



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES
ESTIMULADAS CON VIBRACIONES USANDO UN
SISTEMA DE EPIFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS DIGITAL
DE IMÁGENES.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

GERARDO CHAVEZ LOZANO

TUTORA: Dra. PATRICIA GONZÁLEZ ALVA



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.

Agradecimientos

Un paso a la vez fue lo que me dije al principio de este viaje... Claramente no tenía idea del significado tan pesado que estas palabras adquirieron con el pasar de los años: que no todos los pasos serían en una misma dirección o resultado directo de mi voluntad, que algunos días las piernas fallaban y otros más veía compañeros correr mientras parecía que yo iba hacia atrás. Para el observador casual esto ya no parecía una carrera, pero para el corredor esos pasos titubeantes se sentían como todo un maratón.

Al final llegué; aún si no fui el único que cargó la antorcha todo el recorrido, ahora entiendo que las metas más grandes se alcanzan con perseverancia, resiliencia, mucho esfuerzo y la ayuda de grandes personas que sin necesidad de hacerlo te extienden la mano.

Por eso hoy agradezco:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Odontología, por haberme dado la maravillosa oportunidad de estudiar una licenciatura.

A mi tutora de tesina la Dra. Patricia González Alva, por su gran paciencia, apoyo y guía durante este proceso.

A la Dra. Elizabeth Powell, por siempre abrirme las puertas, incluso en los peores momentos.

A todos los docentes que me ayudaron a crear orden y sentido en los conocimientos y habilidades que me regalaban.

A mi familia por todo lo que hicieron para que saliera adelante a lo largo de mi vida.

A mi más fiel compañero, por ser un enorme apoyo emocional y quien sin importar las circunstancias siempre tendrá alegría que dar a los demás.

A todas las personas que, aunque fuera por sólo algunos pasos, caminaron junto a mí y quizá sin saberlo me ayudaron a estar donde hoy estoy.

Al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN223521 por los recursos financieros que permitieron realizar el presente proyecto.

EVALUACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES ESTIMULADAS CON VIBRACIONES USANDO UN SISTEMA DE EPIFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS DIGITAL DE IMÁGENES.

Índice

I. Resumen	3
II. Introducción.....	4
III. Antecedentes	5
1. Regeneración y reparación tisular en tejidos craneofaciales ..	5
1.1 Células troncales (madre) mesenquimales derivadas de tejidos dentales	6
1.1.1 Pluripotencialidad	9
1.1.2 Aplicaciones	10
2. Migración de células mesenquimales y reparación tisular	14
2.1 Factores químicos	16
2.1.1 Quimiocinas	16
2.1.2 Citocinas	17
2.1.3 Factores de crecimiento	18
2.2 Factores mecánicos	18
2.2.1 Presión mecánica	19
2.2.2 Tensión de corte	19
2.2.3 Elasticidad de la matriz	19
2.2.4 Microgravedad	20
IV. Justificación y planteamiento	21

V. Hipótesis	21
VI. Objetivos	21
VII. Metodología	22
VIII. Resultados	23
IX. Discusión	27
X. Conclusiones	29
XI. Referencias bibliográficas	30
XII. Anexos	

I. Resumen

Las investigaciones recientes sobre la regeneración tisular se han basado en dos estrategias principales, una de ellas es el trasplante de células mesenquimales, cuyo objetivo es llevar células mesenquimales al sitio de la lesión. La otra estrategia se denomina homing, que se entiende como el proceso mediante el cual un material o condición estimula la migración de células mesenquimales al sitio que debe ser reparado. Para esta última estrategia se ha intentado estimular a las células mesenquimales mediante medios químicos, cargas eléctricas, cargas mecánicas, y vibraciones. Los estudios sobre la migración de las células mesenquimales de origen dental siguen siendo escasas. Por ello, el presente tuvo como objetivo analizar los efectos de las vibraciones a 30Hz en células mesenquimales de origen dental, mediante el análisis digital de tinciones fluorescentes. Para lo anterior se utilizaron 30 microfotografías de tinciones de DAPI, donde se había realizado el ensayo de la herida- Las fotos incluyeron 15 de células vibradas y 15 de células no vibradas. La tinción de DAPI permite teñir el núcleo de las células y dar una imagen más confiable de su patrón de migración conforme a la inclinación del núcleo. El análisis propuesto en el presente trabajo, utilizando un software de uso libre, el Fiji Image J, permitió evaluar la distancia y la capacidad del cierre de la herida. Se observó que la vibración a las 12 h tuvo una diferencia significativa comparado con el control (0.002). Esto fue que las vibraciones de 30 hz inhibieron el cierre de la herida (132.72 μm), comparándolas con las células no vibradas (42.35 μm). Sin embargo, pasada las 24 h, aunque el cierre de la heridas fue menos eficiente en las células vibradas (92.72 μm), que en las no vibradas (0 μm), se observó que las células tendían a migrar en dirección de la señal vibratoria, en forma de hojas o filas de células, lo que sugiere que las vibraciones estimulan patrones de migración colectiva, en vez de la migración individual. El análisis propuesto en el presente trabajo es un análisis sistémico que permite la evaluación de ensayos de migración como el ensayo del cierre de la herida, así como dar una aproximación de los patrones de migración en presencia de estímulos vibratorios. Se recomienda que se realicen ensayos complementarios para entender el efecto de las vibraciones en células mesenquimales de origen dental.

II. Introducción

La regeneración y la reparación tisular son procesos que se dan en todos los organismos, algunos tienen la capacidad de regenerar miembros y órganos completos como es el caso del *Ambystoma mexicanum* (Ajolote) (1). Por otro lado, los seres vivos como los mamíferos poseen una capacidad muy reducida de regenerar tejidos.

En este sentido, la recuperación de la arquitectura y funcionalidad del tejido perdido o dañado a causa de enfermedades o trauma es sumamente difícil de alcanzar, en su lugar se observa un mecanismo de reparación tisular que se limita a reemplazar el tejido dañado con tejido cicatricial que es fibroso, el cual en ocasiones no mantiene todas las funciones del tejido original (2).

Actualmente el campo de la ingeniería de tejidos es entendido como el uso de los principios y métodos de la ingeniería, la biología y la bioquímica orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos de los mamíferos, así como el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función (3).

Tomando esto en cuenta sería imposible hablar de ingeniería de tejidos o regeneración sin primero hablar de las células que son los componentes básicos de los tejidos. Los grupos de células generalmente secretan su propia estructura de soporte llamada matriz extracelular.

Esta matriz o andamio sirve como soporte para las células, y también funciona como una red de distribución para varias moléculas de señalización. Como resultado, la célula recibe mensajes de muchas fuentes disponibles en el entorno local, sin embargo sólo las células madre (de ahora en adelante troncales) poseen dos características fundamentales para la regeneración tisular:

1. Pueden dividirse y renovarse a sí mismas durante un periodo prolongado de tiempo.
2. Tienen el potencial de diferenciarse en células especializadas.

En organismos adultos estas células residen en nichos especializados dentro de cada tejido, se encargan de reemplazar las células perdidas como parte del

proceso natural de homeostasis o como parte del proceso de regeneración tisular (4)

III. Antecedentes

1. Regeneración y Reparación tisular en tejidos craneofaciales

La regeneración o restitución de tejidos es un concepto para nada ajeno en el imaginario colectivo de la humanidad, la primera referencia histórica de la ingeniería de tejidos data del Renacimiento, en un lienzo atribuido a Fray Angelico, donde aparecen los Santos Cosme y Damián reparando la pierna de un soldado herido en batalla (5).

La representación de un milagro obrado por los santos, quienes en dicha obra se muestran retirando la pierna presuntamente necrótica de un hombre y reemplazandola por una sana de un difunto, es persistente y a lo largo de los años ha ido tomando distintas formas.

Al principio quizás como parte del pensamiento mágico, pero eventualmente la humanidad comenzó el largo camino para materializar esa idea.

Profundizando en lo anterior, no fue sino hasta el siglo XIX con la introducción de la antisepsia y la anestesia que la cirugía fue una realidad para los pacientes (6).

Posteriormente, el desarrollo de la ingeniería metalúrgica llevó a la implementación de aleaciones biocompatibles, seguido de los avances en la ingeniería química y de materiales poliméricos que transformaron el tratamiento de fracturas, dando paso a la fabricación de pines, tornillos, prótesis y andamios utilizados con fines terapéuticos.

En la década de 1980 se introdujo el término de ingeniería de tejidos en una reunión que se llevó a cabo en Keystone, Colorado, aunque en realidad el uso de este término en esa época era muy distinto al actual.

En aquellos años se refería a la manipulación quirúrgica del tejido y al uso de prótesis, aunque ya planteaba las bases de usar un “*andamio artificial*” que se pudiera combinar con tejido vivo. Según lo investigado para este trabajo, la primera vez que se utilizó de la manera en que se usa hoy en día, fue en un artículo de 1991 titulado “*Functional Organ Replacement: The New Technology of Tissue Engineering*”(5).

El complejo craneofacial está compuesto por una variedad de elementos, como el tejido nervioso o los vasos sanguíneos, multitud de huesos y articulaciones (dentoalveolar, ATM, etc), glándulas e incluso órganos especializados, los órganos dentarios; el conjunto de estas estructuras cumplen varias funciones, como la masticación (comienzo del proceso digestivo), sensoriales (gusto) y aquellas que en el caso de los humanos proporcionan además armonía facial y la capacidad de articular palabras (7).

Es así que el daño a este complejo puede ocasionar desde una masticación defectuosa o incompleta, y por tanto digestión deficiente, hasta efectos psicosociales negativos en los pacientes afectados por pérdida parcial o total de alguna de estas estructuras. En general, el daño a estas estructuras es consecuencia de neoplasias, infección, trauma e incluso defectos genéticos o congénitos.

Además, existen diversas enfermedades que pueden ocasionar daño al complejo maxilofacial.

Tomando en cuenta lo anterior se debe enfatizar la necesidad de la restitución rápida, estética y funcional de los tejidos o estructuras perdidos o dañados (8). De esta necesidad han derivado distintos esfuerzos por reconstruir el complejo craneofacial, mismos que han ido evolucionando a la par de la multitud de ciencias y técnicas involucradas.

