempo real

Se realizaron 2 ensayos: uno para COL1A1 y otro para COL3A1 por triplicado en una misma placa. El cDNA se usó a una concentración de 50 ng/ μ l y se llevó a un volumen total de 1 μ l con agua libre de nucleasas. A cada ensayo se le agregó 1 μ l del control de carga Pol2 para después mezclarse con 10 μ l de master mix 2X (preparado como lo indica el proveedor) y se llevó a un volumen total de 20 μ l (1X)

por pozo. Los datos fueron analizados con el Software StepOne Real time-PCR (Thermo Fisher) y únicamente fueron graficados, pues se requiere de la replicación del experimento, para poder obtener una n significativa estadísticamente.

6.RESULTADOS

Para la generación del cocultivo de fibroblastos (HF) y células troncales mesenquimales (ADMSC), se obtuvieron biopsias de piel y tejido adiposo de abdomen de pacientes sometidos a lipoplastías, a partir de los cuales se aislaron las células que se cultivaron y expandieron para llevar a cabo el presente trabajo.

Los HF fueron obtenidos de la capa dérmica de piel de abdomen y cultivados para su expansión. A través de un ensayo de inmunofluorescencia se demostró la expresión de la proteína de superficie de fibroblastos 1B10 (como se muestra en la **[Fig.16]**, en color verde) para células de pase 4 (p4). El cultivo mostró que las células aisladas eran positivas en un 90% **[ANEXO 1]**. Además se pudo observar a través del microscopio la morfología característica del linaje: células alargadas, fusiformes y con núcleo elíptico a redondo en el centro (azul), como se muestra en la **[Fig.15]**. Los cultivos se mantuvieron no más allá del pase 5 como recurso para la generación del cocultivo.

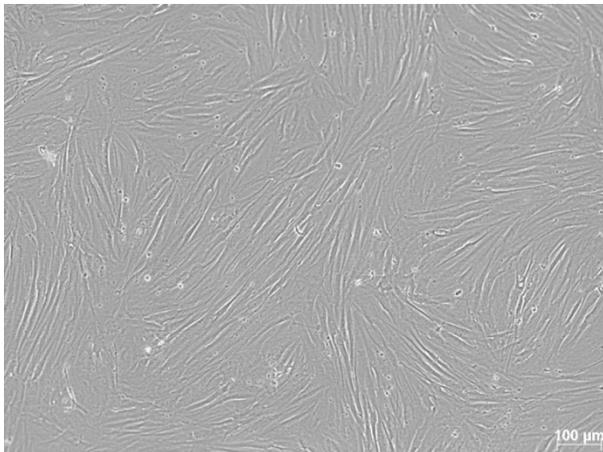


Figura 15. Cultivo primario de fibroblastos humanos aislados a partir de piel de abdomen.

Se aislaron HF de la capa dérmica de piel de abdomen por digestión enzimática. Las células obtenidas presentaron un fenotipo fusiforme alargado como se muestra en la micrografía.

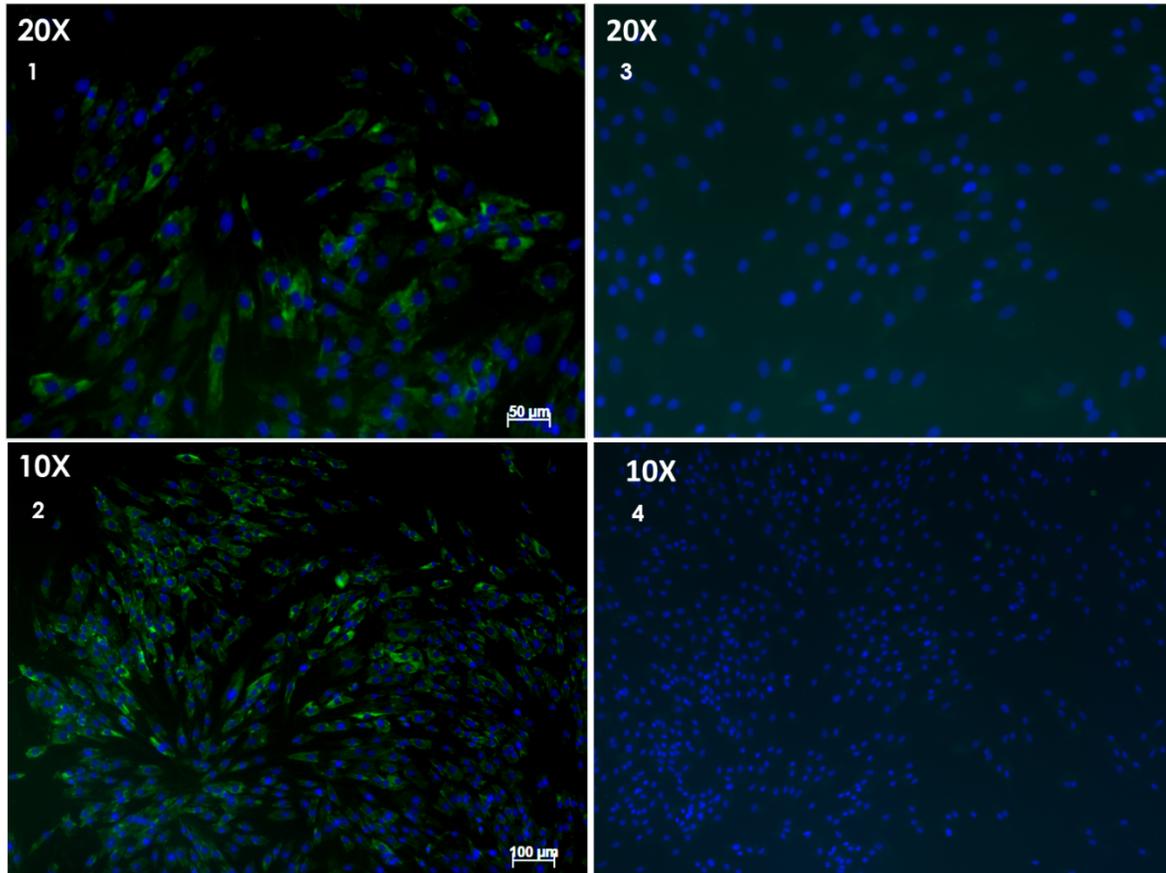


Figura 16. Inmunofluorescencia con anti- α -1B10 en un cultivo de fibroblastos de piel de abdomen. Los HF fueron marcados para 1B10 (verde) y el núcleo se tiñó con DAPI (azul). Aproximadamente el 90% de las células fueron positivas para 1B10 lo que demuestra una población altamente purificada de fibroblastos. Micrografía panorámica del cultivo de HF a diferentes escalas: A) 50 μ m y B) a 100 μ m. C y D) Micrografías a diferentes escalas del control negativo, en donde únicamente se identifican los núcleos teñidos con DAPI (azul).

Para el caso de las células troncales mesenquimales se utilizó el tejido adiposo de las mismas muestras de abdomen (ADMSC). Por motivos ajenos al proyecto no se pudo realizar la caracterización por citometría de las células obtenidas, sin embargo, se siguió el protocolo estandarizado previamente dentro del laboratorio de biotecnología del INR **[ANEXO 2-3]**.

En el cultivo primario de ADMSC a las 24 horas mostraba una gran cantidad de eritrocitos, células apoptóticas y detritos celulares, por lo cual el medio fue reemplazado inmediatamente. Para las 72 horas, la cantidad de células apoptóticas era mínima y se podía observar una población completamente adherida a la superficie con una morfología fusiforme que se expande sobre la base y en consecuencia ocupan un mayor espacio comparado con los HF [Fig.17]. Debido a lo anterior para llevar a cabo los ensayos posteriores, se requirió de la siembra del doble de cajas de ADMSC de las requeridas para HF y así obtener aproximadamente la misma cantidad (los datos no fueron recolectados, pues no formaban parte de los objetivos de este proyecto), sin embargo se considera que es importante mencionar que de una caja de de 75 cm^2 del 80 al 90% de confluencia se obtuvieron alrededor de $3\text{-}4 \times 10^6$ células comparadas con las $6\text{-}7 \times 10^6$ obtenidas por caja de HF.

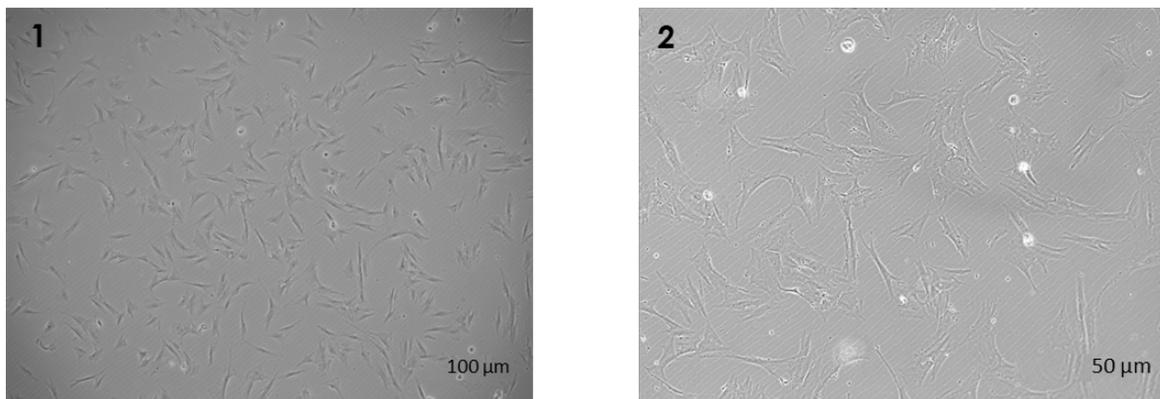


Figura 17. Cultivo primario de células mesenquimales aisladas a partir de tejido adiposo de abdomen (ADMSC). Las células se obtuvieron por digestión enzimática de biopsias donadas por pacientes de lipoplastías, a partir de las cuales se hicieron cultivos primarios. Micrografías del cultivo primario de ADMSC a las 72 horas a diferentes escalas. A) $100 \mu\text{m}$ y B) $50 \mu\text{m}$, en donde se puede observar claramente una morfología fusiforme que se expande sobre la base y forma una especie de dendritas. Las flechas negras señalan células apoptóticas dentro del cultivo.

