

UCH-FC
Biotecnología
E 261
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



“Las Células Troncales Mesenquimáticas humanas provenientes de la Gelatina de Wharton contribuyen a la angiogénesis: Estudio *in vivo* en un modelo murino”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Sandra Sofía Edwards Jorquera

Directora del Seminario de Título:

Verónica Palma Alvarado

Laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Diciembre 2013

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Sandra Sofía Edwards Jorquera

“Las Células Troncales Mesenquimáticas humanas provenientes de la gelatina de Wharton contribuyen a la Angiogénesis: Estudio in vivo en un modelo murino”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Verónica Palma A.
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'V. Palma', written over a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. María Rosa Bono M.
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Bono', written over a horizontal line.
A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'A. Glavic', written over a horizontal line.
A circular stamp from the Faculty of Sciences, Central Library, University of Chile. The text inside the stamp reads 'FACULTAD DE CIENCIAS', 'BIBLIOTECA CENTRAL', and 'U. DE CHILE'.

Dr. Álvaro Glavic M.
Evaluador

Santiago de Chile,.....

BIOGRAFÍA



Nací el 19 de febrero del año 1989 en la ciudad de Copenhague, Dinamarca. Viví los primeros años de mi vida en el continente viejo, arribando a Chile a la edad de 8 años. Durante mi infancia estudié en varios colegios, pero culminé mi etapa de formación escolar en el Liceo Carmela Carvajal de Prat, Providencia.

Antes de ingresar a la universidad, siempre presenté gran interés por el área de la Biología, pero no fue sino hasta tercero medio que me enteré de la existencia de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, momento desde el cual, estudiar dicha carrera fue mi meta, de la cual me siento enormemente orgullosa.

Elegí una carrera dentro del área científica, puesto que me fascina el hecho que cada día plantea un desafío intelectual nuevo, donde no existe la rutina, y cada individuo es irremplazable puesto que es único en su manera de razonar, analizar y resolver problemáticas asociadas a su investigación.

Cuando ingresé a la Universidad de Chile descubrí nuevos desafíos y viví experiencias maravillosas junto a mis compañeros de generación. Aún más, el año 2011 realicé un semestre de intercambio con la Universidad de Copenhague, con el fin de conocer científicos jóvenes de distintas partes del mundo, así como los avances tecnológicos disponibles para ellos en sus distintas etapas de formación. Fue un período maravilloso donde no solo logré satisfacer dichas inquietudes sino que también me permití conocer de mejor manera diversas culturas y lugares históricos de distintas partes del mundo.

Posteriormente, a principios del año 2012 ingresé al laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo, bajo la tutela de la Dra. Verónica Palma, para realizar una unidad de investigación, basada en el uso de cultivos primarios humanos, en búsqueda de marcadores moleculares de la diabetes gestacional. El segundo semestre del mismo año comencé a trabajar en la presente memoria de título.

En la actualidad, he sido aceptada al programa de Doctorado en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, impartido por la misma casa de estudios, el cual comenzaré a principios del año próximo, con la intención de perfeccionar mis capacidades para comprender y abordar problemas dentro de diversas áreas dentro de la biología experimental.

Dedicado a mi familia, mis amigos y mi pololo. Son mi pilar, mi apoyo incondicional. A ustedes les debo quién soy y todas las cosas que he logrado...

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, agradezco a mi familia. Mi mamá Patricia y mi papá Patricio, a ustedes les dedico el presente trabajo. Ustedes son quienes me entregaron la vida y los valores que me convirtieron en la persona que soy hoy en día. Gracias a ustedes logré sacar adelante tanto mi carrera como el presente seminario de título, los adoro. Mis hermanos Daniel y Paola, que pese a las peleas y distancias que nos separan respectivamente, fueron un importante factor durante mi formación, los quiero mucho. Por supuesto que también a mi abuela milenaria por enseñarme a jugar cartas y cocinar cositas ricas cada domingo, a todos mis tíos y primos por los buenos recuerdos y maravillosas vacaciones.

Gracias a la Dra. Verónica Palma que me abrió las puertas de su laboratorio para realizar este trabajo y permitir desarrollarme como científico tanto en mis habilidades prácticas como mi capacidad de análisis. Gracias a la Cata y la Gabi por sus enseñanzas, consejos y retos cuando fue necesario, pero sobre todo por tener siempre la disposición de ayudarme en todo lo que necesité.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por integrarme en su grupo de trabajo así como también a las salidas extraprogramáticas, altamente necesarias para olvidarse del estrés que implican las malas rachas de experimentos fallidos. Hago particular mención a mi grupo más cercano, Pauli, Cata y Gabi, que siempre estuvieron ahí cuando las necesité, permitiendo que el desarrollo de este trabajo se volviera mucho más ameno.

Agradezco a mis compañeros de generación Blopa, Perri, Jaxy, Caro, Domy, Cote, Javier, pero en particular a la Lele, Dani U. y Kessi, por los buenos momentos que

pasamos tanto dentro de la universidad como en cada junta extraprogramática. Pese a que hayamos tomado distintos caminos y que cada vez tenemos menos tiempo para juntarnos, espero que esta amistad no solo se mantenga, sino que se fortalezca en el tiempo... ¡Los quiero mucho! Incluyo en este grupo al JuanMa también, que si bien no perteneció al grupo de mi generación, se volvió un gran amigo dentro del conjunto de personas que conocí dentro de la universidad, gracias por tu espontaneidad e historias tan detalladas que siempre me hacen reír tanto.

A mis amigas de colegio, Maca A., Paz, Belén, Xu, Nao y Vivi, que estuvieron tanto durante mi etapa escolar como durante el curso de toda mi carrera de pregrado. Gracias por los buenos momentos, así como por seguir presentes, generando cada día millones de maravillosos recuerdos nuevos. A mis amigas "del barrio", la Dany R., Java y Maca T... tanto recuerdos, esas tardes de pileta y mangüereo de verano, paseos a San Carlos o Pichidangui, desde quedarnos viendo a Don Francisco hasta salir a bailar un sábado por la noche, salir con carros de supermercado a recoger ciruelas, salir a la plaza a distraerse un rato, apañarnos en cada pena amorosa, y pucha que fueron hartas!!!... Con ustedes crecí y me formé. Gracias por todos los recuerdos. ¡Las adoro!

Por supuesto que también agradezco a mi pololo Mario. Mi vida, no te imaginas lo inmensamente feliz que me hace estar a tu lado. Agradezco muchísimo todo tu apoyo durante la etapa que implicó la elaboración de este trabajo, sin duda ha sido fundamental. Gracias por aguantarme mi mal genio en los momentos de frustración, así como por apañarme con todas mis alegrías. Eres lo mejor, te amo!!!

Finalmente agradezco al proyecto Fondef D0911047 y Fondap, que financiaron tanto este trabajo como el muy agradecido sueldo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| BIOGRAFÍA..... | ii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTOS..... | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDO..... | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | x |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | x |
| ABREVIATURAS..... | xii |
| RESUMEN..... | xv |
| ABSTRACT..... | xvi |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Antecedentes bibliográficos..... | 1 |
| 1.1.1. Angiogénesis..... | 1 |
| 1.1.2. Similitudes a nivel molecular y estructural de los sistemas de guía axonal y vascular..... | 3 |
| 1.1.3. Reparación tisular..... | 5 |
| 1.1.4. Estrategias utilizadas para la regeneración de tejidos..... | 6 |
| 1.1.5. Terapia celular con células troncales..... | 9 |
| 1.1.6. Células troncales mesenquimáticas (MSC)..... | 11 |
| 1.1.7. Células troncales mesenquimáticas de la gelatina de Wharton (WJ-MSC)..... | 14 |
| 1.1.8. Aplicación de MSC en reparación tisular..... | 15 |
| 1.2. Hipótesis..... | 17 |
| | vii |

| | | |
|----------|--|----|
| 1.3. | Objetivo general..... | 17 |
| 1.4. | Objetivos específicos..... | 17 |
| 2. | MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| 2.1. | Selección de cordones umbilicales y consideraciones éticas..... | 18 |
| 2.2. | Cultivo primario de Células Mesenquimáticas de la Gelatina de Wharton..... | 18 |
| 2.3. | Cultivo en matrices tridimensionales..... | 19 |
| 2.3.1. | Matrices Integra (IM)..... | 20 |
| 2.3.2. | Matrices de colágeno I de cola de rata..... | 21 |
| 2.3.3. | Matrices Integrated Implant System (IIS)..... | 21 |
| 2.4. | Ensayos <i>in vitro</i> | 22 |
| 2.4.1. | Asentamiento y distribución de las células en las matrices..... | 22 |
| 2.4.2. | Viabilidad de las células en las matrices..... | 23 |
| 2.4.3. | Expresión de factores tróficos..... | 24 |
| 2.4.3.1. | Expresión a nivel de mRNA..... | 24 |
| 2.4.3.2. | Expresión a nivel de proteínas..... | 27 |
| 2.4.3.3. | Secreción de factores angiogénicos..... | 29 |
| 2.5. | Ensayos <i>in vivo</i> | 31 |
| 2.5.1. | Cirugía de los ratones..... | 31 |
| 2.5.2. | Sacrificio y extirpación de tejido..... | 32 |
| 2.5.3. | Análisis de imágenes y cuantificación de vasos sanguíneos..... | 32 |
| 2.5.4. | Cuantificación de factores angiogénicos..... | 34 |
| 2.5.5. | Evaluación de citoquinas inflamatorias en el suero de ratones..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 2.5.6. Permanencia de las WJ-MSC en la matriz..... | 35 |
| 2.6. Análisis estadístico..... | 38 |
| 3. RESULTADOS | 39 |
| 3.1. Caracterización <i>in vitro</i> de WJ-MSC cultivadas en matrices bioartificiales..... | 39 |
| 3.1.1. Asentamiento y viabilidad de las WJ-MSC en matrices tridimensionales..... | 39 |
| 3.1.2. Expresión de factores tróficos de las WJ-MSC en matrices tridimensionales..... | 43 |
| 3.2. Evaluación <i>in vivo</i> del uso de matrices bioactivadas con WJ-MSC... | 48 |
| 3.2.1. Angiogénesis e inflamación promovida por WJ-MSC implantadas en un modelo murino de regeneración dermal..... | 48 |
| 3.2.2. Expresión de factores tróficos en el lecho de la herida de los ratones tratados..... | 51 |
| 3.3. Permanencia de las WJ-MSC en las matrices posterior al período de implantación..... | 55 |
| 4. DISCUSIÓN | 57 |
| 4.1. Caracterización <i>in vitro</i> de WJ-MSC en matrices bioartificiales..... | 59 |
| 4.2. Caracterización de las WJ-MSC <i>in vivo</i> | 63 |
| 4.3. Proyecciones del trabajo..... | 67 |
| 4.4. Modelo propuesto..... | 68 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 69 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 70 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|---------|--|----|
| Tabla 1 | Longitudes de onda de excitación y emisión para los colores rojo, rojo lejano y verde utilizadas en experimentos de microscopía confocal..... | 23 |
| Tabla 2 | Secuencias de partidores utilizados en la amplificación del cDNA generado y tamaño de amplicones generados..... | 26 |
| Tabla 3 | Resumen de concentraciones de leche descremada, anticuerpos y tiempos de incubación para los ensayos de Western blot realizados..... | 29 |
| Tabla 4 | Resumen de concentraciones de leche descremada, anticuerpos y tiempos de incubación para los ensayos de Western blot a partir de medios condicionados..... | 30 |
| Tabla 5 | Ubicación de las moléculas evaluadas en las membranas del kit <i>Proteome Profiler Array</i> | 47 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Tipos de angiogénesis..... | 1 |
| Figura 2 | Similitud anatómica del sistema nervioso y vascular..... | 4 |
| Figura 3 | Histología de un cordón umbilical humano..... | 14 |
| Figura 4 | Esquema del dorso del ratón luego de su extirpación..... | 33 |
| Figura 5 | Cultivo de MSC en matrices tridimensionales de distinta naturaleza.... | 40 |
| Figura 6 | En matrices IM, las WJ-MSC mantienen mayor actividad metabólica que las AD-MSC luego de largos períodos de privación de suero..... | 42 |
| Figura 7 | WJ-MSC sembradas en matrices de colágeno expresan <i>Netrina-1</i> , <i>Netrina-4</i> y <i>VEGF-A</i> a nivel de mRNA..... | 43 |
| Figura 8 | WJ-MSC sembradas en matrices 3D expresan <i>Netrina-4</i> y <i>VEGF-A</i> a nivel de proteína y presentan mayores niveles de secreción cuando son sembradas en IM..... | 44 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 9 | WJ-MSC secretan mayor cantidad de factores tróficos cuando son cultivadas en matrices Integra que en colágeno tipo I..... | 46 |
| Figura 10 | Matrices IM enriquecidas con WJ-MSC aceleran la angiogénesis en comparación con AD-MSC..... | 49 |
| Figura 11 | Inflamación sistémica de ratones implantados con IM enriquecido con WJ-MSC no aumenta respecto de IM control..... | 50 |
| Figura 12 | WJ-MSC incrementa la abundancia de VEGF-A en el lecho de la herida luego de una estadía de 5 días en los animales..... | 52 |
| Figura 13 | Las WJ-MSC expresan una extensa gama de factores relacionados con procesos de sanación de tejidos luego de estar implantadas durante 5 días en el dorso de ratones adultos..... | 53 |
| Figura 14 | Las WJ-MSC incrementan la densidad poblacional dentro de las matrices Integra. | 55 |
| Figura 15 | Las WJ-MSC permanecen dentro de las matrices implantas en los animales luego del período de implantación..... | 56 |
| Figura 16 | Modelo propuesto para el proceso de regeneración promovido por las WJ-MSC en el lecho de la herida..... | 68 |



ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| ADAMTS-1 | Metaloproteinasa con actividad desintegrina y motivos trombospondina |
| AD-MSC | MSC derivadas de tejido adiposo |
| Ang-1 | Angiopoyetina-1 |
| Ang-2 | Angiopoyetina-2 |
| BM-MSC | MSC de médula ósea |
| cDNA | DNA complementario |
| CXCL16 | Quimioquina de la familia CXC, ligando 16 |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidina |
| DMEM | " <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> " |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desorribonucleico |
| dNTP | Deoxnucleótido trifosfato |
| DPPIV | Dipeptidil Peptidasa IV |
| ECM | Matriz extracelular |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| EG-VEGF | VEGF derivado de glándula endocrina |
| ESC | Células troncales de origen embrionario |
| EtOH | Etanol |
| FBS | Suero Fetal Bovino |
| FGF | Factor de crecimiento fibroblástico |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa |
| GDNF | Factor neurotrófico derivado de las glías |

| | |
|-----------------|---|
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos |
| HB-EGF | EGF ligado a heparina |
| HGF | Factor de crecimiento de hepatocitos |
| IGFBP | Proteína de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina |
| IFN- γ | Interferón gamma |
| IIS | <i>Integrated Implant System</i> |
| IL-1 β | Interleuquina 1 beta |
| IL-6 | Interleuquina 6 |
| IL-8 | Interleuquina 8 |
| IM | <i>Integra Matrix</i> |
| MCP-1 | Proteína quimioattractante de monocitos 1 |
| MetOH | Metanol |
| MIP-1 α | Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa |
| MMP-8 | Metaloproteinasa de matriz 8 |
| MMP-9 | Metaloproteinasa de matriz 9 |
| mRNA | RNA mensajero |
| MSC | Células troncales mesenquimáticas |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| NRG1- β 1 | Neuroregulina 1 beta 1 |
| NTN-1 | Netrina-1 |
| NTN-4 | Netrina-4 |
| PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida |
| PBS | Amortiguador Fosfato Salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PD-ECGF | Factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas |

| | |
|--------|---|
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PFA | Paraformaldehído |
| PIGF | Factor de crecimiento placentario |
| P/S | Penicilina/Estreptomicina (antibióticos) |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-PCR | PCR de transcripción reversa |
| TIMP-1 | Inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 |
| TIMP-4 | inhibidor tisular de metaloproteinasa 4 |
| Tm | Temperatura de desnaturalización térmica |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TSP-1 | Trombospondina-1 |
| TSP-2 | Trombospondina-1 |
| uPA | Activador del plasminógeno tipo uroquinasa |
| VEGF | Factor de crecimiento vascular endotelial |
| WJ-MSC | MSC de la gelatina de Wharton |

RESUMEN

Las patologías que involucran alteraciones al proceso de sanación de la piel constituyen un problema grave en nuestra sociedad, por lo que la búsqueda por modelos confiables que permitan abordar su tratamiento resulta fundamental.