A continuación se dará una descripción breve de algunos de los avances fundamentales necesarios para poder entender someramente en dónde está hoy situado el campo de la ingeniería de tejidos craneofaciales. Desde luego, cubrir en su totalidad aquellos avances escapa al alcance de este trabajo (7).

1.1 Células troncales (madre) mesenquimales derivadas de tejidos dentales

Los campos de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos basada en terapia celular surgen como una alternativa para tratar diferentes tejidos y defectos en órganos dañados. El uso de células troncales, o de células madre de adultos, toma un interés particular cuando se trata de las aplicaciones de medicina translacional.

Recientemente, las células troncales derivadas de tejidos dentales han sido aisladas y caracterizadas por diferentes investigadores. Es así que este tipo de células poseen características prometedoras, incluyendo la capacidad de autorrenovación, proliferación rápida, formación de colonias, diferenciación a múltiples linajes y expresión de un perfil pluripotente.

A la fecha, en la literatura se reporta el aislamiento y caracterización de cinco diferentes tipos de células troncales derivadas de tejidos dentales (9):

- 1) Células troncales de la pulpa dental (DPSCs)
- 2) Células troncales de dientes deciduos exfoliados (SHED)
- 3) Células troncales de la papila apical (SCAP)
- 4) Células troncales del ligamento periodontal (PDLSCs)
- 5) Células troncales del folículo dental (DFPCs).

La Figura 1 ilustra los tejidos dentales de los cuales se han extraído y caracterizado exitosamente células troncales mesenquimales derivadas de los tejidos dentales. Estas células representan un avance dentro de la medicina regenerativa, así como una herramienta potencial para el desarrollo de modelos que permitan estudiar a profundidad la biología de este tipo de células, para que, en un futuro, puedan aplicarse en terapias celulares.

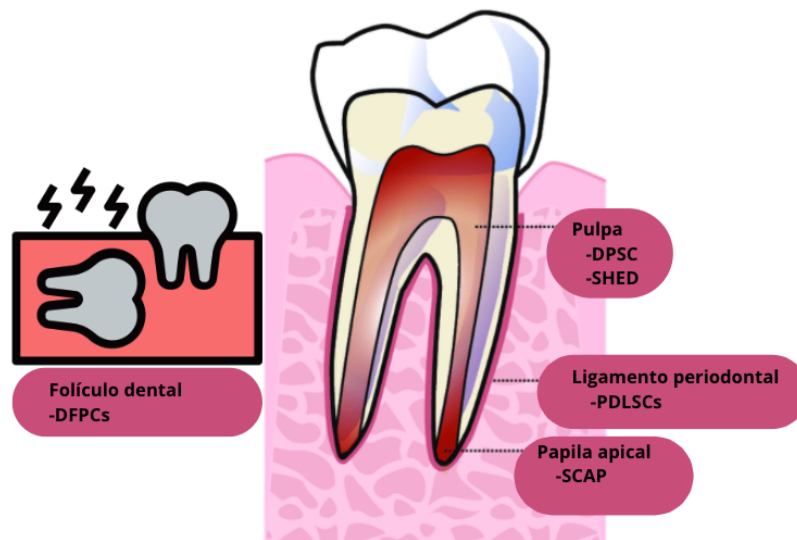


Figura 1: Zonas de los órganos dentales de los cuales se han aislado células troncales.

DPSCs: células troncales de la pulpa dental, SHED: células troncales de dientes deciduos exfoliados,

PDLSCs: células troncales del ligamento periodontal, SCAP: Células troncales de la papila apical,

DFPCS: Células troncales del folículo dental. Fuente, elaboración propia basada en Nguyen y Chea

(10).

Si bien las células troncales derivadas de tejidos dentales comparten características generales de troncalidad, también muestran características diferentes entre ellas. La Tabla 1 enlista las propiedades de las células troncales mesenquimales de origen dental y algunos de los análisis que se les han realizado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

Es importante mencionar que para el presente trabajo se utilizaron células troncales de origen dental de pacientes adultos jóvenes mexicanos; por ello, los resultados podrían considerarse como una cercana representación de la biología de esta población.

Además, los modelos que emplean células troncales mesenquimales de origen dental han ido adquiriendo mayor uso con el tiempo, porque, según se ha visto, reflejan la respuesta normal de los tejidos. Caso contrario al uso de células neoplásicas o inmortalizadas, modelos que hasta hace algunas décadas eran los más utilizados para el desarrollo de fármacos, y biomateriales.

Tabla 1: Propiedades de las células troncales mesenquimales derivadas de tejidos dentales

Célula Troncal	Expiación de población celular	In vivo	In vitro
DPSCs	60 - > 120	Diferenciación a linaje: Osteo/Dentinogénico Adipogénico Condrogénico Miogénico Neurogénico	+ + + + + + Formación de complejos tipo dentino-pulpar Células similares a los odontoblastos Tejido de tipo óseo
SHED	> 140	Diferenciación a linaje Dentinogénico Adipogénico Chondrogenico Miogénico Neurogénico Osteoinductivo	+ + + + + + Forman tejido similar a la interfase de la dentina-pulpa Formación de células similares a odontoblastos No forman complejo dentino-pulpar Formación de tejido óseo
SCAP	> 70	Diferenciación a linaje Dentinogénico Adipogénico Condrogénico Miogénico Neurogénico	+ + ND ND + + Forman complejo dentina-pulpa Forman complejo similar al dentino-pulpar Forman células similares a odontoblastos.

Tabla 1: Propiedades de las células troncales mesenquimales derivadas de tejidos dentales

Célula Troncal	Expiación de población celular	In vivo	In vitro
PDLSCs	ND	Diferenciación a linaje: Osteo/Cementogénico Adipogénico Condrogénico Miogénico Neurogénico	+ + + ND + Forman tejido similar al cemento. Forman tejido compatible con el ligamento periodontal
DFPCs	ND	Diferenciación a linaje: Cementogénico Odontogénico Adipogénico/ Condrogénico Miogénico Neurogénico	+ + + + + ND Forman tejido compatible con el ligamento periodontal. Forman matriz cementoide

DPSCs: células troncales de la pulpa dental, SHED: células troncales de dientes deciduos exfoliados, PDLSCs: células troncales del ligamento periodontal, SCAP: Células troncales de la papila apical, DFPCS: Células troncales del folículo dental, ND: no descrita. Fuente, información tomada de referencia (11).

1.1.1 Pluripotencialidad

La pluripotencialidad se refiere a la capacidad de las células troncales para diferenciarse en cualquiera de las tres líneas germinales: el endodermo, el cual da origen a los epitelios de revestimiento; el mesodermo, del cual deriva el tejido conectivo; y el ectodermo, que da origen a la epidermis, esmalte dental y sistema nervioso; esta capacidad solo la tienen las células embrionarias.

Por el contrario, las células troncales mesenquimales, son capaces de diferenciarse a los linajes osteoblástico, condroblástico, adipogénico y nervioso.

El aislamiento *in vitro* de células troncales pluripotentes está ligada a varios descubrimientos históricos, desde el cultivo inicial y el fenotipo de células de carcinoma embrionario pluripotentes hasta la reciente inducción de la pluripotencia en células somáticas.

En esta línea temporal del desarrollo, se ha revelado que factores de transcripción clave, como Oct4, Sox2 o Nanog, no sólo regulan sino que inducen funcionalmente la pluripotencia.

Estos reguladores maestros tempranos del desarrollo controlan las vías de señalización del desarrollo que afectan al ciclo celular, regulan la expresión génica, modulan el estado epigenético y reparan los daños en el ADN. Además de los factores de transcripción, recientemente se ha demostrado que los microARN desempeñan un importante papel en la expresión génica y están integrados en la red de regulación que orquesta el desarrollo celular (12).

1.1.2 Aplicaciones

La literatura sobre células troncales de origen dental, de entre el 2002 hasta aproximadamente el 2009 era muy escasa; según Campanella (13) constaba de tan sólo 936 artículos, con un solo ensayo clínico, y 6 reportes de casos.

Posteriormente, y después del 2019, el interés en este tópico de investigación despegó hasta alcanzar cerca de 5177 artículos, y aunque los resultados de la mayoría de los ensayos clínicos registrados y enfocados a tratamientos dentales siguen sin estar disponibles, el aislamiento y la caracterización de células troncales de origen dental es definitivamente una ciencia emergente que llevará a resultados importantes en el futuro.

Actualmente, la mayoría de los ensayos clínicos que utilizan células troncales de origen dental están enfocados en la regeneración periodontal, y en tratamientos de endodoncia. Profundizando en lo anterior, la idea de desarrollar tratamientos pulpares con base en células es fascinante; sin embargo, los protocolos actuales se limitan a dientes permanentes inmaduros con necrosis pulpar, lo que constituye una minoría dentro de los tratamientos endodónticos (13).