Con las células que se aislaron inicialmente, se procedió a generar un cocultivo de HF y ADMSC empleando como andamio biocompatible piel porcina radioesterilizada (PPR). Como primer paso y con la finalidad de poder distinguir las diferentes poblaciones del cultivo, las células fueron marcadas previamente a la siembra, de tal forma que dentro del cocultivo se pudieron observar los HF en color verde [Fig. 18, A] y las ADMSC en color rojo sobre el andamio como se puede observar en la [Fig.18, B] lo cual nos permitió demostrar la presencia e interacción entre ambas poblaciones celulares en cocultivo sobre PPR.

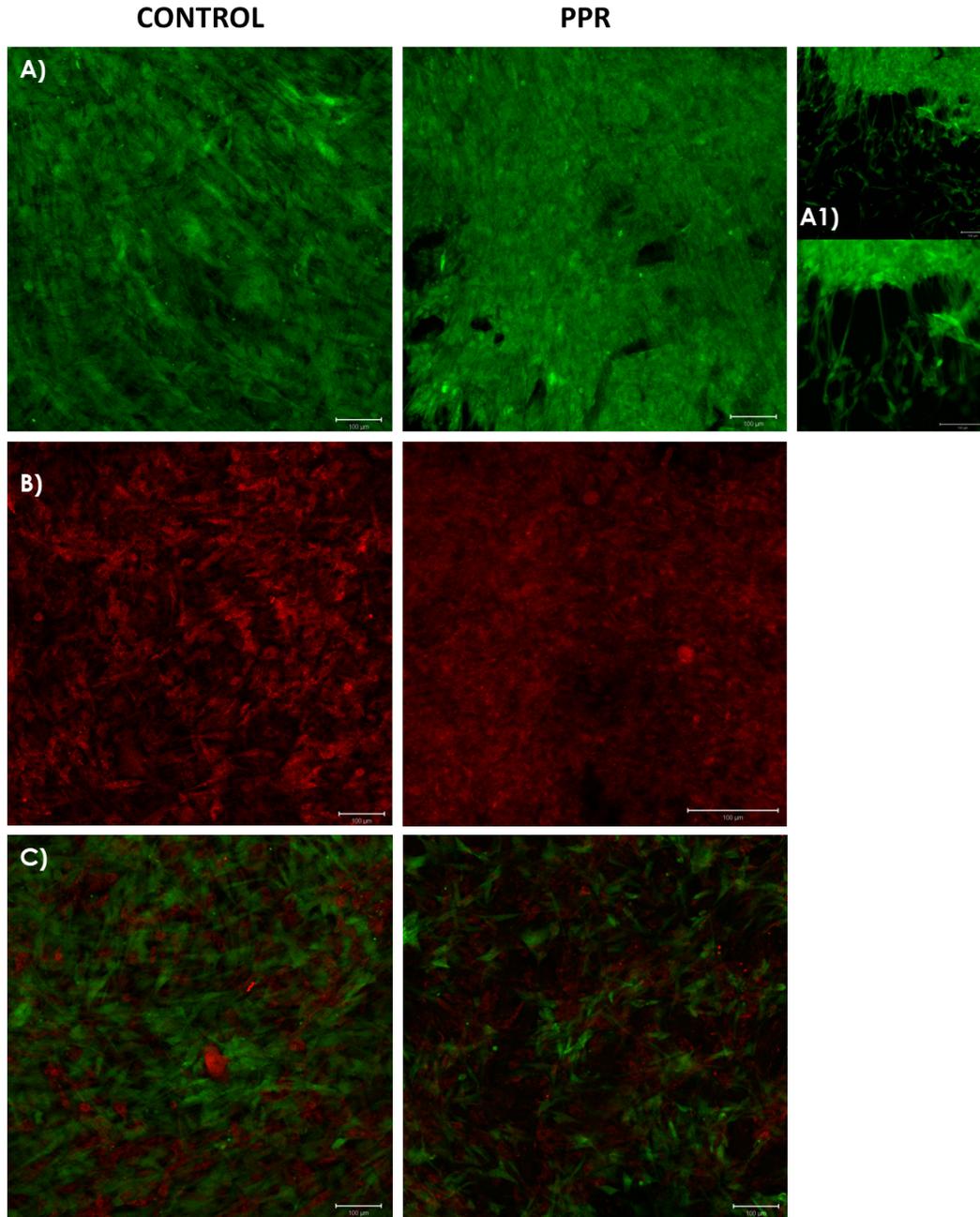


Figura 18. Cocultivo de HF y ADMSC sobre un andamio biocompatible. A partir de cultivos primarios de HF y ADMSC, se realizó un cocultivo empleando PPR como andamio biocompatible. Las células de ambos linajes se marcaron previamente con la finalidad de poderlas distinguir y comprobar que se encontraran sobre el andamio. Los HF fueron marcados con CellTracker (verde) que tiñe el citoplasma (A) y para las ADMSC se empleó MitoTracker (rojo) que tiñe mitocondrias activas (B). Cocultivo 1:1 de HF y ADMSC (C). A1) se pueden observar unas conexiones que se extienden desde el citoplasma de los HF que sugieren el mantenimiento de la comunicación entre la misma población.

Una vez que se lograron establecer las condiciones y la técnica para el cocultivo sobre el andamio, se continuó con un ensayo para evaluar la concentración de los factores de crecimiento bFGF, VEGF y EGF en el sobrenadante del cultivo, así como determinar la expresión de mRNA de las colágenas I y III, que son moléculas relacionadas con el proceso de cicatrización de la piel. Este experimento se realizó con el fin de proponer el constructo como un posible tratamiento para heridas cutáneas.

Para desarrollar este ensayo, se emplearon 6 condiciones de estudio: HF sembrados sin andamio (HF), fibroblastos sembrados sobre el andamio (HF/PPR), ADMSC sembradas sin andamio (ADMSC), ADMSC sembradas sobre el andamio (ADMSC/PPR), cocultivo sin andamio (ADMSC/HF) y cocultivo sobre el andamio (ADMSC/HF/PPR). Para la determinación de la liberación de factores de crecimiento en el cocultivo, se tomaron los sobrenadantes a las 16 horas, de las diferentes condiciones los cuales se evaluaron por la técnica de ELISA.

Los resultados mostraron que la concentración de bFGF incrementó tanto en HF y ADMSC por separado y en cocultivo cuando se sembraron sobre PPR **[Fig 19, A]**. Para EGF los resultados sugieren que la PPR estimuló la secreción de EGF por parte de las ADMSC solas y en cocultivo con HF **[Fig 19,B]**. El empleo de PPR también provocó un incremento en la concentración de VEGF en los cultivos de HF solos y cuando se encuentran en cocultivo con ADMSC, mientras que no parece tener mayor efecto sobre las ADMSC en cuanto a la liberación de VEGF **[Fig.19, C]**. En general se observó que el empleo de PPR como andamio tiene una tendencia a promover la liberación de los factores bFGF, VEGF y EGF en el cocultivo de HF y ADMSC.

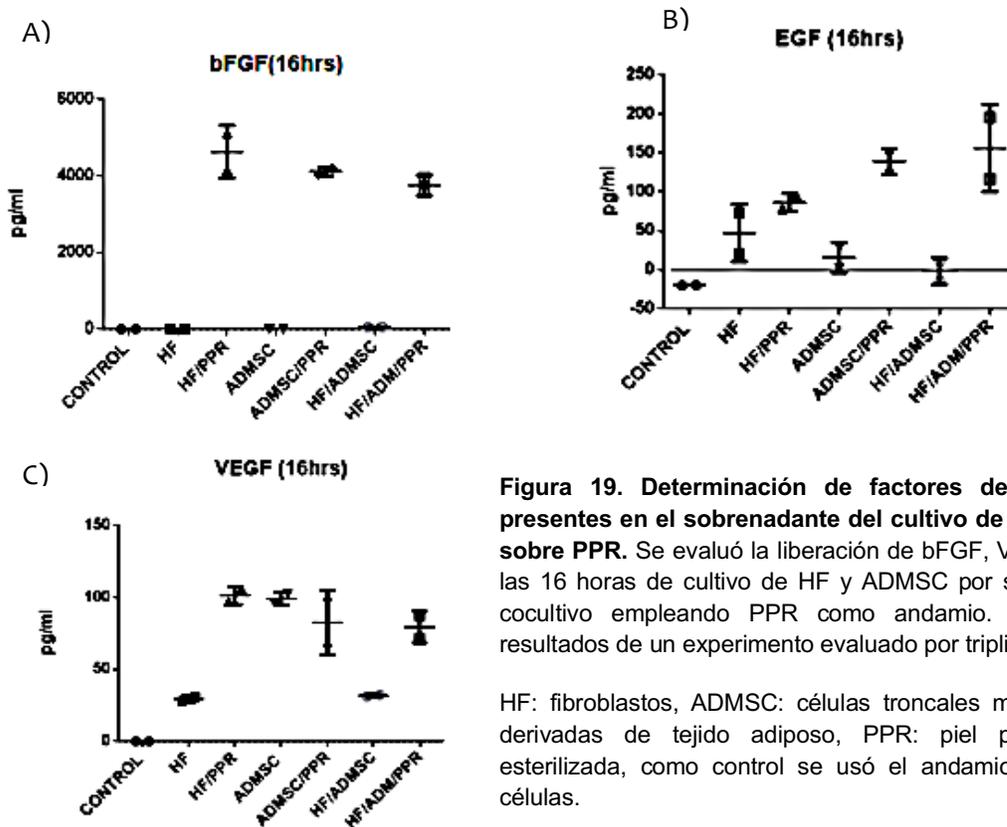


Figura 19. Determinación de factores de crecimiento presentes en el sobrenadante del cultivo de HF y ADMSC sobre PPR. Se evaluó la liberación de bFGF, VEGF y EGF a las 16 horas de cultivo de HF y ADMSC por separado y su cocultivo empleando PPR como andamio. Se muestran resultados de un experimento evaluado por triplicado.