En este trabajo se evaluó, en un modelo murino de reparación dermal, una terapia celular basada en la aplicación de matrices bioartificiales, constituidas principalmente de colágeno, conteniendo células mesenquimáticas provenientes de la gelatina de Wharton (WJ-MSC).

En el cultivo tridimensional, las WJ-MSC se asentaron de manera homogénea, sobreviviendo ante situaciones de estrés, y además, expresaron y secretaron una vasta gama de factores tróficos relacionados con procesos de angiogénesis, tales como VEGF-A, Netrina-4, Angiogenina, Angiopoyetina-1, aFGF, entre otros. Sin embargo, el perfil de secreción de dichas células dependió de la matriz en que fueron cultivadas, siendo mejor conservado en matrices Integra®. Además, las WJ-MSC probaron ser angiogénicas *in vivo*, mejorando la reparación de piel mediante la secreción de factores tróficos. Interesantemente las WJ-MSC demostraron promover la formación de una red vascular definida y acelerada respecto del efecto promovido por las células mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo (AD-MSC), utilizadas como control, puesto que actualmente son utilizadas en la clínica con fines reparativos.

Cabe destacar que las WJ-MSC no generaron rechazo inmunogénico en los animales inmunocompetentes utilizados, permanecieron viables y confinadas dentro de las matrices implantadas, constituyendo a su vez un notable estímulo para la infiltración de células murinas.

Puesto que las WJ-MSC pueden ser aisladas con facilidad, son cultivadas con altas tasas de expansión y criopreservadas con un alto porcentaje de sobrevivencia. Si a esto agregamos, los resultados prometedores presentados en este trabajo, nosotros proponemos que estas células representan una fuente atractiva de MSC para uso en terapia celular alogénica para el tratamiento de isquemias agudas y/o crónicas.

ABSTRACT



Skin pathologies involving healing impairment constitute a serious problem in our society, which is why the search for new and reliable models that allows us to address the treatment of such wounds is fundamental.

In this work, a cell-based therapy centered in collagen bioartificial scaffolds enriched with Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSC), was evaluated in a wound healing mouse model.

In three-dimensional culture, WJ-MSC settled homogeneously, survived to stress conditions and furthermore, expressed and secreted a broad spectrum of trophic factors related to angiogenic processes, such as VEGF-A, Netrin-4, Angiogenin, Angiopoietin-1, aFGF, among others. However, cell's secretion profile depended on the scaffold in which they were cultivated, being better conserved on Integra® scaffolds. Moreover, WJ-MSC proved to be angiogenic *in vivo*, improving skin repair through the secretion of trophic factors. Interestingly, WJ-MSC demonstrated to promote the formation of a well-defined vascular network, that was accelerated when compared to the effect promoted

by Adipose tissue derived Mesenchymal Stem Cells (AD-MSC), which were used as control, since they are used currently in the clinic with reparative purposes.

It is worth mentioning that WJ-MSC didn't generate immunogenic rejection on the utilized immunocompetent animals. Additionally, cells remained viable and confined to the implanted scaffolds, provoking a notable stimulus for murine cell infiltration.

As WJ-MSC can be easily isolated, are cultured with high expansion rates and can be cryopreserved with great survival percentages. If we add the promising results presented in this work, is that we propose these cells as an attractive source of MSC for their use in allogeneic cell therapy for the treatment of acute and/or chronic ischemia.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes bibliográficos

1.1.1. Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos preexistentes y constituye un proceso esencial tanto en el desarrollo embrionario como en la homeostasis de tejidos y/o reparación de lesiones en individuos adultos. En mamíferos, este proceso se encuentra altamente regulado por múltiples factores, incluyendo la oxigenación y cambios en la actividad metabólica del tejido, puesto que los capilares son necesarios para la difusión de nutrientes y metabolitos (Krogh, 1919; Folkman & Shing, 1992). Tal como se indica en la Figura 1, se han descrito dos tipos de angiogénesis, “brotante” e “intususceptiva” (del inglés *sprouting* e *intussusceptive*, respectivamente (Adair & Montani, 2010).

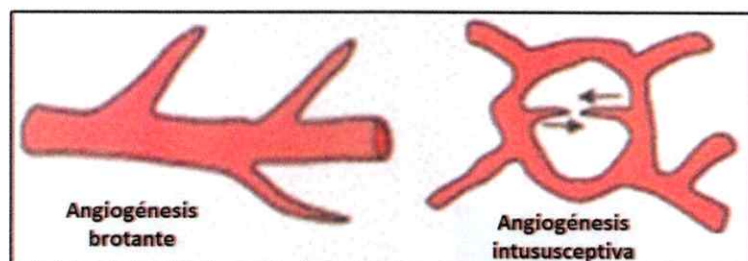


Figura 1. Tipos de angiogénesis. Esquema de la organización de los procesos de angiogénesis brotante (izquierda) e intususceptiva (derecha) (modificado de Adair & Montani, 2010).

La angiogénesis brotante se caracteriza por la formación de brotes compuestos por células endoteliales, que generalmente migran hacia estímulos angiogénicos, tal como

el factor de crecimiento vascular endotelial de tipo A (del inglés, *vascular endothelial growth factor*, VEGF-A) (Gerhardt, 2008). Es así como este tipo de angiogénesis puede añadir vasos a porciones de tejido carente de ellos. Por otra parte, la angiogénesis intususceptiva involucra la formación de vasos sanguíneos mediante un proceso de partición, en el cual, elementos del intersticio invaden los vasos existentes, formando una red de tejido transvascular que se expande (Makanya y col., 2009). Ambos tipos de angiogénesis pueden ocurrir en todos los tejidos del cuerpo (Adair & Montani, 2010).

En condiciones fisiológicas, los capilares crecen y retroceden en los tejidos sanos de acuerdo a las demandas funcionales de los mismos, sin embargo, estos procesos se desregulan en ciertas enfermedades (Contreras-Téllez y col., 2007). Es por esto que se ha reconocido que el control de la angiogénesis podría tener valor terapéutico, por ejemplo, al estimularla durante procesos de reparación de tejido dañado, así como también en pacientes que posean enfermedades de isquemia crónica (Danner y col., 2012), entendiendo por isquemia al estrés celular causado por la disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno, de nutrientes y la eliminación de desechos metabólicos (Varu y col., 2010), o bien, deprimirla en enfermedades como el cáncer o artritis reumatoide, entre otros (Adair & Montani, 2010).

Siguiendo con esta línea, es importante mencionar que la inducción de la angiogénesis se ha relacionado con moléculas de diversa índole, tales como las pertenecientes a la familia del VEGF, angiopoyetinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y miembros de la familia del factor de crecimiento tumoral (TGF), entre otros (Presta y col., 2005; Orock y col., 2007; Wilcke y col., 2007; Barrientos y col., 2008; Kaully y col.,

2009), siendo VEGF-A la proteína con mayor potencial pro-angiogénico descrito hasta la fecha (Otrock y col., 2007).

1.1.2. Similitudes a nivel molecular y estructural de los sistemas de guía axonal y vascular

Puesto que las redes vasculares y neuronales son dos sistemas ramificados complejos que comparten similitud en términos de su formación, organización y patrones de distribución en los tejidos (Figura 2), se ha postulado que ambas podrían estar finamente reguladas por factores en común (Carmeliet, 2003; Anders y col., 2006). El paralelismo celular entre el cono de crecimiento axonal de una neurona, y la célula endotelial punta presente en un vaso sanguíneo angiogénico, sugiere que estas estructuras, responden de manera similar a las señales químicas provenientes de sus respectivos medio ambientes (Tam & Watts, 2010), por lo que la investigación de moléculas de guía axonal (efrinas, semaforinas, slits y netrinas) en procesos de angiogénesis se ha vuelto relevante.

Diversos estudios han demostrado que las cuatro familias de moléculas de guía axonal son capaces de dirigir el patrón de formación del sistema vascular (Klagsbrun & Eichmann, 2005; Eichmann y col., 2005; Carmeliet & Tessier-Lavigne, 2005; Weinstein, 2005). Particularmente las netrinas, las primeras en ser identificadas como moléculas atractantes, han sido las más estudiadas a la fecha (Springer, 2008).

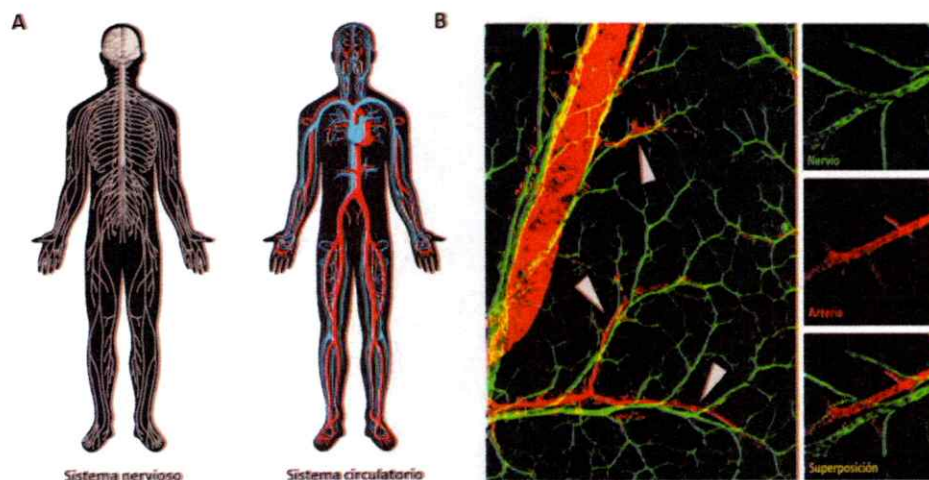


Figura 2. Similitud anatómica del sistema nervioso y vascular. A) Esquema del patrón anatómico común entre las redes del sistema vascular y circulatorio en el cuerpo humano (modificado de Tam & Watts 2010). B) Inmunofluorescencia *whole mount* de piel de una extremidad de ratón en estado embrionario E15.5 evidenciando la similitud en el patrón de distribución de nervios (verde) con arterias (rojo) (modificado de James & Mukoyama 2011).

En este sentido, ha sido descrito que factores de guía axonal pertenecientes la familia de las netrinas (Netrina-1, 2 y 4) estimulan la proliferación endotelial (Wilson y col., 2006; Castets y col., 2009) y existen variadas evidencias tanto *in vitro* (Klagsbrun & Eichmann, 2005; Yang y col., 2007) como *in vivo* (Wilson y col., 2006; Larrieu-Lahargue y col., 2010; Li y col., 2011) que sugieren que dichos factores cumplirían un rol en la regulación de la angiogénesis, tanto estimulándola (Park y col., 2004; Castets y col., 2009; Larrieu-Lahargue y col., 2010; Li y col., 2011) como deprimiéndola (Lejmi y col., 2008).

Por consiguiente, la inducción de procesos controlados de angiogénesis mediante el uso de estas moléculas angiogénicas no clásicas podría tener valor terapéutico en procesos de sanación de heridas.

1.1.3. Reparación tisular

La reparación de tejidos es uno de los procesos biológicos más complejos que ocurren durante la vida humana (Singer & Clark, 1999). Su estudio ha surgido en los últimos años con el objeto de desarrollar herramientas y tecnologías dirigidas a tratar enfermedades isquémicas de diversa índole. Luego de un daño, múltiples vías metabólicas y procesos extracelulares son activados y sincronizados para responder en pos de recobrar la homeostasis del tejido (Gurtner y col., 2008). Este proceso dinámico se divide en 3 fases que se sobreponen en el tiempo: inflamación, formación de tejido (proliferación) y remodelación del tejido (Maxson y col., 2012), en que participan componentes de la matriz extracelular, mediadores solubles, células de la sangre, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, entre otros tipos celulares (Singer & Clark, 1999).

Las grandes injurias provocadas en la piel pueden deberse a varios factores, tales como accidentes traumáticos, heridas producto de una cirugía, quemaduras graves, úlceras, entre otros, resultando en graves problemas funcionales y psicológicos a largo plazo para los pacientes (Egaña y col., 2009; Hocking & Gibran, 2010). Se sabe que la sanación de dichas heridas requiere de una compleja integración de eventos moleculares finamente regulados en el tiempo, relacionados tanto con la migración y la proliferación celular, como del establecimiento de la matriz extracelular y la participación de procesos angiogénicos (Gurtner y col., 2008). En personas sanas con heridas de poca profundidad, no existen mayores inconvenientes para la progresión del proceso de sanación, sin embargo, ésta se ve mayormente alterada en personas con heridas de sanación lenta, incluyendo heridas crónicas debido a patologías como la diabetes (Contreras-Téllez y col., 2007; With y col., 2009), así como también a las

heridas de gran tamaño y profundidad, que sanan mediante procesos de contracción, dejando cicatrices hipertróficas (Falanga, 2005).

En este escenario, la carencia de terapias confiables para el tratamiento de heridas de sanación lenta representa en la actualidad una limitante en el campo clínico (Pecoraro y col., 1990; Hocking & Gibran, 2010). Resulta evidente entonces, la necesidad de desarrollar nuevas terapias dirigidas tanto para heridas crónicas como para heridas profundas que desarrollan cicatrices hipertróficas.

1.1.4. Estrategias utilizadas para la regeneración de tejidos

En la actualidad, no existen alternativas posibles para una reconstrucción permanente del tejido posterior a prolongados períodos sin sanación del mismo. Es por esto que se han abordado diversas estrategias, tales como trasplantes de piel alogénicos (Burd & Chiu, 2005), spray de queratinocitos (Grant y col., 2002; Currie y col., 2003), inyección sistémica de células (Ezquer y col., 2008; Ezquer y col., 2011; Li y col., 2013), entre otros. Sin embargo, pese al progreso logrado en los últimos años mediante el uso de estas estrategias, es altamente probable que las heridas crónicas se resistan a las terapias antes mencionadas.