Entre las aplicaciones, están las siguientes:

- Revascularización del conducto radicular, varios informes de casos han documentado la revascularización de los sistemas de conductos radiculares necróticos mediante la desinfección seguida del

establecimiento de una hemorragia en el sistema de conductos a través de la sobreinstrumentación. El uso de irrigantes intracanales (NaOCl y clorhexidina) junto con la colocación de antibióticos (p. ej, una mezcla de ciprofloxacina, metronidazol y pasta de minociclina), durante varias semanas, es un paso crítico, ya que desinfecta eficazmente los sistemas de canales radiculares y aumenta la revascularización de los dientes avulsionados y necróticos. El proceso de revascularización ofrece escasas posibilidades de rechazo inmunitario y de transmisión de patógenos, ya que la regeneración del tejido se produce gracias a las células sanguíneas del propio paciente. Sin embargo, algunas limitaciones críticas de esta técnica implica que se requiere precaución, ya que no se ha identificado la fuente del tejido regenerado; además, la concentración y composición de las células atrapadas en el coágulo de fibrina son impredecibles. Se requieren más estudios animales y clínicos para investigar el potencial de esta técnica, antes de que su uso general pueda recomendarse en pacientes. (6)

- Terapia de células troncales somáticas, el proceso consiste en inyectar células madre postnatales (derivadas de la piel, la mucosa bucal, la grasa y el hueso) en sistemas de conductos radiculares desinfectados tras la apertura del ápice. Este proceso tiene muchas ventajas, como la recolección y administración de células madre autógenas mediante una jeringa, que es relativamente fácil; y el potencial de estas células para inducir la regeneración de la pulpa nueva. Sin embargo, hay varias desventajas, como que las células pueden tener una baja tasa de supervivencia y que también pueden migrar a diferentes lugares dentro del cuerpo. En todo caso, se deben considerar los tres elementos centrales (células, factores de crecimiento y andamio) para maximizar el potencial de éxito de la regeneración pulpar. (14)
- Implantación de pulpar, las células pulpares pueden cultivarse en filtros

de membrana biodegradables para transformar los cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales. La facilidad para cultivar estas células en filtros en el laboratorio, para la evaluación de la citotoxicidad de los materiales de prueba, se reconoce como la principal ventaja de este sistema de implantación. Los problemas potenciales asociados a la implantación de láminas de tejido pulpar cultivado es que requiere procedimientos especializados para una adecuada adherencia a las paredes del conducto radicular. Como las láminas de células carecen de vascularidad, sólo la porción apical de los sistemas de canales recibirá estas construcciones celulares, y los sistemas de canales coronales se llenarán con andamios capaces de soportar la proliferación celular.(15)

- Implantación y suministro de andamios; un andamio debe contener factores de crecimiento, proteína morfogénica ósea (BMP), factores de crecimiento de fibroblastos y factores de crecimiento endotelial vascular, para ayudar a la proliferación y diferenciación de las células madre, además de tener nutrientes que promueven la supervivencia y el crecimiento de las células, así como antibióticos para evitar cualquier crecimiento bacteriano en los sistemas de canales. Los materiales de los andamios pueden ser naturales o sintéticos, biodegradables o permanentes. Los materiales sintéticos, como el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico y la policaprolactona, se degradan en el cuerpo humano y se han utilizado con éxito para la ingeniería de tejidos.
- Los hidrogeles son andamios inyectables que pueden administrarse con jeringa y tienen el potencial de ser no invasivos; también son fáciles de administrar en los sistemas de conductos radiculares. Si bien poseen esas ventajas, se encuentran en una fase temprana de investigación. En la perspectiva de que los hidrogeles sean más prácticos, la investigación se centra en hacerlos fotopolimerizables,

para que formen estructuras rígidas una vez implantados en el lugar del tejido.

- Se han utilizado células madre en la ingeniería tisular de una articulación temporomandibular con forma humana. Alhadlaq y Mao, utilizaron células derivadas de MSC encapsuladas en un hidrogel de diacrilato de {etilenglicol} que se moldeó en un cóndilo mandibular humano adulto en capas estratificadas pero integradas de cartílago y hueso. Los injertos osteocondrales, con forma de ATM humana, se implantaron en ratones inmunodeficientes durante un máximo de 12 semanas. Una vez recogidos, los cóndilos de la articulación mandibular creados por el tejido conservaron su forma y dimensiones.(16)

Según Pittenger, *et al*, las CMM derivadas de la médula ósea se están considerando para la reparación del hueso craneofacial e incluso para la sustitución o regeneración de los tejidos orales. La reconstrucción de defectos craneofaciales y dentales mediante CMM evita muchas de las limitaciones de las técnicas de autoinjerto o aloinjerto. Se están realizando estudios clínicos con células madre para el aumento de la cresta alveolar y los defectos óseos largos. También se utilizan injertos óseos vascularizados en desarrollo con células madre, y se ha llevado a cabo la reconstrucción de la mandíbula reseca de un paciente mediante esta técnica (14).

- Inmunomodulación. Las MSC han surgido como una estrategia terapéutica prometedora debido a su tropismo con otros tipos de células, así como a sus funciones inmunomoduladoras. La capacidad inmunomoduladora de las MSC está regulada por diferentes citoquinas inflamatorias, y la interacción entre las células inmunitarias y las MSC podría contribuir a la regeneración así como a la progresión de diferentes enfermedades inflamatorias. Los principales mecanismos implicados en la inmunomodulación de las MSC son el contacto célula

a célula y la actividad paracrina primada con citoquinas, quimiocinas, vesículas extracelulares, estímulos inflamatorios o el cocultivo con otras células. Por lo tanto, la imprimación o la habilitación de las MSC ha convertido la terapia sin células en un método controlable, manejable y factible. Sin embargo, aún quedan varias cuestiones por resolver . Las MSC son muy heterogéneas y cambian significativamente con estímulos inflamatorios o antiinflamatorios. Por tanto, es difícil entender cómo la variabilidad de las MSC influye en sus efectos inmunomoduladores inducidos. Es posible que las MSC viables provoquen mecanismos inmunomoduladores más complejos debido a su secretoma intacto. Los trabajos futuros deberán explorar la influencia de otros factores y/o de la inflamación crónica en la inmunomodulación mediada por las MSC. Esto tiene el potencial de identificar nuevos métodos de acondicionamiento para mejorar la eficacia de las MSC y minimizar la variación en la efectividad paracrina de las MSC y la eficacia terapéutica, especialmente en lo que respecta a la traducibilidad clínica (16).

2. Migración de células mesenquimales y reparación tisular

Como se ha mencionado anteriormente las células troncales mesenquimales (MSCs) son células adultas con la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en diversos linajes celulares, incluidos el adipogénico, condrogénico y osteogénico (Figura 2).

Diferenciación en células troncales mesenquimales

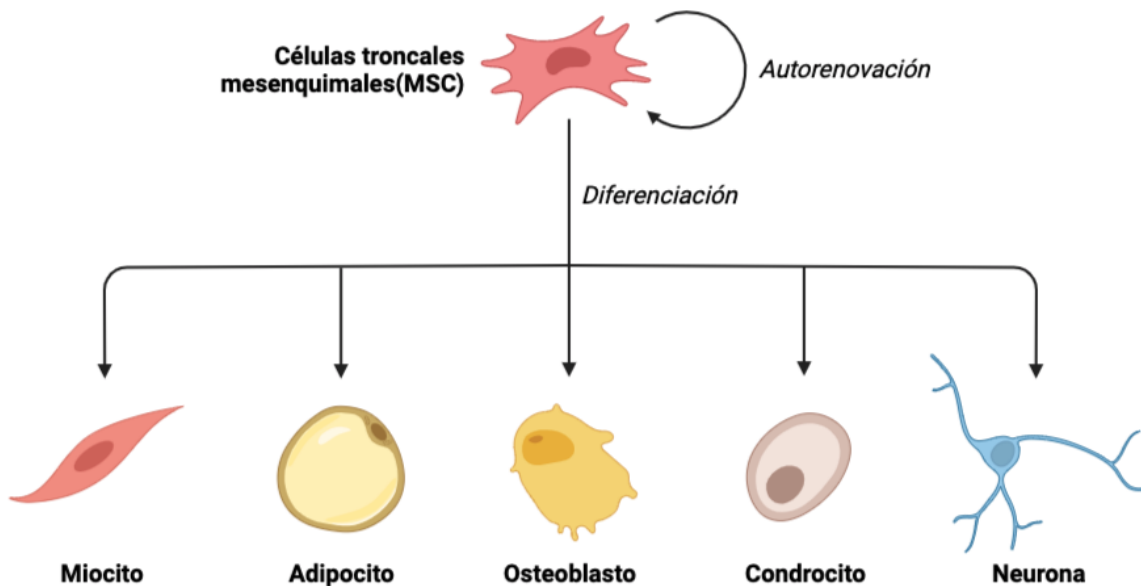


Figura 2: Diferenciación de células troncales a diversos tipos celulares. Fuente, elaboración propia con la aplicación BioRender.com

Las MSCs más comúnmente utilizadas en terapia celular e ingeniería de tejidos son las derivadas de la médula ósea, pero la utilización de otro tipo de células sigue siendo escasa.

Independientemente del origen, las MSCs en un proceso fisiológico de reparación deben movilizarse al sitio de la lesión tisular durante la curación de las heridas; esta migración está regulada por factores mecánicos y químicos. A continuación se discute algunos de los mecanismos regulatorios principales relacionados con la migración de las MSCs, principalmente los que dirigen a la diferenciación y la función paracrina de las mismas durante los procesos de curación tisular (11).

2.1. Factores químicos

Las MSCs representan una importante herramienta para la terapia celular en la medicina regenerativa, mostrando resultados prometedores para reparar tejidos dañados tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las MSCs poseen lo que se conoce en inglés como *homing ability*, lo que significa que esta población celular puede migrar a sitios de lesión, y poseen la capacidad de diferenciarse a células propias de la lesión tisular, además, son capaces de secretar quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento que ayudan en la reparación tisular (7).

Pese a las características de las MSCs, el movimiento de las mismas dentro de los tejidos es un proceso complejo, que, para llevarse a cabo requiere de factores como los ya mencionados, las quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento, además de los factores mecánicos (15).

Los factores mecánicos incluyen las fuerzas hemodinámicas que se aplican a las paredes de los vasos sanguíneos, en forma de tensión de corte, elasticidad cíclica vascular y la elasticidad de la matriz extracelular (EMC) (17).

Actualmente, algunos métodos para evaluar la migración celular *in vitro* incluyen el ensayo de la cámara de transpozos y el ensayo del cierre de la herida.

Por otro lado, la migración *in vivo* se estudia comúnmente al marcar las MSCs con un cromóforo fluorescente o con luciferasa, para después darle seguimiento con un sistema de imagen (15).

2.1.1. Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia amplia de proteínas pequeñas que proporcionan la señalización de las proteínas de la membrana celular conocidas como proteínas G. Las quimiocinas son generalmente conocidas por su capacidad de estimular la migración celular, principalmente de las células inmunitarias, como los leucocitos (18).

Aunque las quimiocinas involucradas en la migración de MSCs son diversas, una de las estudiadas con mayor amplitud es el receptor CXCR4; esta proteína es crítica para el *homing* de las MSCs. Por ejemplo, las investigaciones *in vitro* e *in vivo* han reportado que el complejo del CXCR4

con el factor de crecimiento derivado del estroma-1, el SDF-1 es necesario para estimular la migración después de un daño tisular en el hígado (15).