HF: fibroblastos, ADMSC: células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo, PPR: piel porcina radio-esterilizada, como control se usó el andamio de PPR sin células.

Para la determinación de la expresión de proteínas de matriz extracelular, se llevó a cabo una PCR tiempo real para la cuantificación del mRNA correspondiente a los genes COL1A1 y COL3A1. Con este fin, se extrajo el RNA total de 1×10^6 células⁶ de cada condición, el cual se cuantificó y verificó su integridad por medio de un gel de agarosa [Fig.20, A,B]. Con el fin de obtener cDNA para continuar con el objetivo, se realizó una retro-transcripción cuyos rendimientos se muestran en la [Fig.20, C]

⁶ La cantidad de células fue determinada de acuerdo a experimentos previos, que mostraron que el rendimiento del RNA total de las células sobre el andamio disminuía en comparación con las células sin el andamio (ANEXO 4-5).

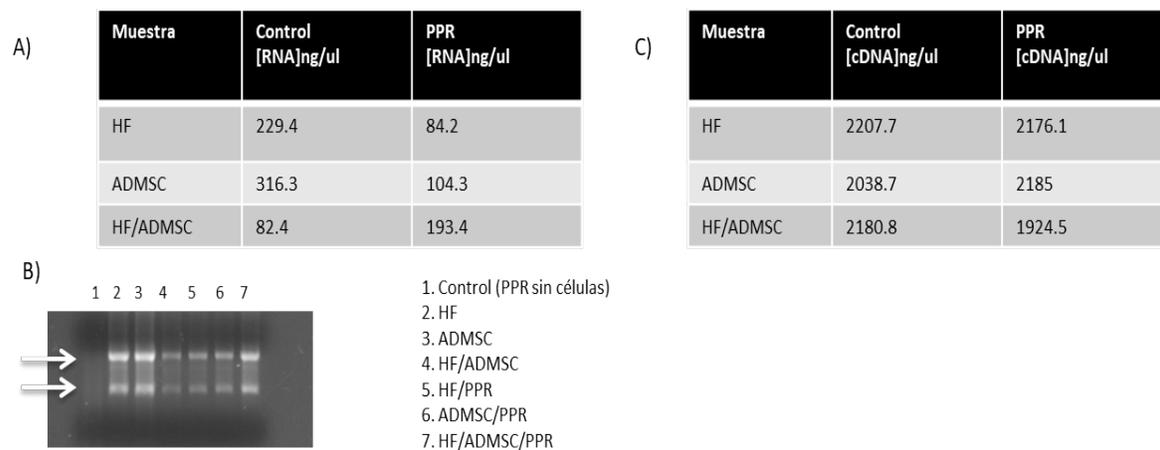


Figura 20. Extracción de RNA total de los cultivos celulares y obtención de cDNA. A) La tabla muestra el rendimiento del RNA total obtenido por cada condición expresado en nanogramos por microlitro (ng/μl). B) Gel de integridad del RNA, se cargaron 3ul de material genómico más 2ul de marcador. Las flechas blancas indican las bandas intactas correspondientes a las sub-unidades 18 y 28S del RNA. C) Tabla de la concentración de cDNA obtenido a partir de la retrotranscripción del RNA total.

Una vez que se tuvo el cDNA se continuó con la PCR tiempo real de los genes COL1A1 y COL3A1 que codifican para las cadenas α de las pro-colágenas I y 3 respectivamente. Los resultados revelaron que el empleo de PPR como andamio para ADMSC en monocultivo tiende a disminuir la expresión de COL I y COL III [Fig.21, B] mientras que HF sobre PPR únicamente disminuyó la expresión de COL 1 [Fig. 21,A]. La expresión de COL I y COL III en el cocultivo de HF y ADMSC sobre PPR aumentó en comparación con el cocultivo sin andamio, como lo muestra la gráficas de la [Fig. 21, C].

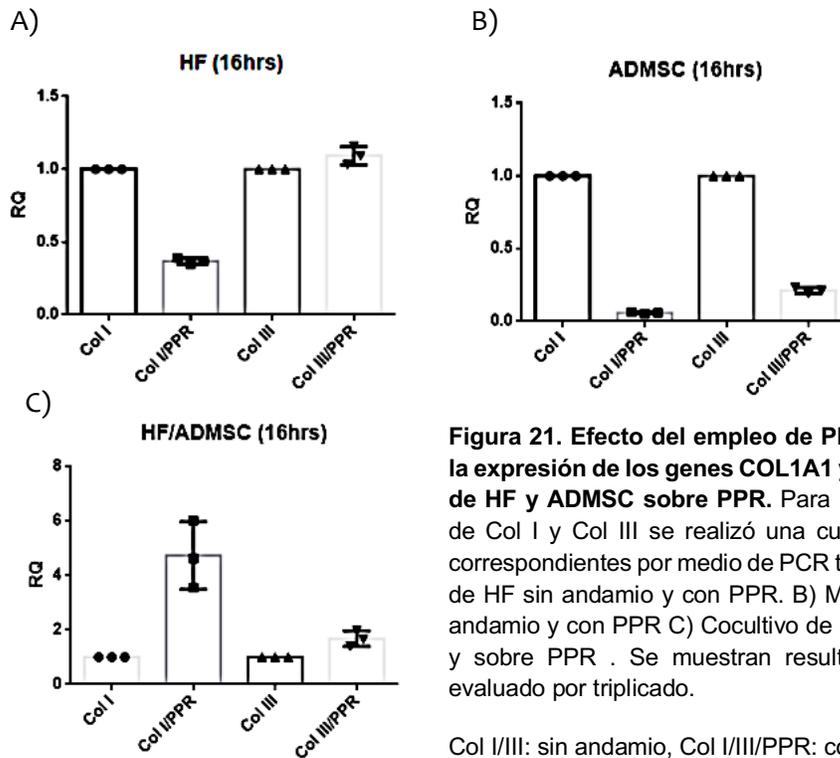


Figura 21. Efecto del empleo de PPR como andamio sobre la expresión de los genes COL1A1 y COL3A1 en el cocultivo de HF y ADMSC sobre PPR. Para el análisis de la expresión de Col I y Col III se realizó una cuantificación de los mRNA correspondientes por medio de PCR tiempo real. A) Monocultivo de HF sin andamio y con PPR. B) Monocultivo de ADMSC sin andamio y con PPR C) Cocultivo de HF y ADMSC sin andamio y sobre PPR. Se muestran resultados de un experimento evaluado por triplicado.

Col I/III: sin andamio, Col I/III/PPR: con andamio

7.DISCUSIÓN

El tejido adiposo es un excelente recurso para la obtención de células troncales con fines terapéuticos, pues es un tejido abundante que se puede obtener fácilmente pues es considerado un tejido de desecho cuando proviene de la reducción estética de grasa abdominal. Se trata de un procedimiento sencillo no invasivo y de bajo riesgo para la salud del paciente.

Las ADMSC son fáciles de manipular y estables en cultivo, poseen una alta capacidad proliferativa y tienen propiedades inmuno-reguladoras únicas. El presente trabajo y junto con el de **Sánchez S et al; (2015)** demostraron que la PPR ofrece una superficie que les permite adherirse, mantenerse viables y crecer en monocapa.

Dentro del proceso de reparación de la piel, los fibroblastos tienen un papel fundamental en la remodelación de la matriz extracelular que permite la migración celular y la liberación de factores de crecimiento. En etapas intermedias de la reparación los fibroblastos adquieren un fenotipo especializado conocido como miofibroblastos que son células productoras de una matriz rica en colágena y

gracias a sus propiedades contráctiles permiten la aproximación de los extremos de la herida y finalmente la formación de una cicatriz.

En muchas ocasiones como resultado del desequilibrio entre la proliferación y apoptosis de los miofibroblastos se genera fibrosis, que se refiere a la excesiva producción y acumulación de fibras de colágena que muchas veces interfiere con la funcionalidad del tejido, en el caso de la piel, genera cicatrices hipertróficas o queloides que producen secuelas funcionales, físicas y socio-psicológicas relevantes.

Los resultados de la **[Fig. 21C]**, mostraron que el cocultivo de HF y ADMSC inhibe la producción de COL I y COL III, resultado que coincide con el trabajo publicado por Deng MD. et al; en donde observaron que además de colágenas también inhibe la proliferación y la expresión de α -SMA y TGF- β ¹⁷⁹. Interesantemente, también pudimos ver que el empleo de PPR como andamio para el cocultivo parece estar contrarestando este efecto, pues en comparación con el cocultivo sin andamio, los niveles de COL I y III aumentaron.

Modelos de heridas *in vivo* sobre ratones y humanos expuestos directamente a ADMSC y ADMSC-CM (medio condicionado de ADMSC), han demostrado sus capacidades anti-fibróticas, pues disminuye la densidad de COL I y COL III en las cicatrices generadas. Además de haber reducido el área de la herida, promovido la re-epitelización y con ello la apariencia estética de la cicatriz¹⁸⁰⁻¹⁸².