Con estos antecedentes es que se han generado materiales biosintéticos con la intención de sustituir la piel en heridas de sanación lenta o de gran extensión. Particularmente, el uso de matrices bioartificiales basadas en colágeno se ha vuelto relevante (Drury & Mooney, 2003; Moimen y col., 2006; Lee y col., 2008; Macneil, 2008; Murphy & O'Brien, 2010; Shi y col., 2011). Dichas matrices tienen como finalidad emular la matriz extracelular, reflejando de mejor manera las condiciones biológicas y



físicas en las que se encuentran naturalmente las células en los tejidos, actuando como andamiaje para la infiltración de células, seguido por procesos de angiogénesis y regeneración tisular (Moiemen y col., 2006).

El uso de matrices bioartificiales presenta una serie de ventajas en comparación con los trasplantes de piel. En el caso de un trasplante autólogo (del mismo individuo), existen riesgos asociados a la falta de sitios donadores de piel sana. Por otro lado, las estrategias de trasplante heterólogo (de otro individuo) y xenoinjerto (de otra especie), conllevan los riesgos de rechazo inmunogénico y transmisión de enfermedades.

Sin embargo, pese al hecho de que los materiales bioartificiales no presentan los problemas asociados a estrategias de trasplante, su uso es aún limitado debido a que existen reportes clínicos indicando altas tasas de infección en pacientes, junto con bajas capacidades regenerativas (Heimbach y col., 1988; Machens y col., 2000; Pham y col., 2007); problemas principalmente relacionados con una disminuida angiogénesis, que limita los niveles de oxígeno y nutrientes en la zona de la herida (Egaña y col., 2009).

Dado que el factor limitante para que una matriz bioartificial sea exitosa en la clínica es la vascularización, se han utilizado modelos de matrices bioartificiales unidos covalentemente a moléculas promotoras de angiogénesis o factores de crecimiento recombinantes tales como VEGF (Zisch y col. 2003; Kleinheinz y col., 2010), bFGF (Wilcke y col., 2007) y PDGF (Park y col., 2012), entre otros, que permitan una liberación lenta de los mismos.

Se ha postulado también como alternativa, la entrega directa de moléculas activas, como factores de crecimiento y citoquinas, al sitio de la herida. Dichas moléculas han

mostrado efectos pro-angiogénicos sustanciales en numerosos tipos celulares *in vitro* (incluyendo fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales), así como también una sanación acelerada en modelos murinos (Werner & Grose, 2003; Falanga, 2005; Eming y col., 2008; Barrientos y col., 2008). Sin embargo, pese al potencial del uso de factores recombinantes, a la fecha los ensayos clínicos no han sido del todo concluyentes (Falanga, 2012). La principal limitante de este tipo de ensayos, es que los factores no penetran el lecho de la herida en concentraciones suficientes para la mantención adecuada de dicho tejido (Falanga, 2012). Se ha demostrado además que en muchos casos, los factores de crecimiento entregados sufren una degradación rápida debido al ambiente proteolítico al cual son expuestos en el sitio de la herida (Robson y col., 1992; Mast, 1996; Robson, 1997). Es por esto que se ha propuesto el uso de células genéticamente modificadas para la síntesis y entrega de dichas moléculas en forma regulada con el objeto de sobrellevar las limitaciones asociadas a la aplicación tópica de proteínas recombinantes (Vogt y col., 1994; Nomi y col., 2002; Park y col., 2012; Song y col., 2012).

Cabe destacar que, puesto que la sanación de heridas es sumamente compleja, se encuentra guiada por una estricta regulación de muchos factores de crecimiento y citoquinas cuya acción es altamente específica en términos temporales y espaciales (Singer & Clark, 1999). Es por esto que ligeros cambios en los niveles de dichos factores, así como la secuencia temporal en que aparecen podrían llevar a un resultado completamente diferente (Barrientos y col., 2008; Gurtner y col., 2008; Maxson y col., 2012).

1.1.5. Terapia celular con células troncales

Considerando lo anterior, surge el planteamiento del uso de un sistema de terapia celular, que se adapte al microambiente dinámico de la herida, liberando únicamente la cantidad necesaria de factores de crecimiento en la secuencia temporal apropiada, así como también de los componentes de la matriz extracelular (Schultz y col., 2012; Falanga, 2012). Esto es posible mediante el uso de células que naturalmente presenten un secretoma rico en factores de crecimiento y citoquinas que modulen la inflamación de la herida (Hocking & Gibran, 2010), en un proceso de interacción activa y bidireccional entre las células y el microambiente que las envuelve. Dichas interacciones juegan un rol fundamental durante procesos de regeneración de tejidos, puesto que las respuestas moleculares y celulares de la herida se ven dirigidas por esta conversación (Schultz y col., 2012).

A la fecha, se han abordado terapias celulares mediante el uso de queratinocitos (Grant y col., 2002; Truong y col., 2005), fibroblastos (Yasuoka y col., 2008; Martínez-Santamaría y col., 2013), así como la combinación de ambos tipos celulares (Kim y col., 1999; Wisser & Steffes, 2003). Sin embargo, el uso exclusivo de estos 2 tipos celulares no puede reemplazar todas las funciones del tejido sano (Supp & Boyce, 2005), por lo que se ha incluido el uso de otros tipos celulares en ingeniería de tejidos. Un ejemplo de ello es el uso de células endoteliales, que han sido estudiadas *in vitro* para iniciar los procesos de angiogénesis (Schechner y col., 2000), empero no ha sido demostrado *in vivo* (Sahota y col., 2003).

Con estos antecedentes en consideración es que se ha propuesto la inclusión de células genéticamente modificadas en sustitutos de piel para poder, en teoría,

sobrellevar estas limitaciones mediante la sobreexpresión de factores tróficos relacionados con el proceso de sanación (Vogt y col., 1994; Werner & Grose, 2003). Sin embargo, los resultados no han sido del todo concluyentes (Supp & Boyce, 2005). Con lo cual, surge el planteamiento del uso de células que de manera endógena expresen factores que asistan la sanación de tejidos de manera homeostática.

En este sentido, se ha propuesto que el uso de células troncales puede ser de gran utilidad para el tratamiento de diversos síndromes y patologías donde la vascularización se encuentre alterada (Wei y col., 2012). Más aún, durante los últimos años, el uso de las células troncales se ha destacado con un rol importante dentro de la investigación y aplicación en el área clínica (Salem & Thiemermann 2010; Bartosh y col., 2010; Azari y col., 2011; Volarevic y col., 2011; W.-Y. Lee y col., 2012; Danner y col., 2012; Sukpat y col., 2013).

Las células troncales se caracterizan por tener distintas propiedades que permiten la autorenovación y diferenciación hacia múltiples linajes celulares y tipos de tejidos. Dicho potencial de diferenciación es jerárquico, siendo en orden descendiente: totipotente → pluripotente → multipotente → unipotente. Las células troncales se clasifican de acuerdo a la etapa específica de la ontogénesis en que aparecen, es decir, embrionario, fetal o perinatal y adulto (Pappa & Anagnou, 2009). Esto es importante puesto que la obtención y uso de células troncales embrionarias está fuertemente limitada por temas éticos y regulatorios, al ser obtenidas a partir de los primeros estadios del desarrollo embrionario (Wobus & Boheler, 2005)

Debido a lo anterior, es que la mayor parte de la investigación se ha centrado en las células troncales de origen perinatal y adulto, las cuales se pueden subdividir en dos

tipos de células troncales multipotentes, con capacidad de diferenciación a un número de linajes celulares limitado (Wolf, 2009), que son las hematopoyéticas y las mesenquimáticas, también denominadas células mesenquimales multipotentes del estroma (Phinney & Prockop, 2007).

1.1.6. Células troncales mesenquimáticas (MSC)

Las MSC se caracterizan por una serie de propiedades, tales como: (1) capacidad de auto-renovación (Peng y col., 2008); (2) multipotencia, potencial de diferenciación hacia diversos tejidos del linaje mesenquimático (osteocitos, condrocitos, adipocitos, mioblastos, cardiomiocitos, entre otros) tanto *in vitro* (Mouiseddine y col., 2007) como *in vivo* (Stewart & Stewart, 2011) y posiblemente también a tejido no mesenquimático (neuronal, endotelial, hepático) (Schwartz y col., 2002; Lee y col., 2004; Wagner y col., 2005); (3) formación de colonias fibroblastoide (CFU-F) cuando son cultivadas sobre superficies de plástico (Castro-Malaspina y col., 1980); (4) expresión de marcadores típicos de células troncales (CD29, CD44, CD73, CD105), así como la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos (CD14, CD34, CD45) (Wang y col., 2004; Pozzi y col., 2006; Rojewski y col., 2008) y muy importantemente, (5) participan en la homeostasis de tejido mediante la secreción de factores de crecimiento y citoquinas (Stappenbeck & Miyoshi, 2009).

El uso de MSC en terapia celular resulta particularmente ventajoso debido una serie de factores. Pueden ser aisladas y expandidas de manera confiable a partir de una amplia gama de tejidos y fluidos corporales (Stewart & Stewart, 2011), principalmente en nichos perivasculares (Hass y col., 2011), tales como la médula ósea (Friedenstein y

col., 1968), tejido adiposo (Zuk y col. 2002), membrana sinovial (De Bari y col., 2001), sangre periférica (Cao y col., 2005), cordón umbilical (Wang y col., 2004), entre otros. Asimismo, se ha demostrado que las MSC secretan una gran cantidad de factores tróficos que favorecen la angiogénesis, migración hacia el sitio del daño, proliferación, diferenciación y remodelamiento de la matriz extracelular (Valtieri & Sorrentino, 2008; Hematti, 2009; Ribeiro y col., 2012; Burlacu y col., 2013). Las MSC tienen notables capacidades inmunomodulatorias y anti-inflamatorias, así como una baja expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I y nula expresión de clase II (Morandi y col., 2008), además poseen la capacidad de migrar hacia zonas patológicas, incluyendo heridas o áreas isquémicas (Roufosse y col., 2004). Por lo tanto, la habilidad de dichas células de modificar el microambiente de la herida mediante su migración hacia el sitio del daño y posterior secreción de factores tróficos, puede contribuir de manera significativa a la reparación de éstos (Phinney & Prockop, 2007).

Una de las fuentes de MSC más utilizada, por ser la primera en ser descrita, es la de médula ósea (BM-MS) (Friedenstein y col., 1970), cuyo estudio y uso presenta resultados prometedores en terapia celular regenerativa (Chen y col., 2009; Hocking & Gibran, 2010; L. Wei y col., 2012). Sin embargo, las BM-MS presentan una serie de limitaciones, debido a que su obtención es invasiva y la cantidad de células obtenida por cada extracción es relativamente baja, aún más, tanto su número *in vivo* como su capacidad de expansión y diferenciación *ex vivo* van declinando con la edad del donante, así como también de las patologías que éste pueda padecer (como diabetes, hepatitis, etc.) (Shetty y col., 2011). Estas razones han obstaculizado su uso en protocolos de regeneración tisular, por lo que ha emergido el uso de células mesenquimáticas derivadas de otras fuentes, como el tejido adiposo (AD-MS), cuya

obtención es menos invasiva que las BM-MSC al ser aisladas a partir de lipoaspirados. El método de obtención de las AD-MSC provee un número celular mayor que las BM-MSC por cada extracción (Zuk y col., 2002) y se ha demostrado que las AD-MSC presentan una mayor tasa de proliferación y supervivencia en condiciones de estrés cuando se compara con BM-MSC (Peng y col., 2008). Sin embargo, posteriormente se describió que independiente de la fuente de MSC, la edad del donante se ve en directa relación con efectos perjudiciales en términos de proliferación y multipotencia (Sensebé y col., 2011).

Con esto en evidencia, nace la necesidad de buscar fuentes jóvenes de MSC. En particular, el tejido perinatal resulta atractivo, puesto que contiene un gran volumen de tejido, es de fácil acceso y su uso no presenta dilemas bioéticos como el de las células troncales de origen embrionario (Pappa & Anagnou, 2009), sumado al hecho de que contienen grandes poblaciones de MSC (Sensebé y col., 2011). Es relevante destacar a su vez que, existen estudios indicando que las distintas fuentes de MSC presentan una gran variabilidad en su secretoma (Wagner y col., 2005; Ribeiro y col., 2012; Hsieh y col., 2013), reforzando la idea de que nuevas fuentes de MSC podrían resultar más idóneas para su aplicación en medicina regenerativa.

El cordón umbilical, es un ejemplo de tejido perinatal que tradicionalmente es considerado un material de desecho, se obtiene mediante un procedimiento que no es invasivo ni presenta dilemas bioéticos por lo que se convierte en una atractiva fuente de MSC (Troyer & Weiss, 2008).

1.1.7. Células troncales mesenquimáticas de la gelatina de Wharton (WJ-MSC)

El cordón umbilical es un anexo extraembrionario que posee en el interior una vena y dos arterias, rodeadas por un tejido conjuntivo denominado gelatina de Wharton, rico en células estromales (Figura 3), que serán el foco de estudio del presente trabajo.

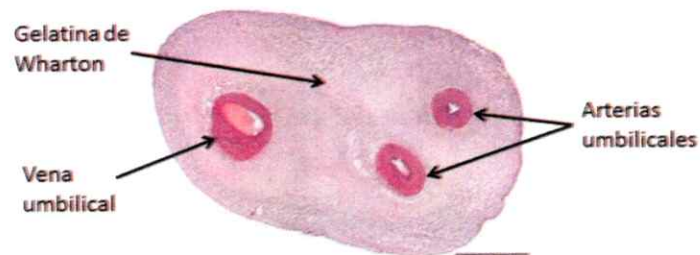


Figura 3. Histología de un cordón umbilical humano. Corte histológico de un cordón umbilical teñido con Hematoxilina & Eosina. El tejido correspondiente a la Gelatina de Wharton, así como la vena y dos arterias están indicados. Barra: 2 mm (Modificado de A. Kadner y col., 2004).

Se ha sido descrito que las WJ-MSC expresan diversos factores de crecimiento y citoquinas relacionados con procesos de angiogénesis y regeneración de tejidos (Wilson y col., 2006; Shetty y col., 2011; Carvalho y col., 2011; Bulmer y col., 2012; Ribeiro y col., 2012). Lo anterior, sumado al hecho que las WJ-MSC se encuentran naturalmente en un ambiente inmunotolerante (Weiss y col., 2008), las vuelve potencialmente aptas para su uso en terapia celular alogénica, superando ampliamente las limitaciones que presentan las BM-MSC y AD-MSC.

Es relevante mencionar que trabajos desarrollados en el marco del Proyecto FONDEF D0911047, han permitido caracterizar, estandarizar y optimizar las condiciones de

cultivo de WJ-MSC, así como la realización de una serie de estudios *in vitro* en cuanto a la liberación de factores promovedores de la angiogénesis y cicatrización.