Otra quimiocina que es importante para la migración tisular es la Osteopontina (OPN), la cual es sintetizada por varios tejidos, y se ha visto que regula la inflamación y la respuesta tisular a una lesión en el corazón, el riñón, el pulmón, el hueso y otros tejidos. Un incremento en la producción de OPN en los tejidos dañados se relaciona con el incremento de la migración de las MSCs mediante la remodelación del citoesqueleto de éstas (7).

La habilidad de una célula para modificar dinámicamente su citoesqueleto es importante para eficientar la migración celular, ya que mediante este proceso la célula es capaz de reducir el esfuerzo físico que constituye moverse a través de los tejidos dañados (19).

La forma en que una célula modifica su forma se relaciona con su elasticidad, y ésta se determina por la estructura de su citoesqueleto.

2.1.2. Citocinas

Las citocinas pro-inflamatorias son activadores de las células del sistema inmune, sin embargo, la evidencia reciente sugiere que estas moléculas tienen efectos en el tamaño y la diferenciación celular de las MSCs, particularmente de aquellas derivadas de la médula ósea.

El estudio de los blancos celulares de las citocinas pro-inflamatorias es un paso crítico para dilucidar la interacción de la respuesta inflamatoria y su papel en la modulación de las MSCs (20).

La respuesta celular a la inflamación produce la secreción de citocinas que impactan en la diferenciación de las MSCs; además, la producción de factores secundarios también debe considerarse en el proceso de reparación.

Se ha visto que las citocinas pro-inflamatorias como la G-CSF y el TNF- α tienen un efecto sinérgico para estimular el desarrollo de linajes mieloides. Por otro lado, los interferones y el TNF inducen la secreción de Sca-1 en MSCs, un marcador temprano de troncalidad, inhibiendo su capacidad de

autorenovación y estimulando su diferenciación hacia linajes más maduros (21).

Pese a la investigación realizada, se considera que la mayoría de los estudios hechos no analizan el efecto combinado de las citocinas, consecuencia de la falta de diseños experimentales adecuados (22).

2.1.3. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son una clase de polipéptidos que regulan la migración celular, la proliferación, la diferenciación y la síntesis de la ECM. Se ha reportado que los factores de crecimiento juegan un papel importante en la migración celular. Por ejemplo, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocito (HGF), el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), se encuentran comúnmente durante el proceso de reparación tisular (23,24).

Diversos estudios han demostrado que estos factores de crecimiento son críticos para el reclutamiento de MSCs al sitio de la lesión, y para que las MSCs cumplan sus funciones durante la regeneración tisular (25).

2.2. Factores mecánicos

El microambiente en el cual las MSCs viven es importante para su apropiada migración. Además de los factores químicos, la migración de las MSCs también puede verse afectada por factores mecánicos como la presión mecánica, la tensión de corte y la elasticidad de la ECM, así como la microgravedad (26).

2.2.1. Presión mecánica

Durante el proceso de migración celular a los sitios de lesión tisular mediante la circulación periférica, las MSCs se adhieren a las paredes de los

vasos y están sujetas a fuerzas hemodinámicas que ocurren en el interior vascular, en la forma de presión mecánica y de tensión.

Por ejemplo, un estudio *in vivo* mostró que el estrés mecánico del 5% dentro de las primeras 6 h incrementaron la migración de las MSCs. Los investigadores sugieren que lo anterior se atribuye a la activación de la vía de FAK-ERK1/2 (27).

2.2.2. Tensión de corte

Otra fuerza hemodinámica aplicada a las paredes de los vasos, por donde suelen viajar las MSCs, es la tensión de corte. Si bien se sabe eso, los estudios relativos a esta variable son escasos.

Por citar un ejemplo, se ha visto que las MSCs, al ser sometidas al ensayo del cierre de la herida, bajo una tensión de corte de 0.2 Pa, muestran activación de la vía de señalización JNK y p38 MAPK; vías relacionadas con la migración.

Por el contrario, el mismo ensayo con una tensión de corte de >0.2 Pa inhibe la expresión del JNK y p38 MAPK, y a su vez, la migración celular (27).

2.2.3. Elasticidad de la matriz extracelular

Las MSCs se encuentran rodeadas por una ECM que transmite señales biofísicas y biomecánicas complejas. Sobre esta misma idea, el módulo elástico de la ECM es percibido por las MSCs; este módulo regula la respuesta biológica de la migración celular.

En general, las MSCs migran de una matriz flexible (1 kPa) a una matriz menos flexible (34 kPa) mediante la polarización de su citoesqueleto, y la fosforilación de las cadenas pesadas de miosina tipo II, lo que sugiere que la polarización de las MSCs se encuentra profundamente regulada por una sensibilidad mecánica, conocida como la mecanotransducción (27).

2.2.4. Microgravedad

La gravedad normal de 1 (1g) es muy importante para el mantenimiento de las funciones normales del cuerpo, lo cual ha sido demostrada por la carrera aeroespacial, donde los astronautas, durante los primeros viajes espaciales, sufrían problemas como pérdida de la densidad ósea en huesos de carga.

Los estudios recientes demuestran que las condiciones de microgravedad pueden inhibir la proliferación y la diferenciación de las MSCs; por ejemplo, las MSCs estimuladas con microgravedad; esto es, las células se ponen a rotar a 10 rpm, lo que corresponde a 1×10^{-3} g; inhiben su migración porque sufren una remodelación en el citoesqueleto de actina, disminuyendo la elasticidad del este (28).

La Figura 3, ilustra y contiene una representación gráfica de los factores que afectan la migración de las MSCs y que han sido descritos en el presente manuscrito.

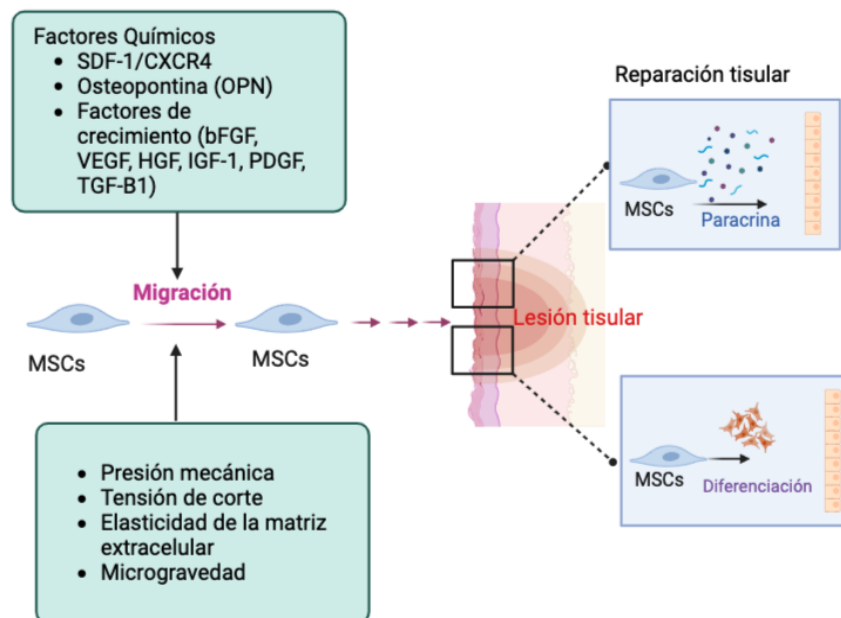


Figura 3: Factores que afectan la migración en células troncales mesenquimales derivadas de tejidos adultos. (bFGF) factor de crecimiento fibroblástico básico , (VEGF) factor de crecimiento vascular endotelial , (HGF) factor de crecimiento de hepatocito , (IGF-1) factor de crecimiento similar a la insulina-1 , (PDGF) factor de crecimiento derivado de plaquetas , y (TGF-β1) factor de crecimiento transformante. Fuente, elaboración propia con la aplicación BioRender.com

IV. Justificación y planteamiento del problema

La regulación de la migración celular es una pregunta de investigación relevante en el campo de la bioingeniería de tejidos.

Incrementar o suprimir la migración celular, y controlar su direccionalidad, resulta de gran utilidad para controlar diferentes fenómenos fisiológicos, como la reparación tisular.

Para su estudio, se han aplicado diversas estrategias que se enfocan en los estímulos mecánicos, donde el modelo de las células troncales mesenquimales ha resultado de gran utilidad.

Además, los estímulos vibratorios, como las ondas Hertzianas han mostrado resultados prometedores para la estimulación de MSCs.

Sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado con MSCs derivadas de médula ósea, mientras que los estudios que emplean MSCs derivadas de tejidos dentales, y particularmente de una población mexicana, son sumamente escasos.

Más aún, el diseño adecuado de los análisis *in vitro* que pueda reproducirse y discutirse por diversos grupos de trabajo sigue sin establecerse adecuadamente.

Por lo anterior, en el laboratorio de bioingeniería de tejidos se ha diseñado una plataforma que permita estimular a las MSCs mediante estímulos vibratorios.

En el presente trabajo se propone una metodología de análisis morfológico del proceso de migración celular mediante epifluorescencia, y que permita analizar muestras de MSCs estimuladas con vibraciones sinusoidales.

V. Hipótesis

Las vibraciones de 30Hz y menos de 1g tienen un efecto sobre la migración de las células mesenquimales de origen dental, y este efecto puede analizarse mediante un estudio de epifluorescencia.

VI. Objetivo

Analizar los efectos de la vibración de 30Hz y menos de 1g sobre la migración de células troncales mesenquimales de origen dental mediante un estudio de epifluorescencia.

VII. Metodología

Se seleccionaron 40 microfotografías del experimento 082022-05 para su análisis digital mediante el software Fiji ImageJ de los Institutos Nacionales de Salud. Estas fotos fueron representativas de las condiciones experimentales y del control del experimento mencionado, y se cargaron en el software Fiji ImageJ.

Mediante la función de Set Scale, se calibró la escala y se realizaron mediciones seriadas, mismas que fueron registradas, y evaluadas para su análisis estadístico. La estadística presentada en este trabajo es descriptiva.