Aunque por el contrario, algunos estudios *in vitro* han coincidido en que el uso de ADMSC-CM promueve el depósito de COL I y COL III, la proliferación y la disminución de MMP-1, cuando se utiliza medio condicionado^{182,183}.

Cabe mencionar que en dos trabajos *in vivo* con ratones uno empleando ADMSC inyectadas¹⁸⁴ y la administración tópica de exosomas provenientes de ADMSC¹⁸⁵, también reportaron que se promovió la expresión del mRNA para COL I y COL III comparado con el control así como una mejor cicatrización.

Un estudio reciente empleó conejos como modelo de estudio a los cuales se les administraron tanto ADMSC como ADMSC-CM sobre las heridas generadas y, los resultados obtenidos mostraron que ambos tienen la capacidad de disminuir la síntesis de colágena en la cicatriz generada, sin embargo, las ADMSC fueron más efectivas pues los niveles de COL I y α -SMA fueron aún más bajos y además mostraron una menor elevación de la cicatriz¹⁸⁶.

Aunque los mecanismos moleculares que se encuentran involucrados en este complejo proceso no se tienen completamente esclarecidos, los resultados obtenidos en este proyecto junto con los trabajos de la revisión bibliográfica

disponible hasta la fecha, nos permiten sugerir que las interacciones célula-célula potencian el efecto anti-fibrótico de las ADMSC, pero además se observó que el empleo de PPR tiene la capacidad de regular los efectos sobre la producción de COL I y COL III del cocultivo de HF y ADMSC *per se*.

En cuanto a la liberación de factores de crecimiento, se pudo observar que la PPR tiende a promover la síntesis de VEGF, EGF y bFGF cuando se emplea como andamio tanto en las poblaciones sembradas individualmente como en el cocultivo de HF y ADMSC. Otro aspecto que se pudo notar fue que el cocultivo por sí solo inhibe la síntesis de VEGF y EGF y disminuye la de VEGF, sin embargo este efecto se contraresta cuando empleamos PPR como andamio.

El constructo promueve la liberación de bFGF, una molécula que se ha relacionado en repetidas ocasiones con la ausencia de cicatriz, pues ha demostrado tener grandes efectos anti-fibróticos así como la generación de una matriz que muestra una orientación de fibras de colágena similar a la de la dermis intacta ¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. Este efecto se puede atribuir a su capacidad para inhibir la transformación de miofibroblastos y la reducción del tejido granuloso mediante la promoción de su apoptosis ^{189,191} y a la capacidad que tiene para promover la liberación de MMPs que promueven la migración celular.

El constructo también mostró estar regulando positivamente a VEGF. VEGF participa directamente en la generación del tejido granuloso pues en ratones *Knock out* para VEGFR1 este tejido no se forma ¹⁹². Diferentes estudios han demostrado que el estímulo de fibroblastos con VEGF promueve la expresión de colágena I y III a través de diferentes mecanismos ^{193,194}. Entre ellos su capacidad para regular la permeabilidad de los vasos sanguíneos que permite que células como macrófagos ingresen al área afectada y con ello la producción de moléculas como PDGF, bFGF y TGF- β que promueven la proliferación de fibroblastos y el depósito de proteínas de matriz generando un tejido granuloso con mayor densidad.

Además se ha observado que VEGF y bFGF aceleran la re-epitelización a través de la promoción de la expresión de marcadores endoteliales en células troncales mesenquimales ¹⁹⁵.

El constructo promueve la liberación de EGF. EGF es conocido por ser un agente potencialmente mitogénico y promotor de migración celular efecto que se ha comprobado dentro del proceso de reparación sobre células endoteliales y fibroblastos ^{126,196}. La administración tópica de EGF en heridas agudas y crónicas acelera la re-epitelización y reduce el tiempo de cierre de la herida ^{127,197}. Hata R. y col estudiaron el efecto de EGF sobre fibroblastos y concluyeron que estimula su proliferación e inhibe la transcripción de colágena tipo I ^{198,199}. Este último hecho se

puede respaldar por investigaciones más recientes que han demostrado que EGF estimula la expresión del receptor de TGF- β en fibroblastos, lo cual en teoría permitiría su transformación a miofibroblastos y así explicar el aumento de la producción de colagenasas descrito por Barrandon Y. et al; ^{200,201}.

La [Fig.22] muestra la estrecha relación entre la liberación de factores de crecimiento y la producción de colágena, dentro de la cual figuran ciertos mecanismos celulares de gran importancia para el proceso de reparación de la piel.

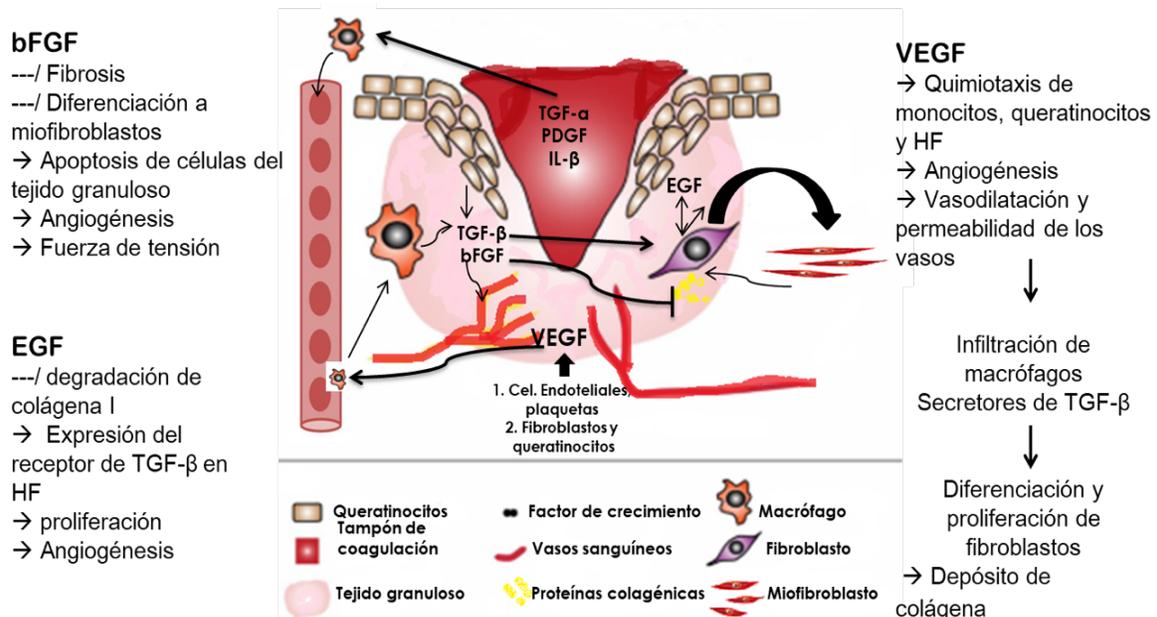


Figura 22. Efectos de bFGF, VEGF y EGF sobre procesos asociados a la reparación de la piel

8.CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el co-cultivo de HF y ADMSC sobre PPR tiende a promover la síntesis de VEGF, bFGF y EGF y la expresión del mRNA para COL I y III.

A pesar de la creciente evidencia sobre el efecto anti-fibrótico de las ADMSC, poco es el esfuerzo que se ha hecho en entender los mecanismos moleculares. Este proyecto es una evidencia sobre la variación de los efectos que las ADMSC pueden tener sobre procesos asociados a la reparación de heridas, cuando se encuentran en contacto directo con HF y a su vez interactuando con un andamio biológicamente muy similar a la piel humana pues es naturalmente rico en colágena I.

Limitaciones del estudio: Se sugiere realizar un mayor número de experimentos para corroborar la hipótesis planteada.

9. LITERATURA CITADA

1. Habif TP. *Clinical Dermatology: A Color Guide to Diagnosis and Therapy.*; 2010.
2. Weller R, Hunter JAA, Savin J, Dahl M, Hunter JAA. *Clinical Dermatology.* Wiley; 2013. <https://www.wiley.com/en-us/Clinical+Dermatology%2C+4th+Edition-p-9781118693506>. Accessed May 9, 2018.
3. Valle M, Zamorani MP. Skin and Subcutaneous Tissue. In: *Ultrasound of the Musculoskeletal System.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; :19-43. doi:10.1007/978-3-540-28163-4_2
4. Fortoul van der Goes TI. *Histología y Biología Celular.* McGraw Hill; 2017. <https://www.laleo.com/histologia-biologia-celular-p-22136.html>. Accessed January 19, 2018.
5. Pawlina W, Ross M. *Histología' Texto y Atlas.* Lippincott Williams & Wilkins; 2015. <https://www.laleo.com/ross-histologia-texto-atlas-p-19341.html>. Accessed January 19, 2018.
6. Albanna MZ, Holmes JH. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* Academic press; 2016.
7. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA. *Robbins Basic Pathology.*
8. Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH (Frank H. *Netter's Essential Histology.* Elsevier/Saunders; 2013.
9. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell.* 1993;73(4):713-724. doi:10.1016/0092-8674(93)90251-K
10. Le Bitoux M-A, Haftek M. Fisiología cutánea: queratinización epidérmica. *EMC - Podol.* 2008;10(3):1-10. doi:10.1016/S1762-827X(08)70695-3
11. Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature.* 2005;437(7056):275-280. doi:10.1038/nature03922
12. Albanna MZ, Holmes JH. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* Elsevier Inc; 2016.
13. Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Leffell D. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine,* 8th Edition. 2011.

<https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/fitzpatrick-dermatology-in-general-medicine-8th-edition-2>. Accessed May 11, 2018.