1.1.8. Aplicación de MSC en reparación tisular

A la fecha se han realizado ensayos de terapia celular (autogénica o alogénica) en modelos animales cuya administración se realizó mediante inyección intraperitoneal, intravenosa o directa en la zona de la herida, cuyos resultados han sido exitosos, donde las MSC utilizadas se establecieron en el sitio de la herida y promovieron la sanación del tejido dañado (Kim y col., 2012; Guercio y col., 2012; Dong y col., 2012; Li y col., 2013). Sin embargo, no se ha demostrado que dichas células no migren hacia otros tejidos promoviendo la formación de tumores; más aún, existen trabajos donde se demuestra que MSC inyectadas mediante administración intravenosa en ratones migran hacia el hígado, médula espinal, corazón y riñones (Ezquer y col., 2008; Ezquer y col., 2011; Li y col., 2013).

Asimismo, mantener las células aplicadas en el sitio del daño resulta fundamental, puesto que los factores tróficos que éstas secreten, deben actuar sobre la herida y sus proximidades para ejercer el efecto esperado, no así sobre tejidos distantes. Es por esto que se ha abordado la estrategia del uso de células en combinación con matrices bioartificiales (Lee y col., 2008; Egaña y col., 2009; Shi y col., 2011; Danner y col., 2012), a modo de otorgar una superficie de adhesión a las células que posiblemente las mantenga confinadas al sitio de la herida.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo con células humanas implantadas en animales inmunodeprimidos (Truong y col., 2005;

Sukpat y col., 2013), subestimando el rechazo inmunogénico que podría sufrir el animal en el caso de abordarse una terapia celular alogénica. Sería interesante entonces, evaluar los efectos inmunomodulatorios que podrían presentar MSC implantadas en un modelo animal inmunocompetente.

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados, queda en evidencia el atractivo que podría presentar, para la abordar una terapia celular alogénica, la bioactivación de matrices artificiales mediante la combinación *in vitro* con WJ-MSC, productoras de factores tróficos que fomenten la reparación de tejidos y angiogénesis funcional.

La presente memoria de título tiene por objetivo analizar el comportamiento de las WJ-MSC *in vitro* e *in vivo* al ser cultivadas sobre matrices bioartificiales, enfocándose en su potencial promovedor de angiogénesis y regeneración dermal *in vivo*.

1.2. Hipótesis

Las células troncales mesenquimáticas humanas provenientes de la gelatina de Wharton (WJ-MSC) incluidas en una matriz biosintética inerte promueven la reparación de tejidos en un modelo murino.

1.3. Objetivo general

Determinar la producción de factores tróficos de las WJ-MSC sembradas en una matriz biosintética para su posterior evaluación en un modelo murino de reparación dermal.

1.4. Objetivos específicos

1. Evaluar la adhesión, viabilidad y expresión de factores pro-angiogénicos de las WJ-MSC cultivadas en distintas matrices *in vitro*.
2. Establecer la contribución del cultivo de WJ-MSC en matrices implantadas en ratones en cuanto a la angiogénesis e inflamación sistémica.
3. Cuantificar la permanencia y viabilidad de las WJ-MSC en matrices implantadas en ratones con lesiones tisulares inducidas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de cordones umbilicales y consideraciones éticas

Las muestras de cordón umbilical fueron obtenidas a través de VidaCel previo consentimiento informado para la donación del material biológico de las pacientes reclutadas en el marco de este Proyecto. Dichas muestras fueron utilizadas solo con el fin expuesto en este seminario de título, que cuenta con la aprobación de Comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y con la aprobación del Comité asesor de bioética de FONDEF (D09I1047).

Posterior al alumbramiento, el equipo de asistentes parámedicos de la sala de partos depositó los cordones en DMEM (Gibco, Life Technologies) estéril suplementado con 1% (v/v) antibióticos (100 U/ml Penicilina/Estreptomicina, HyClone, Thermo Scientific). Sólo fueron seleccionadas aquellas muestras normales y de término.

2.2. Cultivo primario de Células Mesenquimáticas de la Gelatina de Wharton

Se realizaron los cultivos de WJ-MSC a partir de cordones umbilicales frescos (no más de un día a partir de la fecha de parto), según un protocolo previamente descrito (Prasanna y col., 2010). Brevemente, el cordón fue cortado en trozos de 1 cm a los que se les retiraron los lechos vasculares. La gelatina de Wharton fragmentada fue digerida con la enzima colagenasa tipo I a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (215 U, Gibco by Life Technologies) durante un período de 15-20 horas a 37°C con agitación suave. Luego de dicho período, se descartaron los restos no digeridos mediante filtración por gravedad. El tejido digerido y filtrado, se disolvió con PBS [(mM): KH_2PO_4 1.059, NaCl

155.172, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.966, pH 7.4 (Gibco)] sucesivas veces, intercalando con centrifugaciones a 400 x g durante 10 minutos en cada paso (Hettich zentrifugen, Rotofix 32). 2×10^6 células fueron sembradas en placas de cultivo de 100 mm en medio de cultivo completo: DMEM (Gibco by Life Technologies) pH 7.2 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Biological Industries) y 1% (v/v) de antibióticos [100 U/ml Penicilina/Estreptomicina (HyClone, Thermo Scientific)].

Los cultivos fueron incubados (HEPA Class 100, Thermo Electron Corporation) a 37°C, bajo condiciones controladas de humedad (95%), dióxido de carbono (5%) y oxígeno (21%).

Luego de 24 horas se eliminó la fracción de células no adherentes y se realizó un recambio con medio fresco. A partir de este momento, el medio de cultivo se cambió cada 3 días hasta obtener una monocapa de células semiconfluente que fue estimada por observación directa bajo el microscopio de luz óptica. Al alcanzar un 90% de confluencia, las células fueron tratadas con tripsina [0.025%, 37°C, 5 minutos (HyClone, Thermo Scientific)] y subcultivadas en las mismas condiciones de cultivo para su amplificación.

Todos los experimentos se realizaron con cultivos primarios de células en pasaje igual o menor a 6.

2.3. Cultivo en matrices tridimensionales

Las WJ-MSC se cultivaron sobre matrices Integra Matrix (IM), comercialmente disponibles (Integra®, LifeScience Corporation), así como también en matrices de colágeno tipo I generadas en el laboratorio a partir de tendones de cola de rata. Se

utilizaron también las matrices denominadas Integrated Implant System (IIS), que han sido desarrolladas por un grupo de investigadores de la Universidad de Valparaíso, liderados por la Dra. Caroline Weinstein (Weinstein-Oppenheimer y col. 2010), cuyo desarrollo y evaluación fue financiado por los proyectos FONDEF D02I1009 y FONIS SA06I20092.

2.3.1. Matrices Integra (IM)

En términos generales, las matrices Integra están compuestas por fibras de colágeno bovino entrelazadas con glicosaminoglicanos, formando una estructura porosa biodegradable que simula la matriz extracelular presente naturalmente en los tejidos (Murphy & O'Brien, 2010)

El protocolo de cultivo tridimensional en estas matrices ha sido descrito previamente (Egaña y col., 2009). En breves términos, se utilizaron trozos de IM, cuyo tamaño varió de acuerdo al experimento realizado, siendo de 6 mm de diámetro (capa simple) para los experimentos *in vitro* y de 12 mm de diámetro (con una monocapa de silicona) para los experimentos *in vivo*. En ambos casos, las matrices fueron secadas con gasa estéril y depositadas en una placa de 24 pocillos donde se sembraron las MSC resuspendidas en medio de cultivo completo. Finalmente, las células se incubaron en las matrices durante 60 minutos y se añadió el medio correspondiente en cada condición experimental.

2.3.2. Matrices de colágeno I de cola de rata.

El colágeno utilizado para estas matrices se obtuvo a partir de colas de ratas adultas Sprague-Dawley, según previamente descrito (Elsdale & Bard 1972). Brevemente, se aislaron los tendones de las ratas, se sumergieron en ácido acético 0,1 N y se mezclaron durante 3 días a 4°C. Posteriormente, se filtró con gasa para ser ultracentrifugadas (17000 x g, 4°C, 2 horas), recuperándose el sobrenadante que fue utilizado como solución de colágeno tipo I. Finalmente, dicha solución se dializó con DMEM (1/10, pH 4.0, 4°C, 48 horas), cambiando el medio una vez durante el transcurso de la diálisis.

Las matrices de colágeno I provenientes de cola de rata solamente fueron utilizadas para experimentos *in vitro*. Éstas se generaron en una proporción 7:2:1, donde el 70% corresponde a la preparación de colágeno tipo I, el 20% a medio DMEM (4X, pH 7.2) y el 10% restante a las células resuspendidas en medio completo. Rápidamente, se depositó un volumen de 80 µl de dicha mezcla en placas de 96 pocillos, procurando no generar burbujas, posterior a lo cual se incubó a 37°C durante un período de 5 a 10 minutos para permitir que el colágeno polimerice. Finalmente se trasladaron las matrices a placas de 24 pocillos para añadir el medio de cultivo correspondiente a cada condición experimental.

2.3.3. Matrices Integrated Implant System (IIS)

Las matrices IIS están basadas en quitosano, ácido acético y ácido hialurónico, que además incluyen geles de fibrina en su interior, las cuales fueron utilizadas únicamente para experimentos *in vitro*. Se cortaron trozos de IIS de 6 mm de diámetro en seco, los

cuales fueron esterilizados con etanol 70% durante 24 horas, posterior a lo cual fueron secadas con gasas estériles y traspasadas por una solución de DMEM con 1% de antibióticos durante 24 horas para desplazar el etanol contenido en ellas. Luego, se secaron nuevamente con gasa estéril y se depositaron en una placa de 24 pocillos donde se sembraron las MSC resuspendidas en medio de cultivo completo. Finalmente, se incubaron las matrices durante 60 minutos y se adicionó el medio de cultivo correspondiente en cada condición experimental.

2.4. Ensayos *in vitro*

Se realizaron estudios *in vitro* para determinar el comportamiento de las WJ-MSC en diversas matrices tridimensionales en cuanto a su asentamiento, viabilidad, expresión y secreción de factores tróficos involucrados en procesos de angiogénesis y reparación de tejidos.

También se realizaron ensayos comparativos de dicho comportamiento para la matriz Integra Matrix entre WJ-MSC y AD-MSC.

2.4.1. Asentamiento y distribución de las células en las matrices

Se sembraron 1×10^5 WJ-MSC en cada una de las matrices (IM, Colágeno e IIS), así como también 1×10^5 AD-MSC (solamente en IM), incubándolas con medio de cultivo completo. Luego de 48 horas, se fijaron las matrices con PFA 4% (p/v) durante 30 minutos en agitación suave y se retiró el excedente con lavados sucesivos de PBS (3 x 10 minutos).

Para la visualización de las células se realizó una inmunofluorescencia para el marcaje de núcleo con TO-PRO (TO-PRO-3 iodide, Invitrogen) y filamentos de actina con faloidina (Phalloidin-TRITC, Sigma-Aldrich).

Para la permeabilización celular, se utilizó una solución de PBS, 5% BSA, 0.2% Triton X-100, durante 5 minutos a temperatura ambiente y agitación suave, seguido de 2 lavados con PBS durante 5 minutos. La incubación de las sondas se realizó en una solución de PBS, faloidina (1:50), TO-PRO3 (1:200) durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda, seguido de 3 lavados con PBS de 5 minutos. Para montar las muestras, se utilizó el protector de fluorescencia VectaShield® (Vector H-1000) y para la obtención de imágenes se utilizó el microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta. Las longitudes de onda de excitación y emisión para cada color están explicitadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Longitudes de onda de excitación y emisión para los colores rojo, rojo lejano y verde utilizadas en experimentos de microscopía confocal

| Color | Sonda/ Marcaje | λ excitación | λ emisión (rango) |
|-------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Rojo | Faloidina/ Filamentos de actina | 543 nm | 560 nm – 615 nm |
| Rojo lejano | TO-PRO3/ DNA | 633 nm | > 650 nm |
| Verde | Matriz autofluorescente | 488 nm | 505 nm – 530 nm |

2.4.2. Viabilidad de las células en las matrices

A modo de evaluar la viabilidad de las células (tanto WJ-MSC como AD-MSC) en las distintas matrices, se cuantificó la actividad metabólica mediante un ensayo de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) en un compuesto coloreado de tonalidad azul (formazan) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa.

En términos breves, se sembraron 1×10^5 MSC en condiciones de privación de FBS durante 12, 24, 48, 120 y 240 horas, luego de lo cual, se añadió el reactivo MTT (Sigma-Aldrich) 0.5 mg/ml en PBS (Gibco, Life Technologies) sobre las matrices con células y en ausencia de ellas como control negativo. La reacción se incubó a 37°C durante una hora, posterior a lo cual se secó levemente la matriz con una gasa y se depositó en un tubo conteniendo dimetilsulfóxido (DMSO), que disuelve el azul de formazan sintetizado en las matrices (por la actividad mitocondrial de las células), generándose una solución coloreada cuya intensidad puede ser cuantificada mediante absorbancia a 550 nm.

2.4.3. Expresión de factores tróficos

Se sembraron 10^5 WJ-MSC en cada una de las matrices y se cultivaron durante 24 horas en ausencia de FBS, posterior a lo cual se evaluó la expresión de los factores promovedores de la angiogénesis Netrina-1, Netrina-4 y VEGF-A a nivel de mRNA como de las proteínas Netrina-4 y VEGF-A mediante ensayos de RT-PCR y Western blot, respectivamente. Además de evaluar la secreción de dichas moléculas mediante Western blot, también se midió junto a una serie de otros factores tróficos relacionados con la angiogénesis mediante el uso de un kit (Proteome Profiler Array).

2.4.3.1. Expresión a nivel de mRNA

a) **Extracción de mRNA.** Para esto, se procesó la matriz con la ayuda de un homogeneizador pequeño y se extrajo mRNA desde las células contenidas en la matriz mediante el Reactivo RNA-Solv (Omega Bio-tek). Posterior a esto se extrajo el RNA

total según las instrucciones del fabricante. Finalmente se resuspendió el "pellet" de RNA con agua libre de RNasas (DEPC Treated water, Invitrogen).

En este punto se cuantificó el mRNA al medir la absorbancia con un Nanofotómetro (Implen) a 260 nm y se cargaron 2 µl por muestra en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8.0) conteniendo 3 µl de rojo-gel (GelRed Nucleic Acid Stain Biotium) por cada 150 ml de mezcla, donde se separaron electroforéticamente para verificar su integridad (150 Volt, 30 minutos). El tamaño de las bandas de RNA se evaluó utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kp (Fermentas).

b) Tratamiento con DNasa I. Se trató el RNA extraído con la enzima DNasa I con el fin de eliminar trazas de DNA presentes en la muestra. Para ello, se utilizó 1 µg de RNA por reacción, 1 µl de DNasa I 1U/1 µl (Promega M610A), 1 µl Buffer DNasa I 10X (Promega M198A) y se completó con agua libre de nucleasas hasta obtener un volumen de 10 µl, el cual se incubó a 37°C durante 30 min, luego de lo cual se detuvo la reacción con 1 µl de DNasa Stop solution (Promega M199A) incubando a 65°C durante 10 minutos.

c) Síntesis de cDNA. Se sintetizó DNA complementario (cDNA) en un volumen total de 20 µl, donde 10 µl corresponden a las muestras de RNA tratadas con DNasa I, mientras que los otros 10 µl corresponden a una mezcla de 0,5 µl de partidores aleatorios 3 µg/µl (Random primer, ThermoScientific, 4 µl de inhibidor de RNasa (RNAsin^R, Promega), 2 µl de dNTPs 10 mM, 4 µl de amortiguador 5X (Buffer RT, Fermentas), 1 µl de transcriptasa reversa 200 U/µl (RevertAidTM ThermoScientific) y 2 µl de agua libre de nucleasas (DEPC) para completar el volumen mencionado. La

reacción se incubó a 42°C durante 60 minutos y se detuvo calentando la mezcla durante 10 minutos a 70°C.

d) **RT-PCR.** Una vez sintetizado el cDNA, se amplificaron las secuencias humanas de *Netrina-1*, *Netrina-4*, *VEGF-A* y *GAPDH* mediante un PCR convencional. La Tabla 2 muestra las secuencias de los partidores utilizados, así como el tamaño del producto de PCR obtenidos con cada pareja de partidores.