Para la evaluación de la diferencia entre grupos se utilizaron pruebas T, mediante la aplicación Excel.

El experimento del cual se obtuvieron las microfotografías consistió en lo siguiente, las células DT-MSCs derivadas de tejido gingival fueron donadas por el Dr. J. Montesinos del Laboratorio de Células Troncales, Unidad de Investigación en Oncología del Hospital Nacional Centro Médico Siglo XXI del Instituto del Seguro Social. La línea ha sido previamente aislada y caracterizada (número de aprobación del comité de ética CIE/1110/2017). Las células expresan altos niveles de los marcadores de superficie CD105, CD90 y CD73 -tal y como lo establece la Sociedad Internacional de Terapia Celular-.

Adicionalmente, las DT-MSCs expresan altos niveles del marcador CD13. Finalmente, las DT-MSCs expresan moderadamente el marcador HLA-ABC, y son negativas para el HLA-DR; y no expresan marcadores hematopoyéticos como son el CD34, CD45, ni marcadores endoteliales como el CD31. Las células muestran morfología fibroblástica.

Las células DT-MSCs fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium de baja glucosa (1g-DMEM, GIBCO, Invitrogen), suplementada con 10% de SFB (BioWest), y 1% de antibiótico- antimicótico; y se mantuvieron dentro de una incubadora con una concentración de CO₂ al 5%, temperatura de 37°C y una humedad de 100%, el medio se cambió cada tercer día.

Una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia, se vibraron a 30 Hz por 20 minutos, posteriormente mediante una tripsinización se recolectaron, y sembraron en platos de 6 pozos a una densidad de 50.000 células/pozo.

Se dejaron 24 horas se vibraron nuevamente a 30Hz por 20 min. Pasadas las primeras 48 h, y una vez que las células habían alzado una confluencia de 80% en cada pozo, se vibraron nuevamente a 30Hz por 20 min, y se realizó una herida con una puntal de 200 ul, se lavaron con PBS (buffer de fosfatos salinos), y se cambió el medio.

Las células se fijaron con formaldehído al 4% a las 0, 1, 3, 6, 12 y 24 h, posteriormente se deshidrataron en alcoholes seriados, y se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenildolona (DAPI), a las muestras se les tomaron las microfotografías, que se emplearon en el presente estudio.

VIII. Resultados

Inicialmente las células a las 24 h de ser vibradas mostraron un ligero cambio en su citoplasma con formación de prolongaciones anchas, lo que pareciera una mayor área de contacto del citoplasma con la superficie del plato de cultivo (Figura 4).



Figura 4: Fotografías representativas de las células mesenquimales a las 24h de cultivo después de la primera vibración. Cada tiempo evaluado se compara con células no vibradas. Las células mesenquimales parecen estar afectadas por los 30Hz de vibración, con menos células en el plato no vibrado, se muestra un cambio en el citoplasma de las células con un ensanchamiento y lo que parece el desarrollo de una mayor área de contacto con el plato de cultivo. Fuente: elaboración propia.

El análisis digital mostró que las vibraciones de 30 Hz promueven la migración de células mesenquimales de origen dental, tal como se muestra en la figura 4.

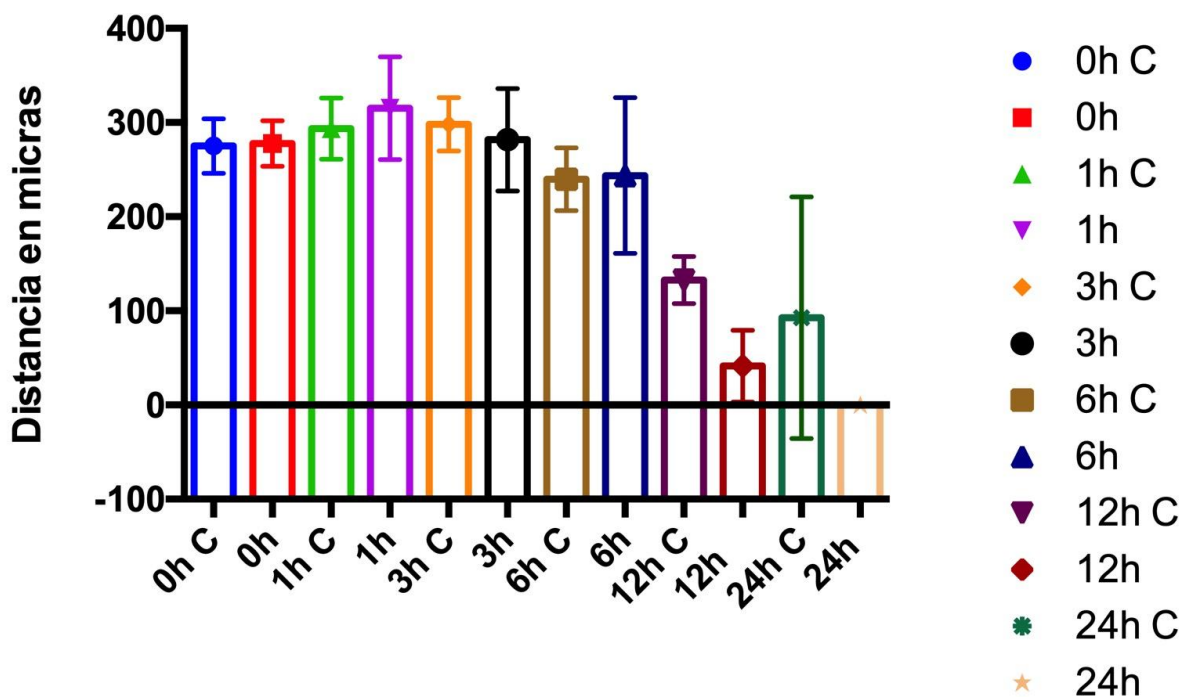


Figura 5: Gráfica de la distancia de cierre de herida en células mesenquimales de origen dental. Cada tiempo evaluado se compara con células no vibradas. C, control. Fuente: elaboración propia.

Aunque no se observaron diferencias durante las primeras horas, a las 12 horas había una diferencia significativa ($p=0.002$) entre la distancia de cierre de las células vibradas (41.35 micrómetros) y las células no vibradas (132.72 control, micrómetros). La cual permaneció a las 24 h (0 micrómetros) comparado con el control (92.72 micrómetros).

Lo anterior sugiere que los estímulos vibratorios a 30 Hz promueven la migración celular (Figura 5). Además, el patrón de migración en las imágenes de las células vibradas es confluyente hacia la zona de vibración, la cual fue el centro del plato.

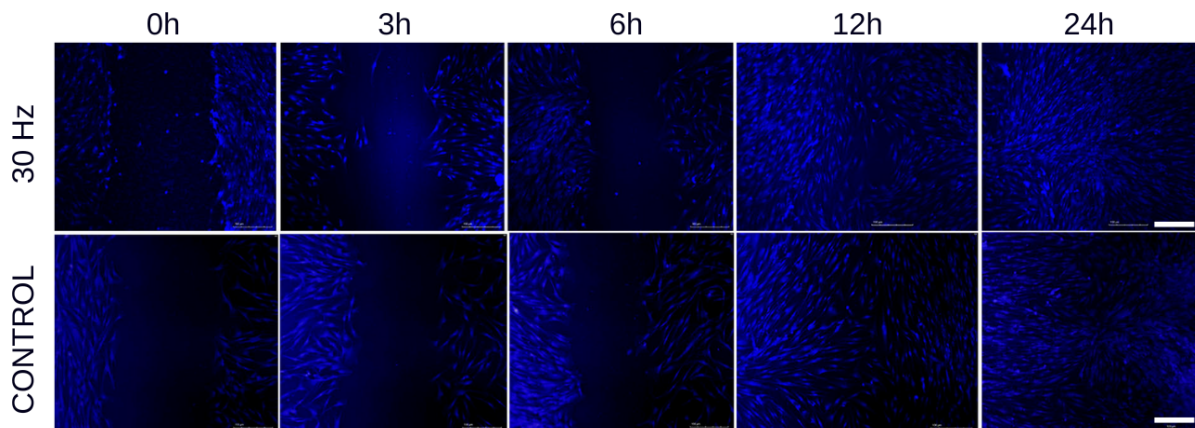


Figura 6: Microfotografías representativas del análisis digital Cada tiempo evaluado se compara con células no vibradas. Barra de escala 100 micrometros. Fuente: elaboración propia.

Adicionalmente, en las primeras fotografías, de las 0, 1, 3, y 6 horas, no se encontraron diferencias entre la distancia recorrida por la células no vibradas y las células estimuladas con 30 Hz de vibración.

Solo a las 12 y 24 horas se encontraron diferencias entre las dos condiciones, durante el análisis también se encontró diferencias a lo largo de la herida, con zonas de la herida cerca de donde se puso el estímulo vibratorio completamente cerradas, mientras que zonas más alejadas mostraban un menor número de células y una herida más amplia.

La Figura 7 es una representación gráfica de los tiempos más significativos del presente estudio.

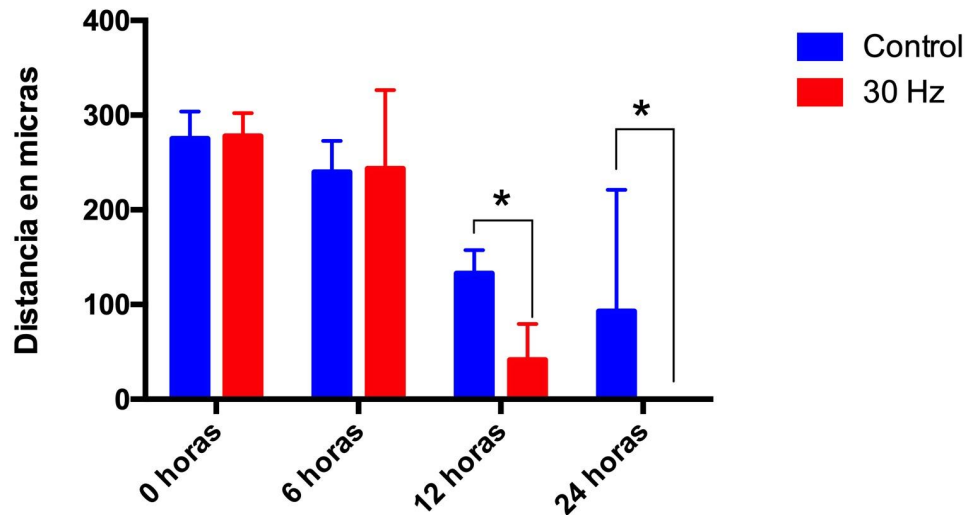


Figura 7: Gráfica de la distancia del cierre de la herida en tiempos más representativos del ensayo. Cada tiempo evaluado se compara a las células vibradas a 30 Hz con células no vibradas. * ($p \leq 0.005$). El estímulo vibratorio inhibe la migración de las células mesenquimales de origen dental a las 12 y 24 h después de realizada la herida. Fuente: elaboración propia.