14. Gawkrödger DJ (David J., Ardern-Jones MR. *Dermatology : An Illustrated Colour Text*. Churchill Livingstone Elsevier; 2012.
15. Shimizu H, 清水宏. *Shimizu's Textbook of Dermatology*. Hokkaido University; 2007.
16. Parker RC. THE FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF NINE RACES OF FIBROBLASTS. *Science (80-)*. 1932;76(1966):219-220. doi:10.1126/science.76.1966.219-a
17. Conrad GW, Hart GW, Chen Y. Differences in vitro between fibroblast-like cells from cornea, heart, and skin of embryonic chicks. *J Cell Sci*. 1977;26:119-137. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/411797>. Accessed July 19, 2018.
18. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):392-401. doi:10.1038/nrc1877
19. Li C/, Guo /, Multipotential :, Guo Z, Chang Y, Li H. Mesenchymal Stem Cell-Like Properties in Fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34:703-714. doi:10.1159/000363035
20. CAMELLITI P, BORG T, KOHL P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2005;65(1):40-51. doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.020
21. Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol*. 2015;94(11):483-512. doi:10.1016/J.EJCB.2015.08.001
22. Vaheri A, Ruoslahti E, Linder E, et al. Fibroblast surface antigen (SF): Molecular properties, distribution in vitro and in vivo, and altered expression in transformed cells. *J Supramol Struct*. 1976;4(1):63-70. doi:10.1002/jss.400040107
23. Saalbach A, Anderegg U, Bruns M, Schnabel E, Herrmann K, Haustein UF. Novel Fibroblast-Specific Monoclonal Antibodies: Properties and Specificities. *J Invest Dermatol*. 1996;106(6):1314-1319. doi:10.1111/1523-1747.ep12349035
24. Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*. 2013;504(7479):277-281. doi:10.1038/nature12783
25. Harper RA, Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro. *Science*. 1979;204(4392):526-527. doi:10.1126/SCIENCE.432659

26. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *J Cell Physiol.* 2004;200(1):134-145. doi:10.1002/jcp.10474
27. Azzarone B, Macieira-Coelho A. Heterogeneity of the kinetics of proliferation within human skin fibroblastic cell populations. *J Cell Sci.* 1982;57:177-187. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7153259>. Accessed July 23, 2018.
28. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585-601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
29. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):771-785. doi:10.1038/nrm3902
30. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 2009;326(5957):1216-1219. doi:10.1126/science.1176009
31. Hynes RO, Naba A. Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(1):a004903-a004903. doi:10.1101/cshperspect.a004903
32. WEINSTEIN GD, BOUCEK RJ. Collagen and elastin of human dermis. *J Invest Dermatol.* 1960;35:227-229. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13783962>. Accessed August 14, 2018.
33. Brodsky B, Persikov A V. Molecular Structure of the Collagen Triple Helix. In: *Advances in Protein Chemistry.* Vol 70. ; 2005:301-339. doi:10.1016/S0065-3233(05)70009-7
34. Hulmes DJS. Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures. *J Struct Biol.* 2002;137(1-2):2-10. doi:10.1006/jsbi.2002.4450
35. Bella J, Eaton M, Brodsky B, Berman HM. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science.* 1994;266(5182):75-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7695699>. Accessed May 16, 2018.
36. Persikov A V., Ramshaw JAM, Kirkpatrick A, Brodsky B. Electrostatic Interactions Involving Lysine Make Major Contributions to Collagen Triple-Helix Stability †. *Biochemistry.* 2005;44(5):1414-1422. doi:10.1021/bi048216r
37. Bächinger HP, Mizuno K, Vranka JA, Boudko SP. Collagen Formation and Structure. In: *Comprehensive Natural Products II.* Elsevier; 2010:469-530. doi:10.1016/B978-008045382-8.00698-5
38. Henriksen K, Karsdal MA. Chapter 1 - Type I Collagen. 2016. doi:10.1016/B978-0-12-809847-9.00001-5

39. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, et al. Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. *Arch Dermatol.* 1994;130(4):489. doi:10.1001/archderm.1994.01690040093015
40. Nuutila K, Katayama S, Vuola J, Kankuri E. Human Wound-Healing Research: Issues and Perspectives for Studies Using Wide-Scale Analytic Platforms. *Adv wound care.* 2014;3(3):264-271. doi:10.1089/wound.2013.0502
41. Biedermann T, Boettcher-Haberzeth S, Reichmann E. Tissue Engineering of Skin for Wound Coverage. *Eur J Pediatr Surg.* 2013;23(05):375-382. doi:10.1055/s-0033-1352529
42. Schaefer TJ, Szymanski KD. *Burns, Evaluation And Management.* StatPearls Publishing; 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28613492>. Accessed May 22, 2018.
43. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014;58(5):515-523. doi:10.4103/0019-5049.144643
44. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326-336. doi:10.3109/10409238.2015.1050550
45. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43. doi:10.1159/000339613
46. Heather Orsted RN BN BL, Keast FCFP Louise Forest-Lalande MEd DR, Françoise Mégie M. Basic Principles of Wound Healing An understanding of the basic physiology of wound healing provides the clinician with the framework necessary to implement the basic principles of chronic wound care. http://www.wrha.mb.ca/professionals/woundcare/documents/PrinciplesWoundHealing_WCCSpring2011.pdf. Accessed August 25, 2017.
47. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528-1542. doi:10.1177/147323000903700531
48. SPECTOR WG, WILLOUGHBY DA. The inflammatory response. *Bacteriol Rev.* 1963;27(2):117-154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13989977>. Accessed May 22, 2018.
49. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 SUPPL.):12S-34S. doi:10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2
50. Labler L, Mica L, Härter L, Trentz O, Keel M. Einfluss der V.A.C.®-Therapie auf Zytokine und Wachstumsfaktoren in Traumatischen Wunden. *Zentralbl Chir.* 2006;131(S 1):62-67. doi:10.1055/s-2006-921511

51. Yager DR, Nwomeh BC. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 7(6):433-441. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10633002>. Accessed May 23, 2018.
52. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg.* 2001;38(2):A1-140. doi:10.1067/msg.2001.111167
53. Schultz GS, Mast BA. Molecular Analysis of the Environments of Healing and Chronic Wounds: Cytokines, Proteases and Growth Factors Molecular Regulation of Wound Healing The Roles of Cytokines and Growth Factors in Wound Healing. 1999. http://www.woundsaustralia.com.au/journal/0701_01.pdf. Accessed May 24, 2018.
54. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Mexico) C, BECERRIL BERROCAL C, CISNEROS LIRA JG, MONTAÑO RAMÍREZ M. *El Miofibroblasto, Una Célula Multifuncional En La Patología Pulmonar.* Vol 17. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias; 2004. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000300008. Accessed August 25, 2017.
55. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995;146(1):56-66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7856739>. Accessed May 24, 2018.
56. Chen D, Hao H, Fu X, Han W. Insight into Reepithelialization: How Do Mesenchymal Stem Cells Perform? *Stem Cells Int.* 2016;2016:1-9. doi:10.1155/2016/6120173
57. Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal wound healing: a basic science review. *Plast Reconstr Surg.* 2010;126(4):1172-1180. doi:10.1097/PRS.0b013e3181eae781
58. Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Ann Surg.* 1994;220(1):10-18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8024353>. Accessed May 25, 2018.
59. Somasundaram K, Prathap K. Intra-uterine healing of skin wounds in rabbit foetuses. *J Pathol.* 1970;100(2):81-86. doi:10.1002/path.1711000202
60. Hallock GG. In utero cleft lip repair in A/J mice. *Plast Reconstr Surg.* 1985;75(6):785-790. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4001196>. Accessed August 21, 2018.
61. Burrington JD. Wound healing in the fetal lamb. *J Pediatr Surg.* 1971;6(5):523-528. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5166565>. Accessed August 21, 2018.

62. Rowlatt U. Intrauterine wound healing in a 20 week human fetus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1979;381(3):353-361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/155931>. Accessed August 21, 2018.
63. Armstrong JR, Ferguson MWJ. Ontogeny of the Skin and the Transition from Scar-Free to Scarring Phenotype during Wound Healing in the Pouch Young of a Marsupial, *Monodelphis domestica*. *Dev Biol.* 1995;169(1):242-260. doi:10.1006/dbio.1995.1141
64. Longaker MT, Whitby DJ, Ferguson MW, Lorenz HP, Harrison MR, Adzick NS. Adult skin wounds in the fetal environment heal with scar formation. *Ann Surg.* 1994;219(1):65-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8297179>. Accessed August 21, 2018.
65. Adzick NS. Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects. *Ann Surg.* 1992;216(5):613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1242691/>. Accessed May 25, 2018.
66. Whitby DJ, Ferguson MW. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol.* 1991;147(1):207-215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1879607>. Accessed May 25, 2018.
67. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen.* 1996;4(3):321-325. doi:10.1046/j.1524-475X.1996.40307.x
68. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 1996;4(4):411-420. doi:10.1046/j.1524-475X.1996.40404.x
69. de Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(8):4001-4005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/211512>. Accessed August 27, 2018.
70. Heine UI, Munoz EE, Flanders KC, et al. *Role of Transforming Growth Factor-1 in the Development of the Mouse Embryo.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2114724/pdf/jc10562861.pdf>. Accessed August 27, 2018.
71. Sporn MB, Roberts AB, Shull JH, Smith JM, Ward JM, Sodek J. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science.* 1983;219(4590):1329-1331. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6572416>. Accessed August 27, 2018.
72. Massague J. The Transforming Growth Factor-beta Family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6(1):597-641. doi:10.1146/annurev.cb.06.110190.003121
73. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem.*