Tabla 2. Secuencias de partidores utilizados en la amplificación del cDNA generado y tamaño de amplicones generados.

| Transcrito | Secuencias de partidores | | Tamaño de amplicón |
|---------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------|
| | Anterógrado | Retrógrado | |
| <i>NTN-1</i> | 5' TGCAAGAAGGACTATGCCGT 3' | 5' GCTCGTGCCTGCTTATACAC 3' | 203 pb |
| <i>NTN-4</i> | 5' TCAGCACAACACAGAAGGACA 3' | 5' GGATGGCAGGAACACGGTTTG 3' | 108 pb |
| <i>VEGF-A</i> | 5' CTCTACCTCCACCATGCCAAG 3' | 5' AGACATCCATGAACCTCACCCTTC 3' | 111 pb |
| <i>GAPDH</i> | 5' CAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC 3' | 5' CCACCACCCTGTTGCTGTAG 3' | 94 pb |

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, donde 1 µl corresponde a cDNA, mientras que los otros 24 µl a la mezcla de los otros componentes de la reacción (5 µl Buffer 5X GoTaq Flexi, 0.125 µl de GoTaq, 0.5 µl partidior anterógrado, 0.5 µl partidior retrógrado, 0.5 µl dNTPs 10 mM, 1.5 µl MgCl₂ 25 mM y 15.875 µl de agua libre de nucleasas). El blanco de cada reacción se realizó en paralelo, utilizando 1 µl de agua DEPC en lugar de 1 µl de DNA molde.

La amplificación se realizó en un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) bajo las condiciones indicadas a continuación:

- Denaturación inicial : 95°C 2 min
- | | | | | | |
|---|--------------|--------|------|---|------------|
| ○ | Denaturación | : 95°C | 35 s | } | x n ciclos |
| ○ | Hibridación | : 60°C | 40 s | | |
| ○ | Elongación | : 72°C | 30 s | | |
- Elongación final : 72°C 5 min

Donde n = 35 ciclos, con la excepción del caso de *VEGF-A*, donde n = 30 ciclos.

Los amplicones se separaron electroforéticamente en geles de agarosa (2%) en buffer TAE conteniendo rojo-gel (3 µl / 150 ml de gel), posteriormente se obtuvo una imagen digitalizada (Canon PowerShot A480), utilizando un transiluminador-UV. La intensidad de las bandas fue cuantificada mediante la medición de píxeles con el software ImageJ (*National Institute of Health*, EEUU).

2.4.3.2. Expresión a nivel de proteínas

a) Extracción de proteínas. Para extraer las proteínas de las células inmersas en las matrices, se trasladaron las matrices a un tubo conteniendo buffer de lisis (SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl pH 6,8 50 mM) mezclado con un cocktail de inhibidor de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche). Luego se procesó con la ayuda de un homogeneizador y se retiraron los restos de matriz no homogenizados, posteriormente se lisó con una jeringa para un procesamiento más fino. Finalmente se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C (Hermle, Z233) y se recolectó el sobrenadante, cuya concentración de proteínas fue cuantificada mediante el uso de un kit (*DC Protein Assay*, Bio-Rad) según las indicaciones del fabricante.

b) Electroforesis en geles de poliacrilamida. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% mediante SDS-PAGE. Dichas muestras fueron previamente denaturadas mediante la mezcla con buffer de carga 6X (Tris HCl 1 M pH 6.8 70%, glicerol 30%, SDS 0.1 g/ml, azul de bromofenol 0.12 mg/ml y β -mercaptoetanol 5%) durante 5 minutos a 95°C. La fase de concentración se realizó a 70 Volt (15 minutos), mientras que la separación de proteínas se realizó a 120 Volt (2 horas). Para estimar el tamaño de las proteínas separadas, se utilizó un marcador de peso molecular entre 10 y 250 kDa (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific).

c) Western blot. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (0.45 μ m) mediante el uso del equipo de transferencia Trans-blot[®] Turbo[™] Blotting System (BioRad), a 25 V con una corriente máxima de 2.5 Ampère durante 1 hora.

Posteriormente, se tiñeron las membranas con una solución de Ponceau (Ponceau 0.1% en ácido acético 5%) para verificar correctamente la transferencia. La solución Ponceau se retiró mediante lavados con TBS-Tween 0.1% (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) y se bloqueó e incubó con la concentración de anticuerpos correspondiente en cada caso (Tabla 3).

Después de la incubación con los anticuerpo primarios y secundarios para cada proteína, las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1% (3 x 10 minutos) y finalmente se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando un sustrato pico sensible (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) o femto sensible (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific).

Las bandas reveladas en placas radiográficas (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm) fueron analizadas mediante la cuantificación de píxeles (ImageJ).

Tabla 3. Resumen de concentraciones de leche descremada, anticuerpos y tiempos de incubación para los ensayos de Western blot realizados.

| Epítoto | Bloqueo | Anticuerpo primario | Anticuerpo secundario |
|--|--------------------|---|---|
| Netrina-4 (70-75 kDa) | 5% leche 1 hora | 1:1000 (cabra) 1% leche, 15 horas (R&D, AF 1254) | 1:2000 (burro) 5% leche 3 horas (Santa cruz, SC2020) |
| VEGF-A (43 kDa) | 5% leche 1 hora | 1:1000 (conejo) 5% leche, 15 horas (Abcam, ab46154) | 1:5000 (cabra) 5% leche, 1 hora (Jackson ImmunoResearch, 111-036-003) |
| β-actina (42 kDa) | 5% leche 1 hora | 1:5000 (ratón) 5% leche, 1 hora (Sigma-Aldrich, A 5316) | 1:5000 (cabra) 5% leche, 1 hora (Jackson ImmunoResearch, 115-036-003) |

2.4.3.3. Secreción de factores angiogénicos

a) **Western blot.** Para realizar ensayos de Western blot, fue necesario generar un protocolo de concentración de proteínas presentes en el sobrenadante de las células. Por cada 1 ml de medio condicionado, se añadieron 500 μ l de metanol frío y se agitó en vortex durante 30 segundos, posterior a lo cual se añadieron 125 μ l de cloroformo frío, agitando nuevamente en vortex por 20 segundos. Esta solución se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C (Hermle, Z 233), separándose la mezcla en 3 fases. Se conservó la interfase y se descartó el resto, resuspendiendo en 25 μ l de *buffer* de lisis con inhibidor de proteasas para su posterior cuantificación (*DC Protein Assay*, Bio-Rad). Se utilizaron 60 μ g de proteínas para realizar ensayos de Western blot como fue descrito en la sección 2.4.3.2, con leves cambios en las condiciones de incubación (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de concentraciones de leche descremada, anticuerpos y tiempos de incubación para los ensayos de Western blot a partir de medios condicionados.

| Epítipo | Bloqueo | Anticuerpo primario | Anticuerpo secundario |
|---------------------------------|--------------------|--|--|
| Netrina-4 (70-75 kDa) | 1% leche 1 hora | 1:1000 (cabra) 1% leche, 15 horas (4°C) + 2 horas (T. ambiente) (R&D, AF 1254) | 1:2000 (burro) 5% leche 3,5 horas (Santa Cruz, SC2020) |
| VEGF-A (43 kDa) | 5% leche 1 hora | 1:1000 (conejo) 5% leche, 15 horas (4°C) + 2 horas (T. ambiente) (Abcam, ab46154) | 1:5000 (cabra) 5% leche, 1,5 horas (Jackson ImmunoResearch, 111-036-003) |

Como control de carga se utilizó la cuantificación de píxeles de la tinción con solución Ponceau.

b) Proteome profiler array. Se utilizaron medios condicionados de WJ-MSC cultivados en matrices IM y de colágeno para la realización de los ensayos de proteoma según las indicaciones del fabricante (Human Angiogenesis Array Kit, Proteome Profiler Antibody Arrays, R&D Systems).

En breves términos, este kit permite detectar simultáneamente, de manera rápida y sensible, los niveles de expresión de 55 proteínas relacionadas con procesos angiogénicos sin la necesidad de realizar ensayos por separado para cada una de ellas. Para lograr esto, el kit provee de membranas de nitrocelulosa que contienen anticuerpos específicos adosados en puntos por duplicado, mientras que la muestra debe ser preparada con un *cocktail* de anticuerpos acoplados a biotina. Posterior a esto, la muestra es incubada sobre la membrana, pegándose las proteínas a su anticuerpo específico. Luego de tres lavados se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) que reconoce la biotina. Finalmente, la

presencia de la peroxidasa permitió, mediante una reacción de quimioluminiscencia, detectar la cantidad de cada uno de los analitos presentes en el medio de cultivo.

2.5. Ensayos *in vivo*

Cada set experimental constó de la operación de ratones Balb/c macho de 2 – 4 meses de edad, en los cuales se implantaron matrices IM conteniendo WJ-MSC, AD-MSC o acelulares, manteniéndolos durante períodos de 5 ó 10 días para evaluar la respuesta del ratón en términos de sanación de la herida, producción de factores angiogénicos e inflamación, así como también la permanencia y viabilidad de las células en las matrices posterior al tiempo de implantación establecido.

2.5.1. Cirugía de los ratones

El día previo a la cirugía, se sembraron 10^6 células sobre matrices IM con una monocapa de silicona de 12 mm de diámetro, incubándose a 37°C durante una hora. Posterior a este período, se añadió medio DMEM suplementado con 10% de FBS inactivado (55°C durante 30 minutos) y antibióticos.

En términos resumidos, cada animal operado fue sometido a anestesia general (inyección intraperitoneal con ketamina 120 mg/kg - xilazina 24 mg/kg) y ubicado sobre una manta calefactora durante el transcurso de la cirugía, que consistió en la extirpación de trozos circulares de 10 mm de diámetro de piel completa en ambos costados del dorso bajo campana de flujo laminar. En las zonas sin piel se implantaron las matrices, en ausencia o en presencia de células, que se fijaron en la zona de la herida mediante el uso de suturas no absorbibles. Cabe destacar que para evitar la

contracción de la herida y posibles problemas en la posterior extirpación del tejido, se utilizó una malla de polipropileno titanizada (TiMESH, GfE Medizintechnik GmbH) entre el lecho de la herida y el andamio implantado. Finalmente los ratones fueron vendados para protegerlos, colocados de a uno por jaula y monitoreados diariamente para evitar una posible infección de la herida.

2.5.2. Sacrificio y extirpación de tejido

Posterior al tiempo de duración del experimento establecido, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia (doble de la dosis normal). Una vez muertos, se les retiró el dorso para fotografiarlo (Sony-DCS T99) mediante una técnica de transiluminación de tejido con luz visible blanca, luego de lo cual, se aisló cada matriz y se dividió en 2 trozos, a utilizar para extracción de proteínas y fijación de tejido. Sin embargo en algunos casos se utilizó la matriz completa para posterior recuperación de las células presentes en ella a modo de evaluar su viabilidad.

2.5.3 Análisis de imágenes y cuantificación de vasos sanguíneos

Para estudiar la revascularización en el animal como respuesta al implante, luego de la extirpación del tejido (Figura 4), se cuantificaron los vasos sanguíneos en las matrices extirpadas según descrito (Egaña y col., 2009). Concisamente, se combinaron las técnicas de transiluminación de tejido con segmentación digital de la red vascular mediante el uso del software VesSeg (*Institute for Signal Processing, University of Lübeck, Alemania*), que permite analizar las imágenes para obtener valores de porcentaje de cobertura de los vasos sanguíneos en un área determinada.

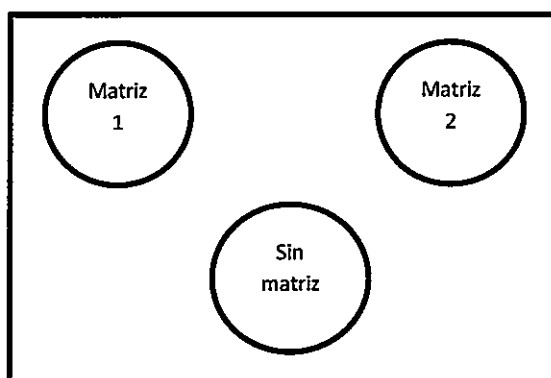


Figura 4. Esquema del dorso del ratón luego de su extirpación. Las zonas de injerto están indicadas, así como la zona utilizada como control interno para la normalización de datos.

Primero se debe seleccionar una zona para analizar (una de las matrices o una zona sin ella, todas del mismo tamaño), la cual sufre una serie de modificaciones: conversión a escala de grises, inversión de colores, aumento de contraste, realce de los vasos sanguíneos y conversión a una imagen en blanco y negro, donde los vasos sanguíneos son blancos. Finalmente se "esqueletonizan" los vasos sanguíneos para disminuir el grosor de todos ellos a una línea delgada, con lo cual se puede cuantificar el área de los píxeles en blanco dentro de la circunferencia seleccionada y obtener así un el porcentaje del largo de los vasos. La expresión 1 define mejor el cálculo descrito.

$$\% \text{ Vasos sanguíneos} = \frac{\text{Área de píxeles}}{\text{Área circunferencia seleccionada}} \times 100\% \quad (1)$$

El análisis recién descrito se aplica tanto para las matrices implantadas como para el tejido propio del ratón, puesto que este último es utilizado para normalizar los datos de cada ratón. La expresión 2 aclara de mejor manera cómo se normalizaron los datos de cada ratón.

$$\text{Índice de vascularización} = \frac{\% \text{ vasos en matriz}}{\% \text{ vasos sin matriz}} \quad (2)$$

2.5.4. Cuantificación de factores angiogénicos

Se realizó extracción de proteínas para la realización de ensayos de Western blot y Proteome Profiler Array, como se detalló con anterioridad, con la excepción que el tejido no fue previamente lavado con PBS sino que tratado directamente con buffer de lisis suplementado con inhibidor de proteasas. En ambos casos, se evaluaron los mismos factores. Para los ensayos de Western blot se utilizaron 40 µg de proteínas por carril (condiciones mostradas en la Tabla 3), mientras que para cada ensayo de Proteome Profiler Array, se utilizaron 200 µg de proteína según las indicaciones del fabricante.

2.5.5. Evaluación de citoquinas inflamatorias en el suero de ratones

En todos los experimentos con WJ-MSC se obtuvo sangre de los ratones, tanto el primer día post-cirugía como el día mismo del sacrificio (5 ó 10 días). En todos los casos, se dejaron reposar los tubos durante una noche a temperatura ambiente, durante la cual se separa el plasma del suero, permitiendo extraer éste último con una jeringa. Luego, se centrifugó el suero extraído a 400 x g (5 minutos, temperatura ambiente) para eliminar restos celulares del plasma, rescatando el sobrenadante para posterior análisis.