Las células mesenquimales de origen dental estimuladas con vibraciones a 30 Hz migran en forma de hojas y cadenas de células hacia la zona de la herida, patrones consistentes con migración colectiva (Figura 7).

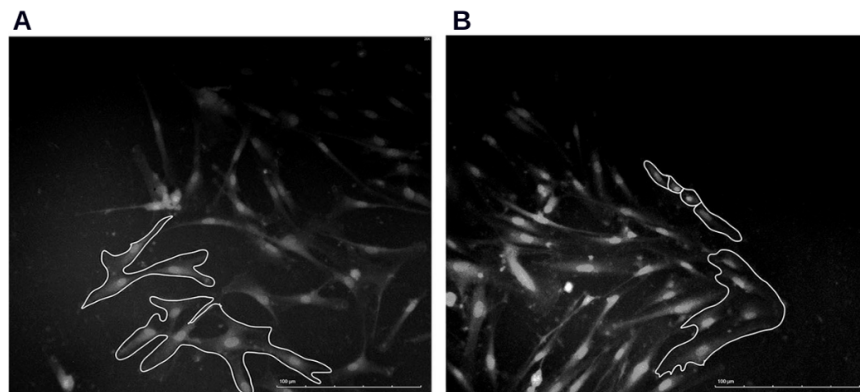


Figura 7: Patrones migratorios de las células mesenquimales. Escala 150 micrómetros. A, patrón en forma de hoja. B, patrón de arriba en forma de cadena (arriba), patrón de abajo en forma de hoja (abajo). Fuente: elaboración propia.

La tabla 2 enlista los promedios de las mediciones del cierre de la herida a las diferentes horas de cultivo.

Tabla 2. Ensayo de migración en células mesenquimales							
		0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
0 Hz	Distancia en μm	275.02	293.45	297.99	239.73	132.72	92.72
	Desviación estándar	28.91	32.61	28.41	33.26	24.91	128.47
30Hz	Distancia en μm	277.75	315.12	281.71	243.61	41.35	0
	Desviación estándar	24.31	54.51	54.23	82.75	38.14	0

IX. Discusión

El presente estudio expone un análisis digital para un experimento que se realizó en células mesenquimales que se sometieron al estímulo vibratorio de 30 Hz, y al ensayo del cierre de la herida, un método sencillo y comúnmente empleado para el estudio de la migración celular *in vitro*.

Aunque la vibración no es un tipo de estimulación mecánica en condiciones fisiológicas, se han realizado un gran número de estudios sobre la vibración en la osteogénesis (25), (12).

Además, la vibración se ha utilizado para tratar la osteoporosis porque estimula los huesos con los movimientos del cuerpo. Las vibraciones del tamaño y la frecuencia adecuados pueden provocar una respuesta anabólica en los huesos (29), (30).

La vibración de baja magnitud (LMV) es ampliamente aceptada por los médicos y los pacientes en la clínica como una forma de terapia de ejercicio basada en la vibración (31).

Se ha observado que la vibración regula y coordina la resorción y la formación ósea de las MSCs a través de múltiples vías de señalización; por ejemplo, se ha reportado en previas investigaciones que la vibración regula la vía de señalización Wnt promoviendo la osteogénesis de las MSC (32).

Chen y colaboradores demostraron que la vibración aumentaba la adhesión celular de las MSC en superficies recubiertas de hidroxiapatita mediante la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Con base en estas

investigaciones, se ha sugerido que la vibración podría proporcionar un medio para promover la osteointegración de los implantes óseos (33).

En el presente estudio, las células estimuladas con migración presentaban patrones en forma de cadenas y hojas, con dirección en el estímulo migratorio que se infiere por la posición del núcleo, lo que es consistente con los patrones descritos para la migración colectiva. Además de mostrar una velocidad de migración mayor que sus contrapartes no vibradas.

Estudios similares han demostrado que la vibración mejora la función de la β -catenina a través de la inhibición del elemento del complejo de destrucción de β -catenina GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 β), que promueve la función del enlazador del citoesqueleto y el nucleoesqueleto (LINC) (34).

Otro estudio encontró que la expresión de miR-335-5p fue regulada al alza a través de la vibración. miR-335-5p induce la diferenciación osteogénica mediante la supresión de la expresión de la proteína 1 relacionada con Dickkopf, un inhibidor de la señalización Wnt (35).

Aunque en el presente estudio no se examinó la diferenciación osteogénica, se sabe que cuando las MSCs comienzan un proceso de diferenciación disminuye su tasa de proliferación. Además de la vía Wnt, la vibración también puede regular el proceso de formación ósea mediante la regulación al alza de la expresión del receptor de estrógeno α . Se sabe que el receptor de estrógeno es un mediador en la remodelación ósea y es significativo en la osteoporosis por falta de estrógeno (35,36)

También se ha demostrado que la vía ERK1/2 y la señalización p38 MAPK desempeñan un papel esencial en la osteogénesis inducida por vibración de las MSC. Investigaciones recientes ilustran el efecto de la vibración sobre el YAP, un factor de transcripción importante para la osteogénesis de las MSC (37,38).

Thompson y colaboradores descubrieron que la aplicación de la vibración aumenta el desplazamiento nuclear de YAP y restablece los niveles nucleares basales de YAP, lo que conduce a la osteogénesis de las MSC (39). Además de la diferenciación, la migración de las MSC también está regulada por la vibración. Wei y colaboradores descubrieron que la vía SDF-1/CXCR4 mejoraba la migración de las MSC en respuesta a la vibración, lo que promovía la curación de fracturas (40,41).

Aunque en el presente estudio se encontró un incremento de la migración con el estímulo de 30 Hz, es necesario hacer más estudios a diferentes frecuencias para poder sacar conclusiones definitivas, entre ellas analizar las vías de señalización relacionadas con la migración.

Además del estiramiento, la compresión, la tensión y la vibración, se ha descubierto que el estímulo ultrasónico por pulsos de baja intensidad conocido como LIPUS es un tipo de fuerza que promueve la formación de hueso (42).

Gao y colaboradores analizaron las distintas vías de las MSC de diferentes fuentes en la proliferación estimulada por LIPUS; comprobaron que éste aumentó la proliferación de todos los tipos de MSC. Por ejemplo, en las MSCs de origen pulpar, la estimulación con LIPUS llevó a la activación de ERK1/2 (DPSCs), mientras que las MSCs de médula ósea se activó la vía de JNK MAPK. Sin embargo, en las MSCs de ligamento periodontal, la señalización de JNK MAPK se estimuló inmediatamente después de la aplicación de LIPUS y la p-p38 MAPK aumentó posteriormente (43).

Los estímulos con LIPUS también promueven la migración de las MSCs en la cicatrización ósea, posiblemente a través de la activación de la señalización SDF-1/CXCR4 (Wei et al., 2014). Sin embargo, la eficacia de LIPUS en la osteogénesis está abierta al debate, ya que algunos investigadores sugieren que el LIPUS posiblemente no tiene ningún efecto en la curación ósea (44).

La complejidad de estos procesos muestra otras dimensiones, enriquecedoras para la reflexión o el análisis, cuando se considera, por ejemplo, los andamios celulares utilizados para la reparación y regeneración tisular.

Por ejemplo, aparte de las células sanguíneas, si no todas, la mayoría de las células normales de los tejidos humanos son dependientes del anclaje y residen en una matriz sólida llamada matriz extracelular (MEC).

Existen numerosos tipos de MEC en los tejidos humanos, que suelen tener múltiples componentes específicos para cada tipo de tejido. En cuanto a las funciones de la MEC en los tejidos, pueden clasificarse generalmente en cinco categorías. En primer lugar, la MEC proporciona un soporte estructural y un entorno físico para que las células que residen en ese tejido se adhieran, crezcan, migren y respondan a las señales. En segundo lugar, la MEC confiere al tejido sus propiedades estructurales y, por tanto, mecánicas, como la rigidez y la elasticidad, que están asociadas a las funciones del tejido. Por ejemplo, los haces gruesos y

bien organizados de colágeno de tipo I en el tendón son muy resistentes al estiramiento y son responsables de la elevada resistencia a la tracción de los tendones. Por otro lado, las fibrillas de colágeno y las fibras de elastina de la piel, distribuidas aleatoriamente, son responsables de su dureza y elasticidad.

En tercer lugar, la MEC puede proporcionar activamente señales bioactivas a las células residentes para regular sus actividades. Por ejemplo, la secuencia RGD de la fibronectina desencadena eventos de unión, mientras que el patrón topológico regular estimula la alineación preferente de las células. En cuarto lugar, la MEC puede actuar como depósito de factores de crecimiento y potenciar sus bioactividades. Por ejemplo, los proteoglicanos de sulfato de heparina facilitan la dimerización del factor de crecimiento bFGF y, por tanto, su actividad. En quinto lugar, la MEC proporciona un entorno físico degradable para permitir la neovascularización y la remodelación en respuesta a los retos del desarrollo, fisiológicos y patológicos, durante los procesos dinámicos del tejido, a saber, la morfogénesis, la homeostasis y la curación de heridas.