2001;276(20):17058-17062. doi:10.1074/jbc.M100754200

74. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(3):469-474. doi:10.1016/j.biocel.2011.12.013
75. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(12):4167-4171. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2424019>. Accessed August 27, 2018.
76. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses, ' And HL, Kang* "\$ AH. *Brief Definitive Report STIMULATION OF THE CHEMOTACTIC MIGRATION OF HUMAN FIBROBLASTS BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR A*. <https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC2188256&blobtype=pdf>. Accessed August 27, 2018.
77. Roberts AB. Transforming growth factor-beta: activity and efficacy in animal models of wound healing. *Wound Repair Regen*. 1995;3(4):408-418. doi:10.1046/j.1524-475X.1995.30405.x
78. Laiho M, DeCaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM, Massague J. Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell*. 1990;62(1):175-185. doi:10.1016/0092-8674(90)90251-9
79. Overall\$ CM, Wrana6 JL, Sodek J. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Independent Regulation of Collagenase, 72-KDa Progelatinase, and Metalloendoproteinase Inhibitor Expression in Human Fibroblasts by Transforming Growth Factor-@**. Vol 264.; 1989. <https://pdfs.semanticscholar.org/bfea/135e60ef0edb99e2df33b0e56cdf9d0dd53c.pdf>. Accessed August 27, 2018.
80. Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, et al. Transforming Growth Factor- β : Multifunctional Regulator of Differentiation and Development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 327:145-154. doi:10.2307/55300
81. Cheon SS, Nadesan P, Poon R, Alman BA. *GROWTH FACTORS REGULATE BETA-CATENIN MEDIATED TCF-DEPENDENT TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION IN FIBROBLASTS DURING THE PROLIFERATIVE PHASE OF WOUND HEALING*. <http://www.ors.org/Transactions/50/0895.pdf>. Accessed August 28, 2018.
82. Dees C, Distler JHW. Canonical Wnt signalling as a key regulator of fibrogenesis - implications for targeted therapies? *Exp Dermatol*. 2013;22(11):710-713. doi:10.1111/exd.12255
83. Königshoff M, Balsara N, Pfaff E-M, et al. Functional Wnt Signaling Is

- Increased in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Schmidt HHHW, ed. *PLoS One*. 2008;3(5):e2142. doi:10.1371/journal.pone.0002142
84. Brack AS, Conboy MJ, Roy S, et al. Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* (80-). 2007;317(5839):807-810. doi:10.1126/science.1144090
 85. Beyer C, Reichert H, Akan H, et al. Blockade of canonical Wnt signalling ameliorates experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(7):1255-1258. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202544
 86. Koenig A, Mueller C, Hasel C, Adler G, Menke A. Collagen Type I Induces Disruption of E-Cadherin–Mediated Cell-Cell Contacts and Promotes Proliferation of Pancreatic Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 2006;66(9):4662-4671. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2804
 87. Li A, Zhou T, Guo L, Si J. Collagen type I regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation and nuclear translocation to promote migration and proliferation of gastric carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2010;23(5):1247-1255. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372837>. Accessed August 21, 2018.
 88. Mullin NK, Mallipeddi N V., Hamburg-Shields E, Ibarra B, Khalil AM, Atit RP. Wnt/ β -catenin Signaling Pathway Regulates Specific lncRNAs That Impact Dermal Fibroblasts and Skin Fibrosis. *Front Genet*. 2017;8:183. doi:10.3389/fgene.2017.00183
 89. Wang X, Zhu Y, Sun C, et al. Feedback Activation of Basic Fibroblast Growth Factor Signaling via the Wnt/ β -Catenin Pathway in Skin Fibroblasts. *Front Pharmacol*. 2017;08:32. doi:10.3389/fphar.2017.00032
 90. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1993;122(1):103-111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8314838>. Accessed August 27, 2018.
 91. Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res*. 2003;282(2):90-100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531695>. Accessed August 27, 2018.
 92. Dabiri G, Tumbarello DA, Turner CE, Van De Water L. Hic-5 Promotes the Hypertrophic Scar Myofibroblast Phenotype by Regulating the TGF- β 1 Autocrine Loop. *J Invest Dermatol*. 2008;128(10):2518-2525. doi:10.1038/jid.2008.90
 93. Cheon S, Poon R, Yu C, et al. Prolonged β -catenin stabilization and tcf-dependent transcriptional activation in hyperplastic cutaneous wounds. *Lab Invest*. 2005;85(3):416-425. doi:10.1038/labinvest.3700237

94. Falanga V, Schrayner D, Cha J, et al. Full-thickness wounding of the mouse tail as a model for delayed wound healing: accelerated wound closure in Smad3 knock-out mice. *Wound Repair Regen.* 2004;12(3):320-326. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.012316.x
95. Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol.* 2004;85(2):47-64. doi:10.1111/j.0959-9673.2004.00377.x
96. Song Y, Yao S, Liu Y, et al. Expression levels of TGF- β 1 and CTGF are associated with the severity of Duchenne muscular dystrophy. *Exp Ther Med.* 2017;13(4):1209-1214. doi:10.3892/etm.2017.4105
97. Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol.* 2005;167(1):59-69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972952>. Accessed August 27, 2018.
98. Cheon SS, Wei Q, Gurung A, et al. Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing. *FASEB J.* 2006;20(6):692-701. doi:10.1096/fj.05-4759com
99. Liu J, Wang Y, Pan Q, et al. Wnt/ β -catenin pathway forms a negative feedback loop during TGF- β 1 induced human normal skin fibroblast-to-myofibroblast transition. *J Dermatol Sci.* 2012;65(1):38-49. doi:10.1016/j.jdermsci.2011.09.012
100. Poon R, Nik SA, Ahn J, Slade L, Alman BA. Beta-catenin and transforming growth factor beta have distinct roles regulating fibroblast cell motility and the induction of collagen lattice contraction. *BMC Cell Biol.* 2009;10:38. doi:10.1186/1471-2121-10-38
101. Gospodarowicz D. Molecular and developmental biology aspects of fibroblast growth factor. *Adv Exp Med Biol.* 1988;234:23-39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2850734>. Accessed May 30, 2018.
102. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, et al. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.* 1986;5(10):2523-2528. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3780670>. Accessed May 30, 2018.
103. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. doi:10.1152/physrev.00031.2002
104. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585-601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
105. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A*. 1998;95(10):5672-5677.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576942>. Accessed May 21, 2018.
106. Grose R, Fantl V, Werner S, et al. The role of fibroblast growth factor receptor 2b in skin homeostasis and cancer development. *EMBO J*. 2007;26(5):1268-1278. doi:10.1038/sj.emboj.7601583
 107. Yang J, Meyer M, Müller A-K, et al. Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis. *J Cell Biol*. 2010;188(6):935-952. doi:10.1083/jcb.200910126
 108. Werner S, Smola H, Liao X, et al. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*. 1994;266(5186):819-822. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7973639>. Accessed May 31, 2018.
 109. Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 1997;5(1):12-17. doi:10.1046/j.1524-475X.1997.50106.x
 110. Robson MC, Phillips LG, Lawrence WT, et al. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Ann Surg*. 1992;216(4):401-406; discussion 406-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1417189>. Accessed May 21, 2018.
 111. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7(3):165-197. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021964>. Accessed May 21, 2018.
 112. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays*. 2000;22(2):108-112. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<108::AID-BIES2>3.0.CO;2-M
 113. Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen*. 2006;14(4):457-462. doi:10.1111/j.1743-6109.2006.00143.x
 114. Sasaki T. The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing. *J Dermatol*. 1992;19(11):664-666. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1293151>. Accessed May 21, 2018.
 115. Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*. 1995;270(21):12607-12613. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7759509>. Accessed May 21, 2018.
 116. Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with

- hypoxia. *Circulation*. 1995;92(1):11-14.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7788904>. Accessed May 21, 2018.
117. Namiki A, Brogi E, Kearney M, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1995;270(52):31189-31195. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8537383>. Accessed May 21, 2018.
 118. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer*. 1998;77(6):956-964. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528841>. Accessed May 21, 2018.
 119. Gaudry M, Br gerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood*. 1997;90(10):4153-4161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354686>. Accessed May 21, 2018.
 120. Jazwa A, Loboda A, Golda S, et al. Effect of heme and heme oxygenase-1 on vascular endothelial growth factor synthesis and angiogenic potency of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(7):1250-1263. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.016
 121. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1994;269(43):26988-26995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929439>. Accessed May 21, 2018.
 122. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376(6535):62-66. doi:10.1038/376062a0
 123. Fong G-H, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376(6535):66-70. doi:10.1038/376066a0
 124. SHIBUYA M, CLAESSIONWELSH L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*. 2006;312(5):549-560. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.012
 125. Detmar M, Brown LF, Berse B, et al. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol*. 1997;108(3):263-268. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036922>. Accessed May 21, 2018.
 126. Grotendorst GR, Soma Y, Takehara K, Charette M. EGF and TGF-alpha are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol*. 1989;139(3):617-623. doi:10.1002/jcp.1041390323

127. Brown GL, Curtsinger L, Brightwell JR, et al. Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J Exp Med*. 1986;163(5):1319-1324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3486247>. Accessed May 21, 2018.
128. Tokumaru S, Higashiyama S, Endo T, et al. Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J Cell Biol*. 2000;151(2):209-220. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038170>. Accessed May 21, 2018.
129. Ando Y, Jensen PJ. Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration. *J Invest Dermatol*. 1993;100(5):633-639. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8491986>. Accessed May 21, 2018.
130. Reiss M, Sartorelli AC. Regulation of growth and differentiation of human keratinocytes by type beta transforming growth factor and epidermal growth factor. *Cancer Res*. 1987;47(24 Pt 1):6705-6709. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2445478>. Accessed May 21, 2018.
131. Tissue Engineering and Regenerative Medicine | National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>.
132. Chagastelles PC, Nardi NB. Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int Suppl*. 2011;1(3):63-67. doi:10.1038/KISUP.2011.15
133. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *Stem Cells*. 2012;30(5):804-810. doi:10.1002/stem.1076
134. Edwards RG. IVF and the history of stem cells. *Nature*. 2001;413(6854):349-351. doi:10.1038/35096649
135. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science (80-)*. 1998;282(5391):1145-1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
136. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik N V, Panasyuk AF, Keiliss-Borok I V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-340. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4150881>. Accessed September 7, 2018.
137. Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-247. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654088>. Accessed September 7, 2018.