El método utilizado para cuantificar citoquinas inflamatorias en el suero de los ratones operados está descrito en el manual del kit utilizado (Cytometric Bead Array –CBA- Mouse Inflammatory Cytokines Kit, BD). El principio de este ensayo es la cuantificación de citoquinas solubles mediante citometría de flujo

El ensayo consiste en la captura de citoquinas solubles (IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, TNF- α y IFN- γ) con micro-perlas ("beads") de fluorescencia conocida, cubiertas con anticuerpos específicos contra las citoquinas. Por otro lado, el kit provee de una solución de detección, que consiste en una mezcla de anticuerpos contra las citoquinas conjugados con ficoeritrina (PE), que permite la obtención de una señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de analitos unidos a cada tipo de microperla. Entonces, al mezclar una muestra de suero con los "beads" y reactivo de detección, se genera un complejo tipo sándwich (perla de captura + citoquina + reactivo de detección), que en conjunto con una curva de calibración, permite cuantificar la concentración de citoquinas presentes en el suero de los ratones mediante citometría de flujo (citómetro FACSCanto II).

2.5.6. Permanencia de las WJ-MSc en la matriz

Para evaluar si las WJ-MSc permanecen en la matriz durante el período de implantación, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-Presenilina-1, que es una proteína transmembrana que se expresa únicamente en células humanas sin reacción cruzada con células murinas.

El día del sacrificio (5 ó 10 días post-cirugía), se recuperaron los trozos de matriz implantados en el dorso de los animales (con WJ-MSc o control), los cuales fueron inmediatamente fijados en PFA 4% durante dos noches a 4°C, luego de lo cual se reemplazó por PBS hasta posterior uso.

El primer paso fue la deshidratación del tejido, para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

- Etanol Merck:PBS (50%:50%) 1 x 10 min
- Etanol Merck:PBS (70%:30%) 1 x 20 min
- Etanol Merck:PBS (90%:10%) 1 x 20 min
- Etanol Merck:PBS (95%:5%) 1 x 20 min
- Etanol Merck (100%) 2 x 20 min + 1 x 30 min

Luego se clarificó el tejido con un sustituto de xilol (Neo Clear, Merck) y se procedió a sumergir en parafina hasta montaje en tacos listos para ser cortado.

- Neo Clear Merck (100%) 3 x 30 min
- Parafina:Neo Clear Merck (50%:50%) 1 x 30 min
- Parafina:Neo Clear Merck (75%:25%) 1 x 30 min
- Parafina (100%) 1 x 30 min + 1 x 60 min + 1 x ON

Se realizaron cortes de 25 μ m de espesor con un micrótopo (Spencer 820) utilizados posteriormente para tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) e inmunohistoquímica.

a) Tinción Hematoxilina & Eosina. Una vez montados los cortes de tejido, fue necesario desparafinar (65°C durante una noche) seguido de una rehidratación seriada:

- Xilol (100%) 3 x 10 min
- Etanol (100%) 2 x 5 min
- EtOH : H₂O_d (95% : 5%) 1 x 5 min
- EtOH : H₂O_d (75% : 25%) 1 x 5 min
- EtOH : H₂O_d (50% : 50%) 1 x 5 min
- H₂O_d (100%) 2 x 5 min

Una vez hidratados los cortes, se añadió Hematoxilina (tinción de núcleo) durante 1 minuto, luego de lo cual se lavó una vez con agua destilada. Luego se procedió a la tinción con Eosina (tinción citoplasmática), retirada inmediatamente con agua destilada. Finalmente se montaron las muestras en medio de montaje acuoso (Aqua-Mount, Lerner Laboratories), dejando secar una noche previo a la toma de imágenes (lupa Leica MZ125).

b) Inmunohistoquímica. Una vez montados los cortes se procedió a desparafinar una noche a 65°C en estufa, seguido por 3 lavados con xilol 100% (1 x 15 min + 2 x 10 min). Posterior a ello fue necesario inactivar la peroxidasa endógena del tejido:

- MetOH (100%) 1 x 5 min
- MetOH : H₂O₂ (100% : 0,3%) 1 x 30 min (temperatura ambiente)
- MetOH/H₂O_d (50% : 50%) 1 x 10 min
- H₂O_d (100%) 2 x 5 min

Para desenmascarar el antígeno se utilizó una solución de "Antigen Unmasking Solution" (Vector Laboratories) (1% v/v en agua destilada) durante 30 minutos a 80°C, seguido de un lavado rápido con agua destilada y un lavado con PBS durante 5 minutos.

La inmunohistoquímica se realizó mediante el uso del kit ABC universal R.T.U Vectastain (Vector Laboratories).

Para bloquear/permeabilizar, se dejó 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda con solución de bloqueo (R.T.U normal horse serum 2.5%, Vector). Posterior a lo cual, se incubó con la solución de anticuerpo primario anti Presinilina-1 (conejo, US Biological M3985-05) (1:100) en solución de bloqueo durante una noche a 4°C en cámara húmeda, seguido por 3 lavados de 30 minutos con PBS. El anticuerpo secundario (R.T.U. Biotinilated Universal Antibody anti-rabbit/mouse, Vector) se incubó durante una noche a 4°C en cámara húmeda, seguido de lavados con PBS (3 x 30 minutos). Posteriormente, se incubó con una solución ABC (*Avidin-Biotinilated-HRP Complex*)(R.T.T. Elite ABC Reagent, Vectastain) y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de 5 lavados de 10 minutos con PBS.

Para revelar, se preparó la solución DAB según las instrucciones del fabricante (ImmPACT™ DAB, Vector Laboratories), dejando reaccionar hasta que apareciera marca (proximadamente entre 30 y 60 segundos) seguido de 3 lavados de 10 minutos con PBS. Finalmente montaron las muestras con un medio de montaje acuoso (Aqua-Mount, Lernet Laboratories). Se dejó secar una noche a temperatura ambiente previo a la toma de imágenes con lupa (Leica MZ125).

2.6. Análisis Estadístico

Todos los ensayos se realizaron con muestras provenientes de al menos 3 donantes diferentes. Los gráficos mostrados y análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5, donde los resultados son mostrados como promedio \pm error estándar. Para estudiar diferencias entre los grupos experimentales, se aplicaron los análisis estadísticos t-Student no paramétrico y Anova de 2 vías para la comparación de 2 y más de 2 grupos, respectivamente. En todos los casos, se consideró $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa.

3. RESULTADOS

El desarrollo de este trabajo comenzó por la caracterización *in vitro* de las WJ-MSC sembradas sobre distintas matrices bioartificiales en comparación con las AD-MSC en términos de asentamiento y viabilidad en condiciones de estrés, posterior a lo cual se enfocó el estudio a la expresión y secreción de factores angiogénicos.

En una segunda etapa se evaluó el potencial promovedor de angiogénesis y regeneración de tejido *in vivo* en un modelo murino en comparación con las AD-MSC, así como la determinación de factores promovedores de angiogénesis expresados por las WJ-MSC en el lecho de la herida y la inflamación sistémica generada en los animales en respuesta al implante. Finalmente se determinó la permanencia de las WJ-MSC en las matrices posterior al período de implantación establecido.

3.1. Caracterización *in vitro* de WJ-MSC cultivadas en matrices bioartificiales

3.1.1. Asentamiento y viabilidad de las WJ-MSC en matrices tridimensionales

Mediante técnicas de tinción celular y microscopía confocal, se evaluó el asentamiento de las WJ-MSC en distintas matrices, usando como control las AD-MSC (Figura 5). Se observó que las WJ-MSC se asentaron en la matriz IM y de colágeno I de manera homogénea, no así en la matriz IIS. Así mismo, las AD-MSC se asentaron de manera homogénea en IM. Es posible visualizar también que el tamaño de las AD-MSC es ligeramente mayor que de las WJ-MSC.

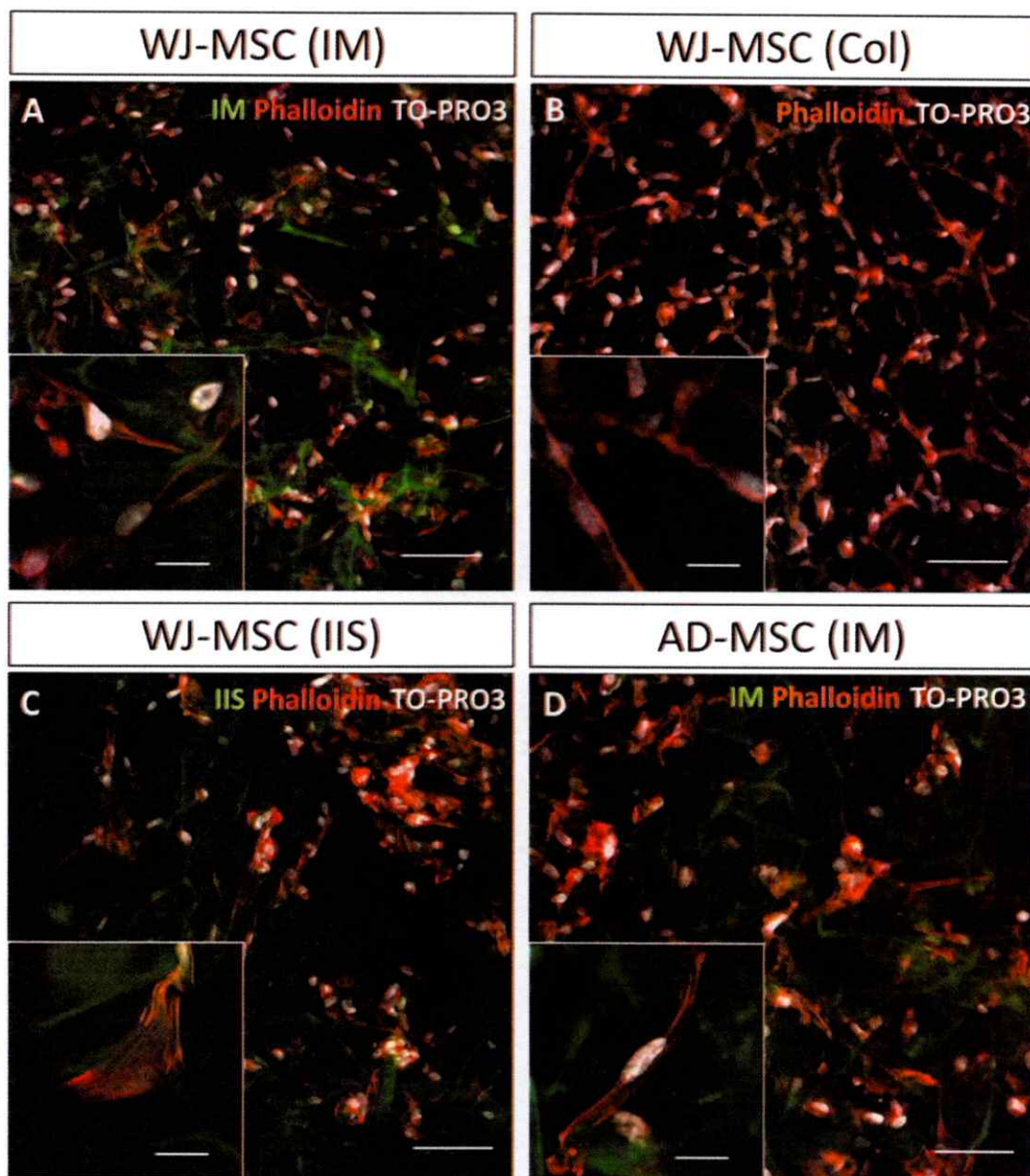


Figura 5. Cultivo de MSC en matrices tridimensionales de distinta naturaleza. Cortes ópticos representativos obtenidos mediante microscopía confocal del asentamiento de las células sembradas en matrices bioartificiales con WJ-MSC sembrado en matrices Integra (A), de colágeno I (B), Inegrated Implant System (C) y AD-MSC sembrado en Integra (D). Barra de tamaño: 100 µm; inset: 20 µm.

Posteriormente, estudiamos si la actividad metabólica de las WJ-MSc sembradas en matrices tridimensionales era conservada durante largos períodos de privación de suero, similar a las condiciones en que se encontraría la matriz bioactivada *in vivo*, carente de medio de cultivo y factores de crecimiento exógenos, dependiendo únicamente de una señalización autocrina y paracrina apropiada.

Se estimó que la actividad metabólica de la condición inicial (12 horas) *versus* la condición final (10 días) sólo disminuyó ~32% cuando fueron incubadas en IM en comparación con ~76% cuando fueron sembradas en colágeno I y ~93% en IIS (Figura 6A). Si bien no se puede discriminar que en matrices IM, las WJ-MSc han presentado menor muerte, mayor proliferación o bien que todas las células de manera individual hayan reducido en menor medida su actividad metabólica, los resultados obtenidos sugieren que de manera global, las WJ-MSc sembradas en la IM tienen una mayor viabilidad durante 10 días sometidas a situaciones de estrés en comparación con otros tipos de matrices bioartificales

Como la viabilidad fue mayor en IM, a continuación se compararon las WJ-MSc con las AD-MSc sembradas en esta matriz, mostrando un decrecimiento significativo después de 24 horas de privación de suero, alcanzando valores de ~97% de disminución en su actividad metabólica luego de 10 días (Figura 6B). Este resultado sugiere que probablemente las AD-MSc no podrían resistir a las condiciones de estrés *in vivo* como lo harían las WJ-MSc.

Cabe destacar a su vez que la presencia de las WJ-MSc en las matrices de colágeno tipo I promueve una disminución de su tamaño, probablemente por acción de proteasas expresadas por las mismas células. Sin embargo este efecto no se observa

para el uso de matrices IM ni IIS (Figura 6C). Este motivo podría estar involucrado en la reducción observada para la actividad metabólica de las WJ-MSC sembradas en matrices de colágeno tipo I, posiblemente porque existe una mayor confluencia celular o bien las células presentan menor superficie de adhesión y por consiguiente, el número celular total en la matriz disminuye.