Intuitivamente, el mejor andamio para un tejido diseñado debería ser la MEC del tejido objetivo en su estado nativo. Sin embargo, las múltiples funciones, la compleja composición y la naturaleza dinámica de la MEC en los tejidos nativos dificultan su imitación exacta. Por lo tanto, el concepto contemporáneo de andamiaje en la ingeniería de tejidos consiste en imitar las funciones de la MEC nativa, al menos de modo parcial. En consecuencia, las funciones más relevantes que desempeñan los andamios en la ingeniería de tejidos, son análogas a las funciones de la MEC en los tejidos nativos y están asociadas a sus características arquitectónicas, biológicas y mecánicas (45).

De acuerdo con su origen, podemos dividir a los andamios en sintéticos y naturales. Los andamios sintéticos han sido usados como análogos de la MEC y ofrecen diferentes ventajas y limitaciones en comparación con los polímeros naturales. Por ejemplo, las propiedades de los polímeros sintéticos pueden controlarse para adaptarse a funciones específicas, y por tanto, pueden ser más adecuados como andamios para múltiples aplicaciones dentro del campo de la ingeniería tisular. Además, muchos polímeros sintéticos son reabsorbibles y tienen una tasa de degradación y una resistencia mecánica conocidas, por lo que el tiempo de degradación no debería variar significativamente entre los huéspedes. Los andamios sintéticos ofrecen muchas características positivas para su uso como

materiales de andamiaje, y casi parecen ser la respuesta ideal en el sentido de andamios para la ingeniería de tejidos, sin embargo el dilema principal es que carecen de uno de los principales requisitos de un análogo de la MEC. Aunque las características superficiales y estructurales de los polímeros pueden controlarse, al ser sintéticos, carecen del componente biológico de la MEC nativa. Otra desventaja es que los productos de degradación de estos polímeros pueden ser tóxicos, principalmente ácidos débiles, que pueden causar una reacción adversa si se acumulan localmente.

Los polímeros sintéticos biodegradables han sido el enfoque principal de los andamios de ingeniería tisular, la mayoría de los cuales pertenecen a la familia del poliéster. Como respuesta a la desventaja intrínseca de los polímeros sintéticos de carecer del componente biológico, se utilizan ampliamente los polímeros naturales, ya sea por sí mismos, o como mezcla con los sintéticos.

Los andamios naturales derivados de recursos renovables como plantas, animales y microorganismos, los polímeros naturales utilizados en andamios ofrecen una ventaja debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. Son biológicamente similares a la MEC nativa, lo que permite a las células interactuar con estos polímeros de forma natural a través de receptores y señales, y también ayuda al correcto funcionamiento de las células, como la adhesión, la proliferación y diferenciación.

Las desventajas de los polímeros naturales son la variabilidad de la tasa de degradación, inconsistencia entre lotes y poca resistencia mecánica. Otra desventaja importante a tener en cuenta es la capacidad de estos polímeros de inducir una respuesta inmunitaria debido a la presencia de impurezas o endotoxinas, dependiendo de su origen (46).

Sin importar el origen del andamio, este debería promover la migración de las células mesenquimales sobre sí mismo, para permitir, no solo para permitir reparar el tejido dañado; también deberá promover una adecuada vascularización, la cual es imprescindible para alcanzar la funcionalidad de dicho tejido.

X. Conclusiones

El ensayo del cierre de la herida es un método sencillo y replicable que permite estudiar la migración in vitro. La estandarización de un método de análisis mediante el software Fiji Image J permite la estandarización de resultado para mejorar la reproducibilidad de los mismos, mientras que la tinción del núcleo celular mediante epifluorescencia le da una mayor asertividad a la dirección en que se está inclinando la célula. Esto es mediante la angulación de los núcleos. Los estímulos vibratorios son capaces de afectar la migración de las células mesenquimales. Dentro de nuestro conocimiento este es el primer estudio en evaluar la migración en células mesenquimales de origen dental derivadas de una población mexicana, lo cual podría tener implicaciones a largo plazo en el diseño de terapias que emplean vibraciones.

XI. Referencias

1. Roy S, Lévesque M. Limb regeneration in axolotl: Is it superhealing? *ScientificWorldJournal*. 2006;6:12–25.
2. Zhao A, Qin H, Fu X. What determines the regenerative capacity in animals? *Bioscience*. 2016 Sep 1;66(9):735–46.
3. Heineken FG, Skalak R. Tissue Engineering: A Brief Overview [Internet]. Vol. 113, *Journal of Biomechanical Engineering*. 1991. p. 111–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1115/1.2891223>
4. Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa [Internet]. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. [cited 2022 Nov 6]. Available from: <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/ingenier%C3%ADa-de-tejidos-y-medicina-regenerativa-0>
5. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2006 Jul;10(3):569–76.
6. Butenko S, Miwa H, Liu Y, Plikus MV, Scumpia PO, Liu WF. Engineering Immunomodulatory Biomaterials to Drive Skin Wounds toward Regenerative

- Healing. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2022 Sep 19; Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a041242>
7. Zhang W, Yelick PC. Craniofacial Tissue Engineering. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2018 Jan 2;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025775>
 8. Website [Internet]. Available from: ; <https://doi.org/10.3390/biom11111644>
 9. Martínez-Carreño MA, Saenz AAR, Munévar-Niño JC. El potencial terapéutico del secretoma de las células troncales. CES Odontol. 2018;31(2):38–47.
 10. Nguyen TT, Mui B, Mehrabzadeh M, Chea Y, Chaudhry Z, Chaudhry K, et al. Regeneration of tissues of the oral complex: current clinical trends and research advances. J Can Dent Assoc. 2013;79:d1.
 11. Marrelli M, Codispoti B, Shelton RM, Scheven BA, Cooper PR, Tatullo M, et al. Dental Pulp Stem Cell Mechanoresponsiveness: Effects of Mechanical Stimuli on Dental Pulp Stem Cell Behavior. Front Physiol. 2018 Nov 26;9:1685.
 12. Na J, Plews J, Li J, Wongtrakoongate P, Tuuri T, Feki A, et al. Molecular mechanisms of pluripotency and reprogramming. Stem Cell Res Ther. 2010 Oct 25;1(4):33.
 13. Campanella V. Dental Stem Cells: Current research and future applications. Eur J Paediatr Dent. 2018 Dec;19(4):257.
 14. Rai S, Kaur M, Kaur S. Applications of stem cells in interdisciplinary dentistry and beyond: an overview. Ann Med Health Sci Res. 2013 Apr;3(2):245–54.
 15. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking [Internet]. Vol. 2013, Stem Cells International. 2013. p. 1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/130763>
 16. Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. Trends Pharmacol Sci. 2020 Sep;41(9):653–64.

17. Becker AD, De Becker A, Van Riet I. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? [Internet]. Vol. 8, World Journal of Stem Cells. 2016. p. 73. Available from: <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v8.i3.73>
18. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors [Internet]. Vol. 285, The FEBS Journal. 2018. p. 2944–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/febs.14466>
19. Ling L, Hou J, Wang Y, Shu H, Huang Y. Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on the Migration and Homing of Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells to Ovaries in Rats With Premature Ovarian Insufficiency. *Cell Transplant*. 2022 Jan;31:9636897221129171.
20. Pourgholaminejad A, Aghdami N, Baharvand H, Moazzeni SM. The effect of pro-inflammatory cytokines on immunophenotype, differentiation capacity and immunomodulatory functions of human mesenchymal stem cells [Internet]. Vol. 85, Cytokine. 2016. p. 51–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.06.003>
21. Strong AL, Gimble JM, Bunnell BA. Analysis of the Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Secreted by Adult Stem Cells during Differentiation [Internet]. Vol. 2015, Stem Cells International. 2015. p. 1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/412467>
22. Jahandideh B, Derakhshani M, Abbaszadeh H, Akbar Movassaghpour A, Mehdizadeh A, Talebi M, et al. The pro-Inflammatory cytokines effects on mobilization, self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *Hum Immunol*. 2020 May;81(5):206–17.
23. Oliva J, Canals JM, Lim M, Pacini S. Mesenchymal Stromal Cells: Preclinical and Clinical Challenges. *Frontiers Media SA*; 2022. 336 p.
24. Ling L, Gu S, Cheng Y, Ding L. bFGF promotes Sca-1 cardiac stem cell migration through activation of the PI3K/Akt pathway [Internet]. *Molecular Medicine Reports*. 2017. Available from:

<http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2017.8178>

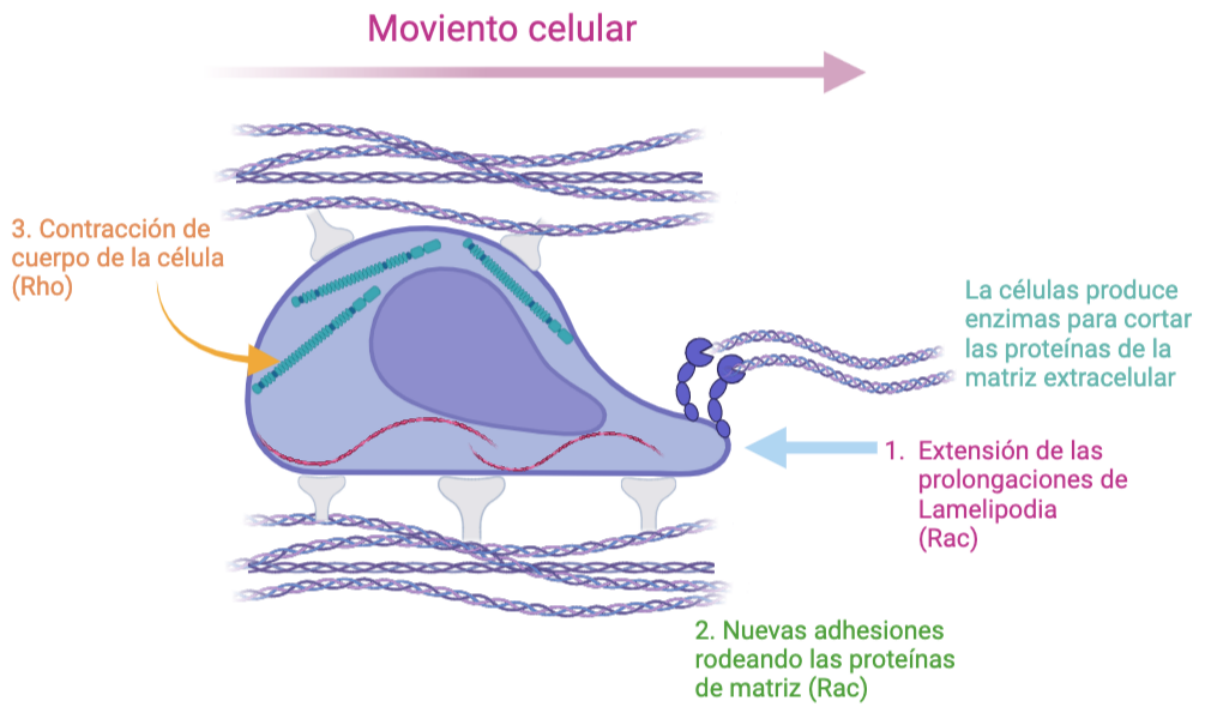
25. Chen W, He S, Xiang D. Hypoxia-induced retinal pigment epithelium cell-derived bFGF promotes the migration and angiogenesis of HUVECs through regulating TGF- β 1/smad2/3 pathway [Internet]. Vol. 790, Gene. 2021. p. 145695. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2021.145695>
26. Nermeen AMB. Mechanical Stimulation of Dental Pulp Stem Cells. LAP Lambert Academic Publishing; 2014. 136 p.
27. Liang X, Huang X, Zhou Y, Jin R, Li Q. Mechanical Stretching Promotes Skin Tissue Regeneration via Enhancing Mesenchymal Stem Cell Homing and Transdifferentiation. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Jul;5(7):960–9.
28. Mao X, Chen Z, Luo Q, Zhang B, Song G. Simulated microgravity inhibits the migration of mesenchymal stem cells by remodeling actin cytoskeleton and increasing cell stiffness. *Cytotechnology.* 2016 Dec;68(6):2235–43.
29. Jepsen DB, Ryg J, Hansen S, Jørgensen NR, Gram J, Masud T. The combined effect of Parathyroid hormone (1-34) and whole-body Vibration exercise in the treatment of postmenopausal Osteoporosis (PaVOS study): a randomized controlled trial. *Osteoporos Int.* 2019 Sep;30(9):1827–36.
30. Minematsu A, Nishii Y, Imagita H, Sakata S. Whole body vibration at low-frequency can increase trabecular thickness and width in adult rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2019 Jun 1;19(2):169–77.
31. Wysocki J, Kwacz M, Mrówka M, Skarżyński H. Comparison of round-window membrane mechanics before and after experimental stapedotomy. *Laryngoscope.* 2011 Sep;121(9):1958–64.
32. Gao H, Zhai M, Wang P, Zhang X, Cai J, Chen X, et al. Low-level mechanical vibration enhances osteoblastogenesis via a canonical Wnt signaling-associated mechanism [Internet]. Vol. 16, *Molecular Medicine Reports.* 2017. p. 317–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2017.6608>
33. Chen K, Cheng P, Zhou M, Wang Y, Chen A. Sox9 suppresses the hypertrophy

- of chondrocytes by inhibiting wnt/ β -catenin signaling pathway [Internet]. Vol. 7, Journal of Orthopaedic Translation. 2016. p. 134. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jot.2016.06.189>
34. Sarikhani M, Mishra S, Maity S, Kotyada C, Wolfgeher D, Gupta MP, et al. SIRT2 deacetylase regulates the activity of GSK3 isoforms independent of inhibitory phosphorylation. *Elife* [Internet]. 2018 Mar 5;7. Available from: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.32952>
 35. Zhao W, Zhao Y, Chen L, Sun Y, Fan S. miR-335-5p Inhibits Progression of Uterine Leiomyoma by Targeting ARGLU1 [Internet]. Vol. 2022, Computational and Mathematical Methods in Medicine. 2022. p. 1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2022/2329576>
 36. Li H, Wu W, He X, Cao C, Yu X, Zeng Y, et al. Applying vibration in early postmenopausal osteoporosis promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and suppresses postmenopausal osteoporosis progression. *Biosci Rep* [Internet]. 2019 Sep 30;39(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/BSR20191011>
 37. Luo YH, Chen J, Xiao EH, Li QY, Luo YM. Zebularine Promotes Hepatic Differentiation of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Interfering with p38 MAPK Signaling [Internet]. Vol. 2018, Stem Cells International. 2018. p. 1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/9612512>
 38. Zhang L, Luo Y, Lu Z, He J, Wang L, Zhang L, et al. Astragalus Polysaccharide Inhibits Ionizing Radiation-Induced Bystander Effects by Regulating MAPK/NF- κ B Signaling Pathway in Bone Mesenchymal Stem Cells (BMSCs). *Med Sci Monit*. 2018 Jul 6;24:4649–58.
 39. Thompson M, Woods K, Newberg J, Oxford JT, Uzer G. Low-intensity vibration restores nuclear YAP levels and acute YAP nuclear shuttling in mesenchymal stem cells subjected to simulated microgravity. *NPJ Microgravity*. 2020 Dec 1;6(1):35.
 40. Sun Y, Wan B, Wang R, Zhang B, Luo P, Wang D, et al. Mechanical Stimulation

on Mesenchymal Stem Cells and Surrounding Microenvironments in Bone Regeneration: Regulations and Applications. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022 [cited 2022 Nov 9];0. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2022.808303>

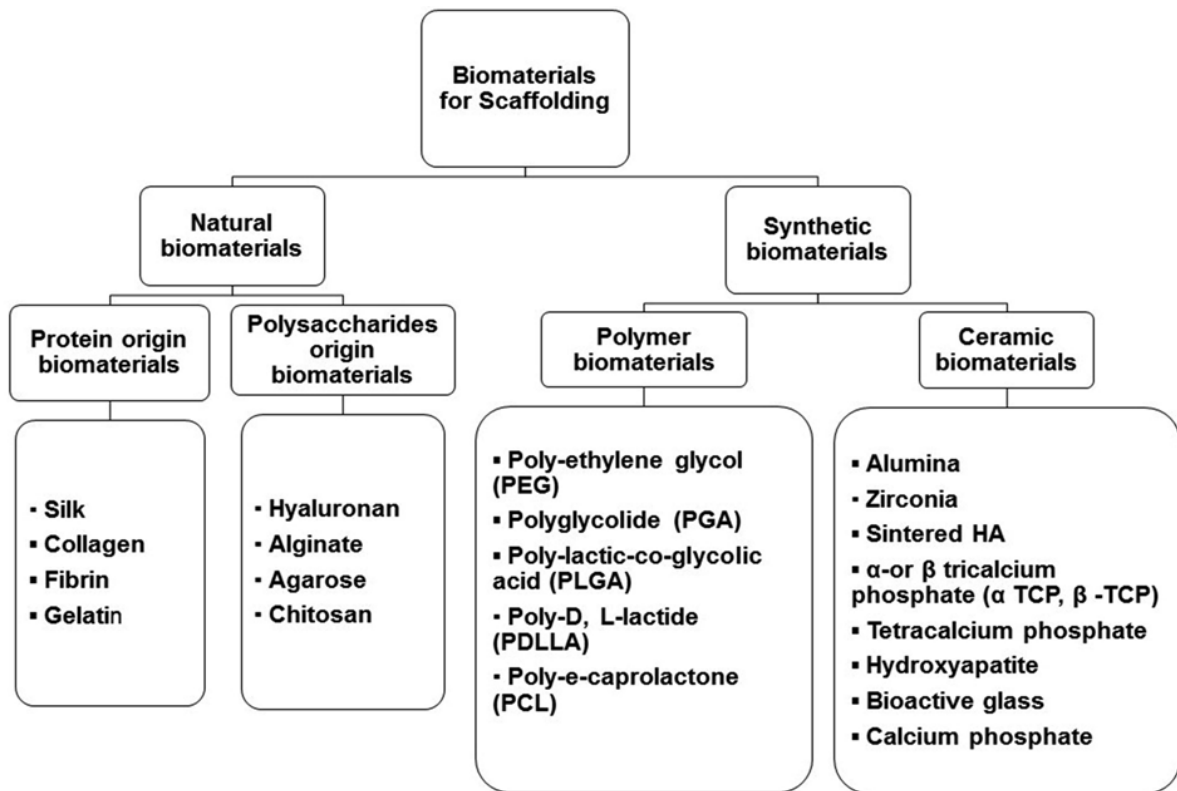
41. Wei FY, Chow SK, Leung KS, Qin J, Guo A, Yu OL, et al. Low-magnitude high-frequency vibration enhanced mesenchymal stem cell recruitment in osteoporotic fracture healing through the SDF-1/CXCR4 pathway. *Eur Cell Mater*. 2016 May 24;31:341–54.
42. Uddin SMZ, Qin YX. Enhancement of Osteogenic Differentiation and Proliferation in Human Mesenchymal Stem Cells by a Modified Low Intensity Ultrasound Stimulation under Simulated Microgravity [Internet]. Vol. 8, *PLoS ONE*. 2013. p. e73914. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073914>
43. Gao G, Shen N, Jiang X, Sun H, Xu N, Zhou D, et al. Periodic mechanical stress activates EGFR-dependent Rac1 mitogenic signals in rat nucleus pulposus cells via ERK1/2 [Internet]. Vol. 469, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016. p. 723–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.056>
44. Barreto R, Waning DL, Gao H, Liu Y, Zimmers TA, Bonetto A. Chemotherapy-related cachexia is associated with mitochondrial depletion and the activation of ERK1/2 and p38 MAPKs [Internet]. Vol. 7, *Oncotarget*. 2016. p. 43442–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9779>
45. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J*. 2008 Dec;17 Suppl 4(Suppl 4):467–79.
46. Wolfe PS, Sell SA, Bowlin GL. Natural and synthetic scaffolds. In: *Tissue Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 41–67.

Anexos



Fases del movimiento celular

Elaboración propia con la aplicación Biorender



Biomateriales para andamiaje

Tomado de (46) Natural and synthetic scaffolds