138. Prockop DJ. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science (80-)*. 1997;276(5309):71-74. doi:10.1126/science.276.5309.71
139. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*. 2010;21(9):1045-1056. doi:10.1089/hum.2010.115
140. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med*. 2009;4(2):265-273. doi:10.2217/17460751.4.2.265
141. RODBELL M. METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. *J Biol Chem*. 1964;239:375-380.
142. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228. doi:10.1089/107632701300062859
143. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. Raff M, ed. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-4295. doi:10.1091/mbc.e02-02-0105
144. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-1260. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09
145. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006;312(6):727-736. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.021
146. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem Cells*. 2006;24(2):376-385. doi:10.1634/stemcells.2005-0234
147. Ojeh NO, Navsaria HA. An *in vitro* skin model to study the effect of mesenchymal stem cells in wound healing and epidermal regeneration. *J Biomed Mater Res Part A*. 2014;102(8):2785-2792. doi:10.1002/jbm.a.34950
148. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science (80-)*. 1999;284(5411). <http://science.sciencemag.org/content/284/5411/143>. Accessed August 11, 2017.
149. Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2014;22(3):313-325. doi:10.1111/wrr.12173

150. Van Brunt J, Klausner A. Growth Factors Speed Wound Healing. *Nat Biotechnol.* 1988;6(1):25-30. doi:10.1038/nbt0188-25
151. FALANGA V. Growth Factors and Wound Healing. *J Dermatol Surg Oncol.* 1993;19(8):711-714. doi:10.1111/j.1524-4725.1993.tb00414.x
152. Cross KJ, Mustoe TA. Growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am.* 2003;83(3):531-545. doi:10.1016/S0039-6109(02)00202-5
153. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005;54(3):132-141. doi:10.2302/kjm.54.132
154. Sánchez-Sánchez R, Brena-Molina A, Martínez-López V, et al. Generation of Two Biological Wound Dressings as a Potential Delivery System of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ASAIO J.* 2015;61(6):718-725. doi:10.1097/MAT.0000000000000277
155. Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129(1):118-129. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x
156. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003;75(3):389-397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9
157. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm.* 2005;2(1):8. doi:10.1186/1476-9255-2-8
158. YUAN F, LEI Y, FU X, SHENG Z, CAI S, SUN T. [Promotive effect of adipose-derived stem cells on the wound model of human epidermal keratinocytes in vitro]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2008;46(20):1575-1578. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19094656>. Accessed August 11, 2017.
159. Yu LH, Kim MH, Park TH, et al. Improvement of cardiac function and remodeling by transplanting adipose tissue-derived stromal cells into a mouse model of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2010;139(2):166-172. doi:10.1016/j.ijcard.2008.10.024
160. PARK B-S, JANG KA, SUNG J-H, et al. Adipose-Derived Stem Cells and Their Secretory Factors as a Promising Therapy for Skin Aging. *Dermatologic Surg.* 2008;34(10):1323-1326. doi:10.1111/j.1524-4725.2008.34283.x
161. Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1(3):179-184. doi:10.1002/term.20
162. Katari R, Peloso A, Orlando G. Tissue engineering and regenerative

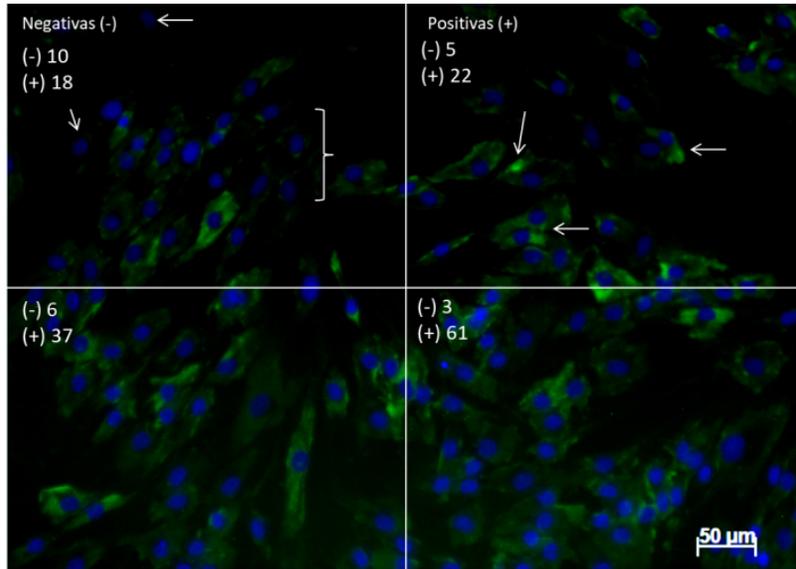
- medicine: semantic considerations for an evolving paradigm. *Front Bioeng Biotechnol.* 2014;2:57. doi:10.3389/fbioe.2014.00057
163. Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface.* 2007;4(17):999-1030. doi:10.1098/rsif.2007.0220
164. Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(5):551-558. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580588>. Accessed January 17, 2019.
165. Halim AS, Khoo TL, Mohd Yussof SJ. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. *Indian J Plast Surg.* 2010;43(Suppl):S23-8. doi:10.4103/0970-0358.70712
166. Sheikholeslam M, Wright MEE, Jeschke MG, Amini-Nik S. Biomaterials for Skin Substitutes. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(5):1700897. doi:10.1002/adhm.201700897
167. Halim AS, Khoo TL, Mohd Yussof SJ. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. *Indian J Plast Surg.* 2010;43(Suppl):S23-8. doi:10.4103/0970-0358.70712
168. Hammond SA, Tsonis C, Sellins K, et al. Transcutaneous immunization of domestic animals: opportunities and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;43(1):45-55. doi:10.1016/S0169-409X(00)00076-4
169. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol.* 2015;66(1):14-21. doi:10.1016/j.molimm.2014.10.023
170. Mounsey K, Ho M-F, Kelly A, et al. A Tractable Experimental Model for Study of Human and Animal Scabies. Kittayapong P, ed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(7):e756. doi:10.1371/journal.pntd.0000756
171. Agay D, Scherthan H, Forcheron F, et al. Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: Development of a new minipig model. *Exp Hematol.* 2010;38(10):945-956. doi:10.1016/j.exphem.2010.06.008
172. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(17):3241-3255. doi:10.1007/s00018-014-1612-5
173. Ansell DM, Holden KA, Hardman MJ. Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Exp Dermatol.* 2012;21(8):581-585. doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01540.x
174. Jung Y, Son D, Kwon S, Kim J, Han K. Experimental pig model of clinically relevant wound healing delay by intrinsic factors. *Int Wound J.*

- 2013;10(3):295-305. doi:10.1111/j.1742-481X.2012.00976.x
175. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43. doi:10.1159/000339613
176. Yildirimer L, Thanh NTK, Seifalian AM. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends Biotechnol.* 2012;30(12):638-648. doi:10.1016/j.tibtech.2012.08.004
177. Bain BJ. Morbidity associated with bone marrow aspiration and trephine biopsy - a review of UK data for 2004. *Haematologica.* 2006;91(9):1293-1294. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16956842>. Accessed October 8, 2018.
178. ISAPS. *EL Último Estudio Internacional Incremento Global En Cirugía Estética.* new york; 2018. https://www.isaps.org/wp-content/uploads/2018/11/2017-Global-Survey-Press-Release_SP.pdf. Accessed August 14, 2019.
179. Deng J, Shi Y, Gao Z, et al. Inhibition of Pathological Phenotype of Hypertrophic Scar Fibroblasts Via Coculture with Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* 2018;24(5-6):382-393. doi:10.1089/ten.TEA.2016.0550
180. Kim W-S, Park B-S, Sung J-H, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007;48(1):15-24. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.05.018
181. Dososaputro I, Hoekstra LT, Rahmania D, Perdanakusuma DS. Role of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Full Thickness Wound Healing. *J Stem Cell Res Ther.* 2017;07(09):1-6. doi:10.4172/2157-7633.1000398
182. Li Y, Zhang W, Gao J, et al. Adipose tissue-derived stem cells suppress hypertrophic scar fibrosis via the p38/MAPK signaling pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):102. doi:10.1186/s13287-016-0356-6
183. Kim W-S, Park B-S, Sung J-H, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007;48(1):15-24. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.05.018
184. Bliley JM, Argenta A, Satish L, et al. Administration of adipose-derived stem cells enhances vascularity, induces collagen deposition, and dermal adipogenesis in burn wounds. *Burns.* 2016;42(6):1212-1222. doi:10.1016/j.burns.2015.12.007
185. Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep.* 2016;6(1):32993. doi:10.1038/srep32993