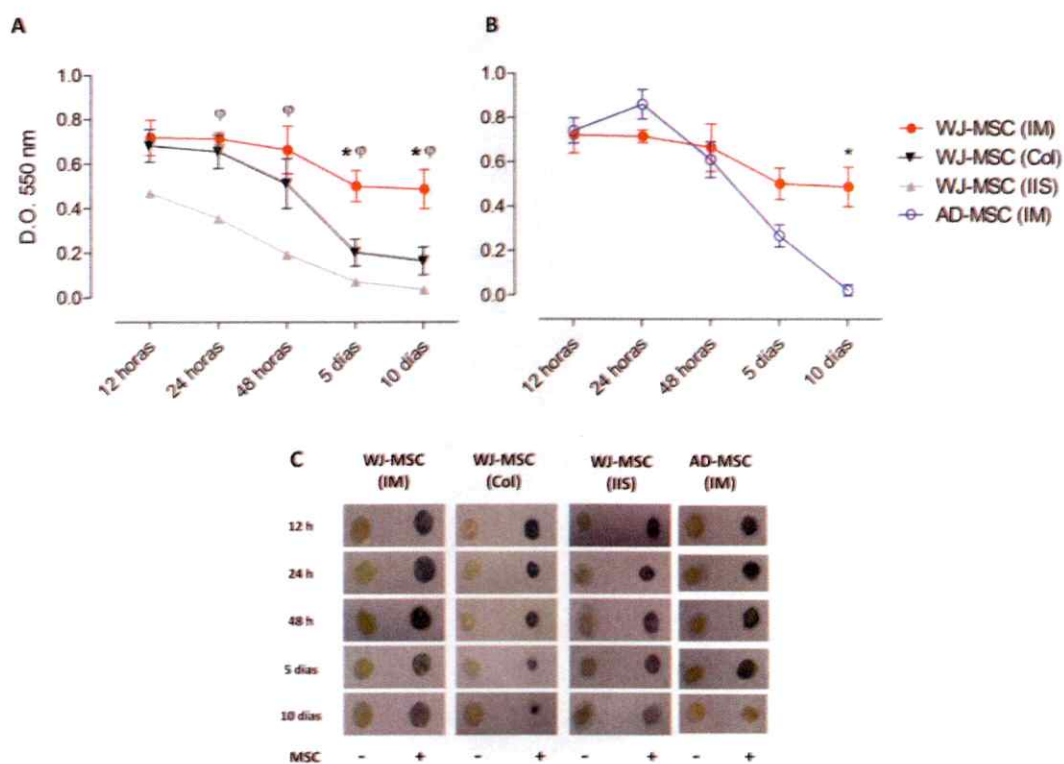


Figura 6. En matrices IM, las WJ-MSC mantienen mayor actividad metabólica que las AD-MSC luego de largos períodos de privación de suero. A) Actividad metabólica de WJ-MSC en matriz Integra (IM), colágeno I (Col) e Integrated Implant System (IIS) (* $p < 0,05$ IM vs. Col; ϕ $p < 0,05$ IM vs. IIS). B) Actividad metabólica de WJ-MSC y AD-MSC sembradas en IM (* $p < 0,05$). C) Imágenes representativas de las matrices luego del ensayo MTT. Los valores corresponden al promedio \pm E.S. ($n = 6$).

3.1.2. Expresión de factores tróficos de las WJ-MSC en matrices tridimensionales

Puesto que el interés es generar una matriz bioactivada con células mesenquimáticas, se evaluó la expresión de los factores angiogénicos a nivel del mRNA, así como de la abundancia de las proteínas expresada por WJ-MSC sembradas en matrices tridimensionales. Para ello, se sembraron las WJ-MSC resuspendidas en medio de cultivo completo e incubaron las matrices durante una hora para permitir su asentamiento, luego de lo cual se privaron de suero durante 24 horas, conservando tanto las matrices como el medio condicionado.

Los resultados indican que a nivel de mRNA, las WJ-MSC expresaron *Netrina-1* (*NTN1*), *Netrina-4* (*NTN4*) y *VEGF-A* cuando son sembradas tanto en IM como en colágeno I (Figura 7). Además, se demostró que a nivel de la proteína, expresaron *Netrina-4* y *VEGF-A* cuando son sembradas en matrices IM, colágeno tipo I e IIS (Figura 8A).

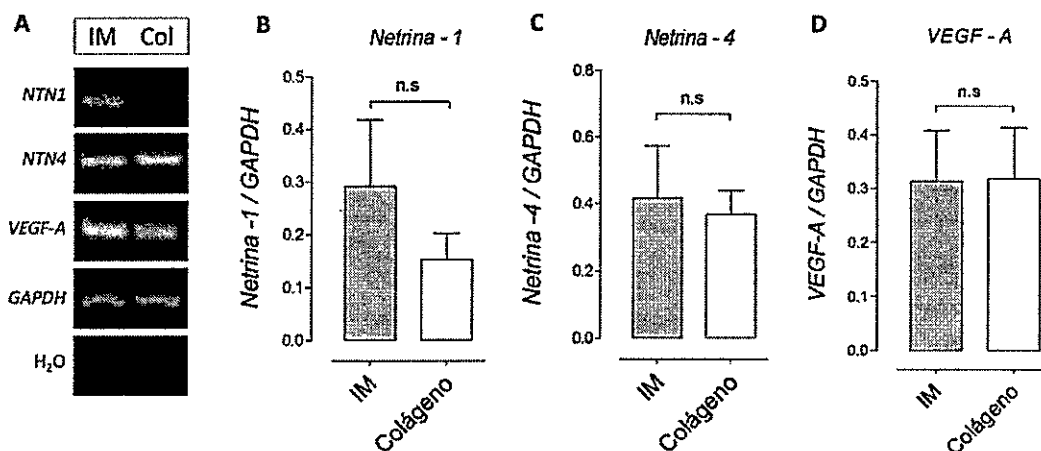


Figura 7. WJ-MSC sembradas en matrices de colágeno expresan *Netrina-1*, *Netrina-4* y *VEGF-A* a nivel de mRNA. Imágenes representativas de las bandas amplificadas (A) así como la cuantificación relativa de *Netrina-1* (B), *Netrina-4* (C) y *VEGF-A* (D) respecto del GAPDH. Los valores corresponden al promedio \pm E.S. (n = 6).

El medio condicionado almacenado se concentró para evaluar la secreción y difusión de factores angiogénicos mediante Western blot, resultando en una mayor difusión, tanto de Netrina-4 como de VEGF-A en los experimentos realizados con WJ-MSC sembradas en matrices IM respecto de colágeno I, sin observar cambios significativos respecto a IIS debido al número reducido de experimentos realizados con dicha matriz (Figura 8B).

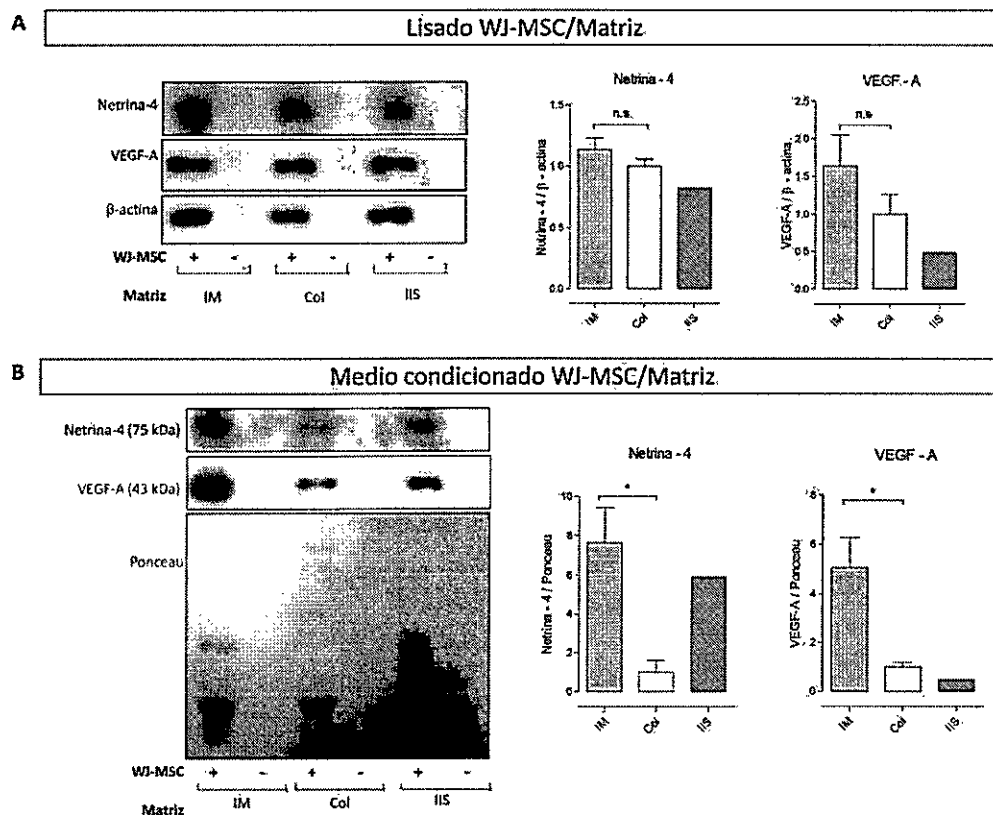


Figura 8. WJ-MSC sembradas en matrices 3D expresan Netrina-4 y VEGF-A a nivel de proteína y presentan mayores niveles de secreción cuando son sembradas en IM. Luego de 24 horas de privación de suero, A) las WJ-MSC expresan las proteínas Netrina-4 y VEGF-A determinado mediante Western blot de partir de lisado celular de las WJ-MSC contenida en matrices Integra (IM), colágeno tipo I (Col) e Integrated Implant System (IIS). Se muestran imágenes representativas de las bandas y cuantificación relativa respecto de β -actina. B) las WJ-MSC secretan Netrina-4 y VEGF-A, presentando mayores niveles cuando fueron sembradas en IM. Se muestran imágenes representativas de las bandas y cuantificación relativa respecto de tinción Ponceau. Los valores corresponden al promedio \pm E.S (IM, Col, n = 6; IIS, n=2). * $p < 0.05$, IM vs. Col.

Se utilizó el medio condicionado recolectado luego de 24 horas de privación de suero para evaluar los factores angiogénicos secretados por las WJ-MSC sembradas en tanto IM como en colágeno I y posteriormente difundidos desde las matrices hacia el medio de cultivo. Encontramos que en ambos tipos de matrices, las células secretaron una extensa gama de factores involucrados en procesos de angiogénesis, regeneración de tejidos, inflamación y cicatrización, los cuales difundieron mejor al medio de cultivo cuando las células fueron sembradas en IM en comparación con su cultivo en matrices de colágeno tipo I.

El hecho de que las WJ-MSC presentaron mayores niveles de secreción de factores o difusión a través de la matriz o bien que los factores secretados por ellas son más estables cuando éstas son sembradas sobre matrices IM, fue evidente dado por la mayor cantidad de factores observados en el proteoma, así como también un aumento en las concentraciones de la mayoría de dichos factores (Figura 9).

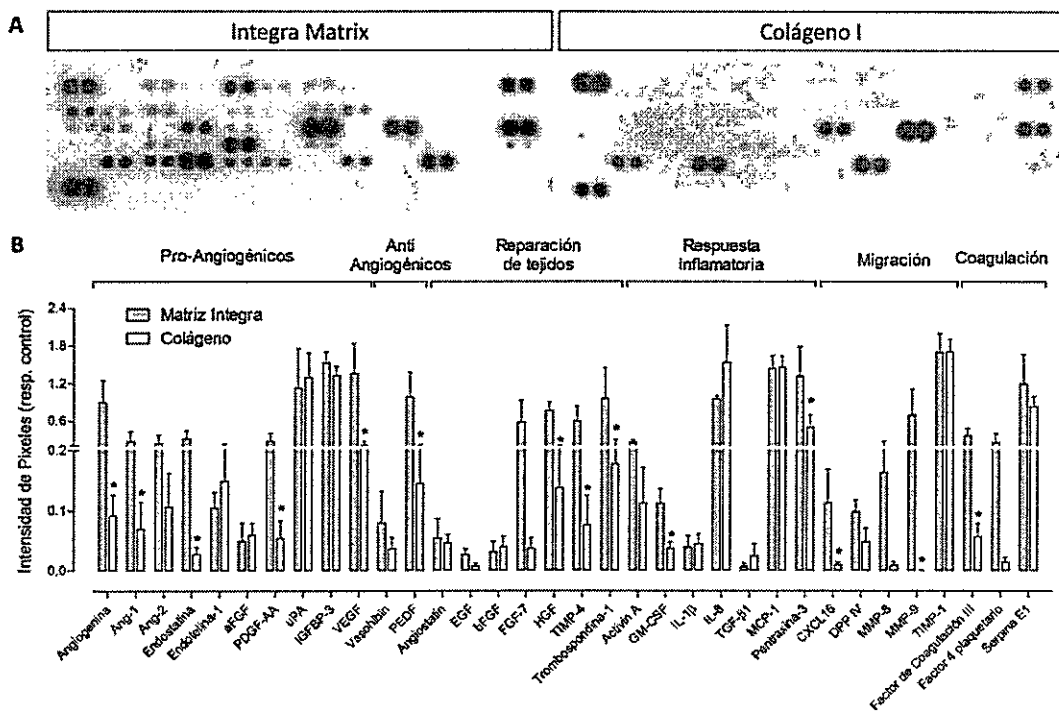


Figura 9. WJ-MSC secretan mayor cantidad de factores tróficos cuando son cultivadas en matrices Integra que en colágeno tipo I. A) Imagen representativa de ensayos de proteoma con el medio condicionado de WJ-MSC sembrado en matrices de Integra (izquierda) y colágeno I (derecha). **B)** Cuantificación relativa de todas las moléculas expresadas respecto del control positivo graficadas de acuerdo a su función. Los valores corresponden al promedio \pm E.S. ($n = 3$) (* $p < 0,05$).

Considerando que el potencial trófico promovedor de la angiogénesis se conserva de manera importante en IM, los estudios que se detallan a continuación se centraron en la evaluación de dicha matriz mediante ensayos realizados *in vivo*.

3.2. Evaluación *in vivo* del uso de matrices bioactivadas con WJ-MSC

3.2.1. Angiogénesis e inflamación promovida por WJ-MSC implantadas en un modelo murino de regeneración dermal

Para evaluar el efecto que produce el secretoma de las WJ-MSC, se escogió un modelo murino de regeneración dermal que permitió no solo evaluar los procesos de angiogénesis, sino que una dinámica de sanación integral de tejidos *in vivo*. Para esto, se operaron 34 ratones Balb/c macho de 2-4 meses de edad, de los cuales, a 12 de los cuales se les implantaron matrices sin células (control vehículo), 13 con matrices conteniendo WJ-MSC y 9 con AD-MSC de al menos 3 donantes distintos. Dichos ratones fueron seleccionados para implantación durante períodos de 5 ó 10 días, posterior a lo cual fueron sacrificados y analizados. Para esto, el dorso de los animales fue retirado y fotografiado para el procesamiento de las imágenes con el programa VesSeg (Figura 10A), que permite cuantificar los vasos sanguíneos contenidos dentro de las matrices, y normalizar respecto de los vasos contenidos en un área de igual tamaño de piel normal (Figura 10B).

Luego de 5 días de implantación, los ratones operados con WJ-MSC, mostraron una vascularización significativamente mayor (0,93) que en los ratones operados con AD-MSC (0,67) y respecto del control (0,35). Luego de 10 días, se mantiene la significancia observada a los 5 días, entre las WJ-MSC (1,22) y AD-MSC (0,96), así como entre las WJ-MSC y control (0,89). Cabe destacar que el uso de AD-MSC no presenta diferencias significativas en los niveles de vascularización luego de 10 días de implantación respecto de las matrices por sí solas.

Estos resultados sugieren que la presencia de WJ-MSC en las matrices promueve el establecimiento de una red vascular bien definida dentro de ellas, en comparación con las matrices vacías o con AD-MSC. Más aún, la cuantificación del área vascularizada a distintos tiempos sugiere que las matrices bioartificiales enriquecidas con WJ-MSC aceleran el proceso de vascularización en comparación con matrices solas o enriquecidas con AD-MSC.