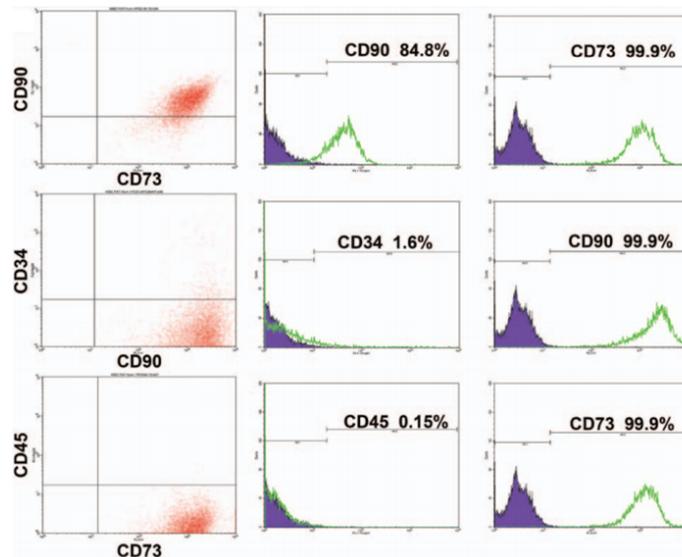
186. Zhang Q, Liu L-N, Yong Q, Deng J-C, Cao W-G. Intralesional injection of adipose-derived stem cells reduces hypertrophic scarring in a rabbit ear model. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):145. doi:10.1186/s13287-015-0133-y
187. McGee GS, Davidson JM, Buckley A, et al. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res.* 1988;45(1):145-153. doi:10.1016/0022-4804(88)90034-0
188. Ono I. The effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the breaking strength of acute incisional wounds. *J Dermatol Sci.* 2002;29(2):104-113. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088611>. Accessed May 30, 2018.
189. Spyrou GE, Naylor IL. The effect of basic fibroblast growth factor on scarring. *Br J Plast Surg.* 2002;55(4):275-282. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160530>. Accessed May 30, 2018.
190. Ono I, Akasaka Y, Kikuchi R, et al. Basic fibroblast growth factor reduces scar formation in acute incisional wounds. *Wound Repair Regen.* 2007;15(5):617-623. doi:10.1111/j.1524-475X.2007.00293.x
191. Akasaka Y, Ono I, Kamiya T, et al. The mechanisms underlying fibroblast apoptosis regulated by growth factors during wound healing. *J Pathol.* 2010;221(3):285-299. doi:10.1002/path.2710
192. Park K, Amano H, Ito Y, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) tyrosine kinase signaling facilitates granulation tissue formation with recruitment of VEGFR1+ cells from bone marrow. *Anat Sci Int.* 2018;93(3):372-383. doi:10.1007/s12565-017-0424-8
193. Lu Y, Azad N, Wang L, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase/akt regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(4):432-441. doi:10.1165/rcmb.2009-0002OC
194. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-Induced VEGF and Collagen I Expressions Are Associated With Angiogenesis and Fibrogenesis in Experimental Cirrhosis. 2002. doi:10.1053/jhep.2002.32524
195. Khan S, Villalobos MA, Choron RL, et al. Fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor play a critical role in endotheliogenesis from human adipose-derived stem cells. *J Vasc Surg.* 2017;65(5):1483-1492. doi:10.1016/j.jvs.2016.04.034
196. Wenczak BA, Lynch JB, Nanney LB. Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. *J Clin Invest.* 1992;90(6):2392-2401. doi:10.1172/JCI116130
197. Falanga V, Eaglstein WH, Bucalo B, Katz MH, Harris B, Carson P. Topical use of human recombinant epidermal growth factor (h-EGF) in venous ulcers. *J Dermatol Surg Oncol.* 1992;18(7):604-606. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1624634>. Accessed February 20, 2019.

198. Kurata S, Hata R. Epidermal growth factor inhibits transcription of type I collagen genes and production of type I collagen in cultured human skin fibroblasts in the presence and absence of L-ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *J Biol Chem*. 1991;266(15):9997-10003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2033086>. Accessed February 20, 2019.
199. Hata R, Sunada H, Arai K, et al. Regulation of collagen metabolism and cell growth by epidermal growth factor and ascorbate in cultured human skin fibroblasts. *Eur J Biochem*. 1988;173(2):261-267. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3258821>. Accessed February 20, 2019.
200. Barrandon Y, Green H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell*. 1987;50(7):1131-1137. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3497724>. Accessed February 20, 2019.
201. Yamane K, Ihn H, Tamaki K. Epidermal growth factor up-regulates expression of transforming growth factor β receptor type II in human dermal fibroblasts by phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway: Resistance to epidermal growth factor stimulation in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2003;48(6):1652-1666. doi:10.1002/art.11029

10. ANEXOS (resultados complementarios)

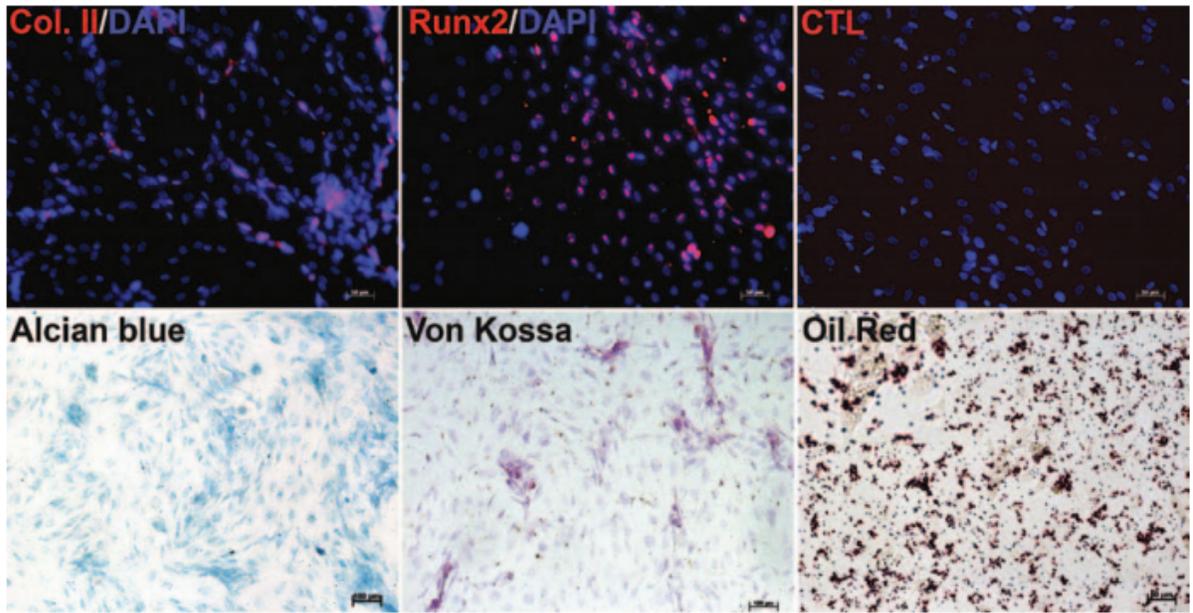


ANEXO 1. Evaluación de la expresión de 1B10 en fibroblastos extraídos de biopsias de piel del abdomen. En el cuadrante superior derecho se señalan las células consideradas negativas (-) mientras que el cuadrante izquierdo muestra ejemplos de células positivas (+). Cada cuadrante muestra el número de células (-) y (+) contadas dentro del área correspondiente.



ANEXO 2. Inmunofenotipo de células troncales mesenquimales obtenidas a partir de grasa abdominal (ADMSC). Inmunofenotipo por citometría de flujo en donde muestran ser positivas para los marcadores mesenquimales en contraste con la ausencia de los marcadores hematopoyéticos.

Sánchez-Sánchez et al, 2015



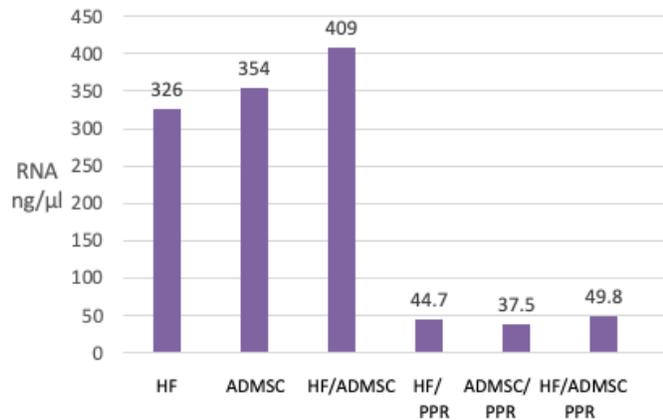
ANEXO 3. Diferenciación de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Las ADMSC aisladas de abdominoplastías tienen la capacidad de diferenciarse células de diferentes tejidos: condrocitos (A), osteocitos (B) y adipocitos (C).

Sánchez-Sánchez et al, 2015



ANEXO 4. Estandarización del cocultivo de HF y ADMSC sobre PPR. Se llevó a cabo un primer ensayo en donde se incluyeron las condiciones: HF sembrados sin andamio (HF), fibroblastos sembrados sobre el andamio (HF/PPR), ADMSC sembradas sin andamio (ADMSC), ADMSC sembradas sobre el andamio (ADMSC/PPR), cocultivo sin andamio (HF/ADMSC) y cocultivo sobre el andamio (HF/ADMSC/PPR). Se realizaron 3 ensayos independientes en placas de 6 pozos, en donde se sembraron 3×10^6 células en cada pozo (1×10^6 de cada linaje para el cocultivo) con DMEM suplementado con 1% SFB y 1% A.A, se mantuvieron en cultivo por 12 horas.



ANEXO 5. Cuantificación de RNA total. Se retiraron los medios de cultivo y se procedió a la extracción del RNA total de las células. El material genético fue cuantificado y se percibió una disminución en el rendimiento del RNA extraído de los cultivos sobre el andamio, lo cual se atribuyó a la pérdida de células durante el proceso de la extracción debido a la dificultad para desprender las células del andamio.