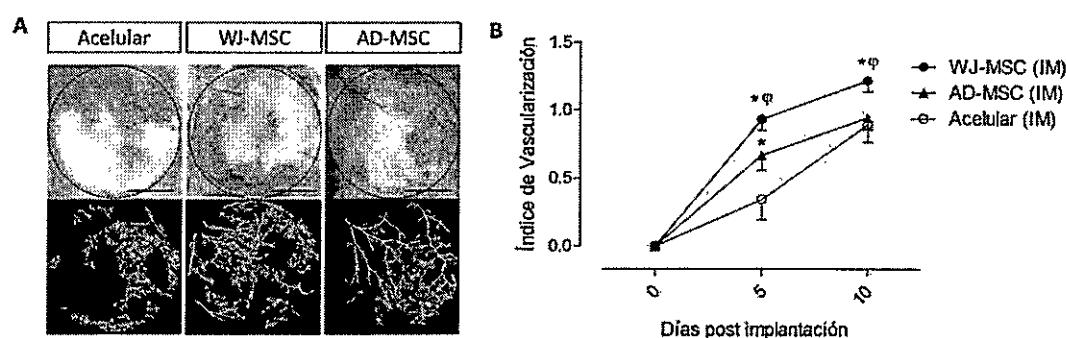


Figura 10. Matrices IM enriquecidas con WJ-MSC aceleran la angiogénesis en comparación con AD-MSC. A) Foto representativa de la transiluminación de tejido y la correspondiente segmentación digital para cada grupo experimental: matrices vacías (n=12) con WJ-MSC (n=13) o AD-MSC (n=9). Barra de tamaño: 5 mm. B) Cuantificación de la segmentación digital mostrada. Los valores corresponden al promedio \pm E.S (* $p < 0,05$ WJ-MSC o AD-MSC vs. Control; [§] $p < 0,05$ WJ-MSC vs. AD-MSC)

Cabe destacar que el modelo utilizado en esta tesis no corresponde a un animal inmunodeprimido, por lo que evaluar el efecto sistémico de la inflamación en éste resulta interesante al corresponder a un trasplante de tipo xenogénico. Por esta razón, se evaluó la concentración de citoquinas presentes en el plasma de los ratones operados con matrices vacías o sembradas con WJ-MSC a modo de cuantificar la inflamación sistémica generada en los animales producto de la implantación de las mismas. Los resultados mostrados en la Figura 11 indican que no existen diferencias significativas en los niveles de las citoquinas inflamatorias evaluadas presentes en el suero de los animales operados con matrices carentes de células o de las que

contenían WJ-MSC humanas. Esto sugiere que la presencia de las células humanas no genera una inflamación sistémica mayor en el animal, que podría tener como consecuencia un rechazo inmunológico.

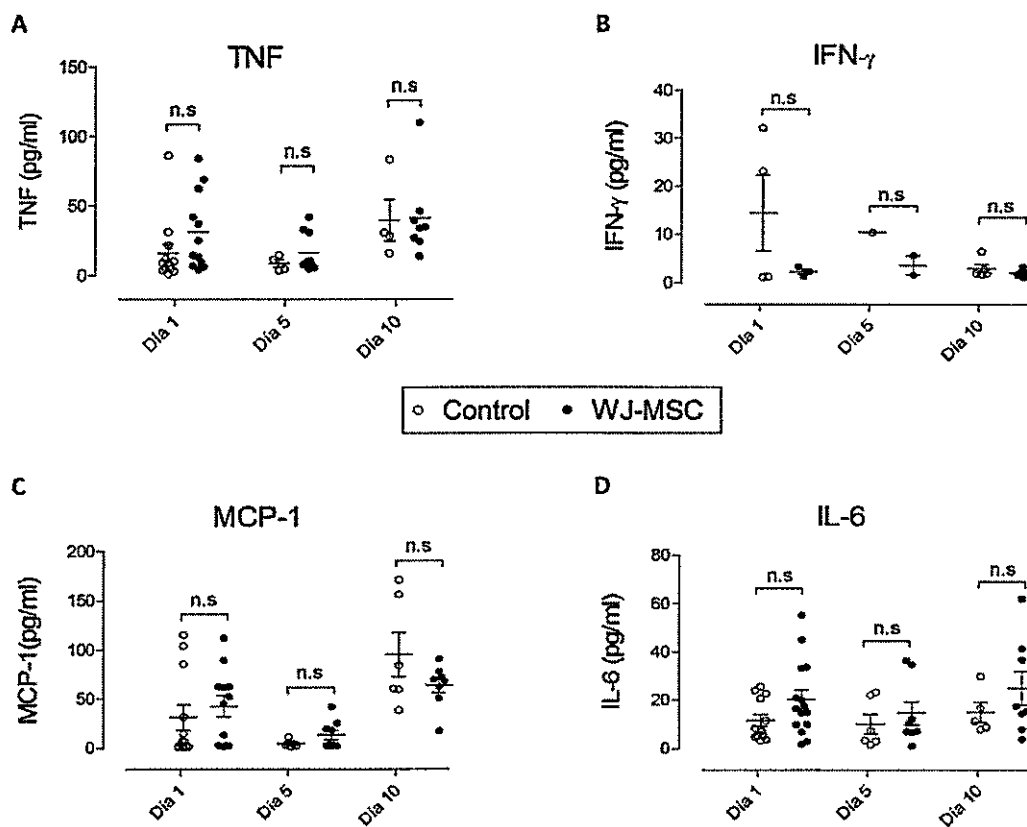


Figura 11. Inflamación sistémica de ratones implantados con IM enriquecido con WJ-MSC no aumenta respecto de IM control. Cuantificación de las citoquinas inflamatorias TNF (A), IFN- γ (B), MCP-1 (C) e IL-6 (D), presentes en el suero de los animales operados luego de 1, 5 y 10 días posterior a la cirugía con matrices control (n = 12) o conteniendo WJ-MSC (n = 13). Los valores corresponden al promedio \pm E.S.

3.2.2. Expresión de factores tróficos en el lecho de la herida de los ratones tratados

Para explicar las diferencias en los procesos de vascularización al utilizar las WJ-MSC, se evaluó la expresión de los factores angiogénicos clásicos y no clásicos distintivos, como son VEGF-A y Netrina-4 en el lecho de la herida. Para esto, el homogenizado de las matrices obtenido 5 ó 10 días después de la implantación, fue analizado mediante Western blot (Figura 12). Encontramos que para 5 y 10 días post-implantación no existen diferencias de expresión de Netrina-4 entre las matrices control y las sembradas con WJ-MSC. Sin embargo, la expresión de VEGF-A fue significativamente mayor en las matrices conteniendo WJ-MSC respecto de las carentes de ellas luego de 5 días de implantación, efecto no observado a los 10 días de implantación.

Esto sugiere que a tiempos más cortos de implantación, las WJ-MSC expresan ya sea altos niveles de VEGF-A, o bien, que su presencia en las matrices induce una mayor expresión de esta proteína en el animal. No obstante, tampoco podemos descartar una combinación de ambos mecanismos. Lo anterior indica que el efecto de las WJ-MSC posiblemente es importante en etapas iniciales de los procesos de regeneración y consecuentemente con las mayores diferencias obtenidas para la vascularización a períodos cortos (5 días) así como el aumento en la tasa de formación de redes vasculares dentro de la matriz promovida por la presencia de WJ-MSC.

Como las mayores diferencias experimentales se obtuvieron luego de 5 días post-cirugía, se profundizó en el estudio de expresión luego de 5 días de implantación.

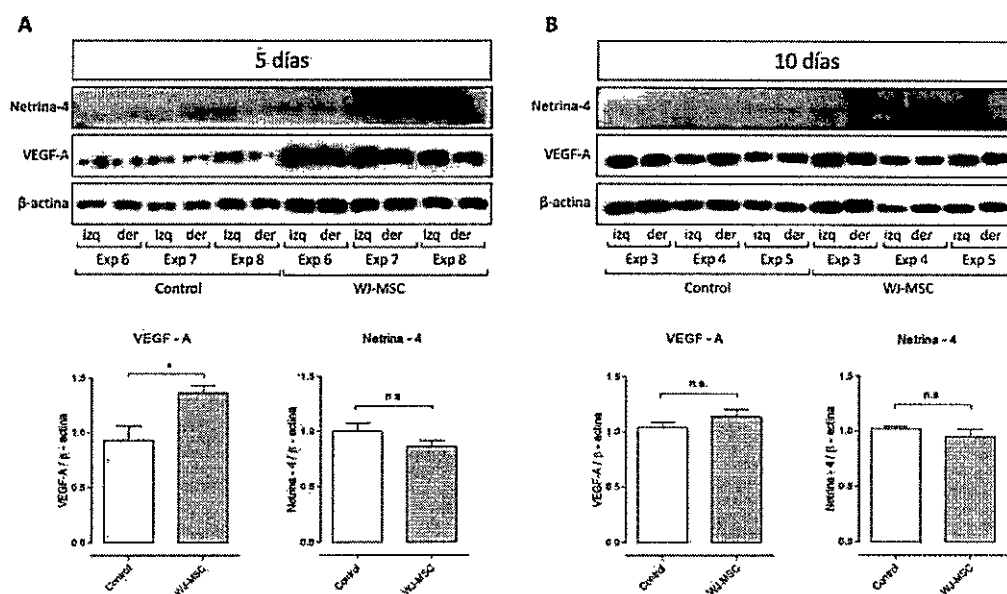


Figura 12. WJ-MSC incrementa la abundancia de VEGF-A en el lecho de la herida luego de una estadía de 5 días en los animales. Expresión de Netrina-4 y VEGF mediante Western blot de lisado de matrices, representativo de matriz izquierda y derecha de cada animal (3 experimentos distintos) de 5 (A) y 10 días (B) de implantación. Se muestran imágenes representativas de las proteínas (panel superior), así como la cuantificación relativa de las densitometrías normalizadas respecto de β-actina para ambos factores (panel inferior). Los valores corresponden al promedio ± E.S. (* $p < 0,05$).

Posteriormente, se evaluó la expresión *in vivo* de una extensa gama de factores tróficos producidos exclusivamente por las WJ-MSC en el lecho de la herida mediante ensayos de proteoma humano (Figura 13). El kit utilizado provee de anticuerpos altamente específicos contra antígenos humanos, por lo que los lisados de matrices carentes de WJ-MSC implantadas en ratones durante 5 días no presentaron marca incluso luego de una sobreexposición prolongada, exceptuando en el caso del factor endotelina-1 (Figura 13A).

Los resultados indican que luego de 5 días de implantación con WJ-MSC, éstas expresaron una vasta gama de factores tróficos relacionados con distintos mecanismos

involucrados en la sanación de heridas, tales como los procesos angiogénicos (Angiogenina, Angiopoyetina-1 y -2, Endostatina, Endotelina-1, aFGF, uPA, VEGF-A e IGFBP-2), antiangiogénicos (PEDF e IGFBP-3), inflamatorios (Angiostatina, HB-EGF, HGF, TIMP-4 y Trombospondina-1), reparación de tejidos (Activina-A, Endoglina, IL-8 y Pentraxina-3), migración celular (CXCL16, DPPIV, MMP-8 y TIMP-1) y coagulación (Factor de coagulación III, Factor 4 plaquetario y Serpina E1). Lo anterior, da cuenta de que el tipo celular en estudio participa activamente en el proceso global de regeneración de las heridas inducidas experimentalmente en los animales operados.

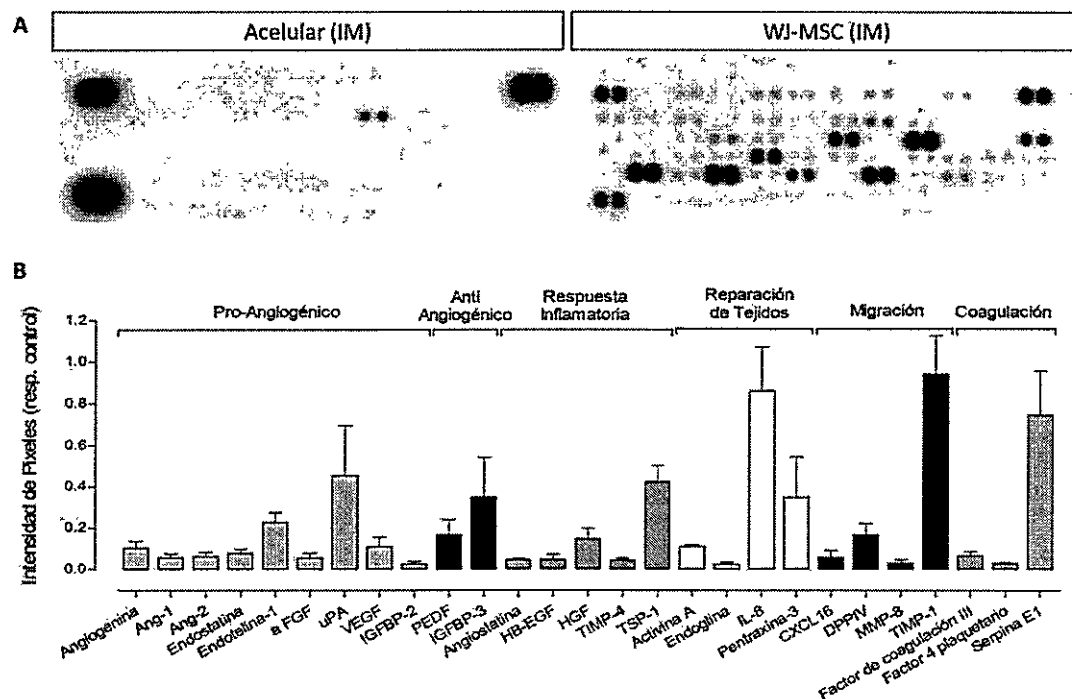


Figura 13. Las WJ-MSC expresan una extensa gama de factores relacionados con procesos de sanación de tejidos luego de estar implantadas durante 5 días en el dorso de ratones adultos. *A*) Imagen representativa de ensayos de proteoma de matrices control (izquierda) y conteniendo WJ-MSC (derecha). *B*) Cuantificación relativa respecto del control positivo de todas las moléculas expresadas por las WJ-MSC graficadas de acuerdo a su función. Los valores corresponden al promedio \pm E.S (n=3).

3.3. Permanencia de las WJ-MSK en las matrices posterior al período de implantación

Para evaluar la permanencia de las WJ-MSK en las matrices posterior al período de implantación de 5 ó 10 días, se evaluó el contenido celular total mediante la tinción con Hematoxilina y Eosina (Figura 14), que indicó la presencia de células tanto en las matrices control como en las sembradas con WJ-MSK. Encontramos que el número celular fue mayor en presencia de las WJ-MSK para ambos tiempos de implantación. Esto podría deberse al hecho de que las WJ-MSK podrían aportar con mayor densidad poblacional (e inclusive proliferar en el parche), así como con una mayor migración de las células murinas en respuesta al secretoma de éstas.

A su vez, resulta evidente que posterior a los 10 días de implantación, existe un mayor número celular que luego de 5 días, dado por un mayor tiempo para los procesos de duplicación y migración celular hacia el sitio de la herida.

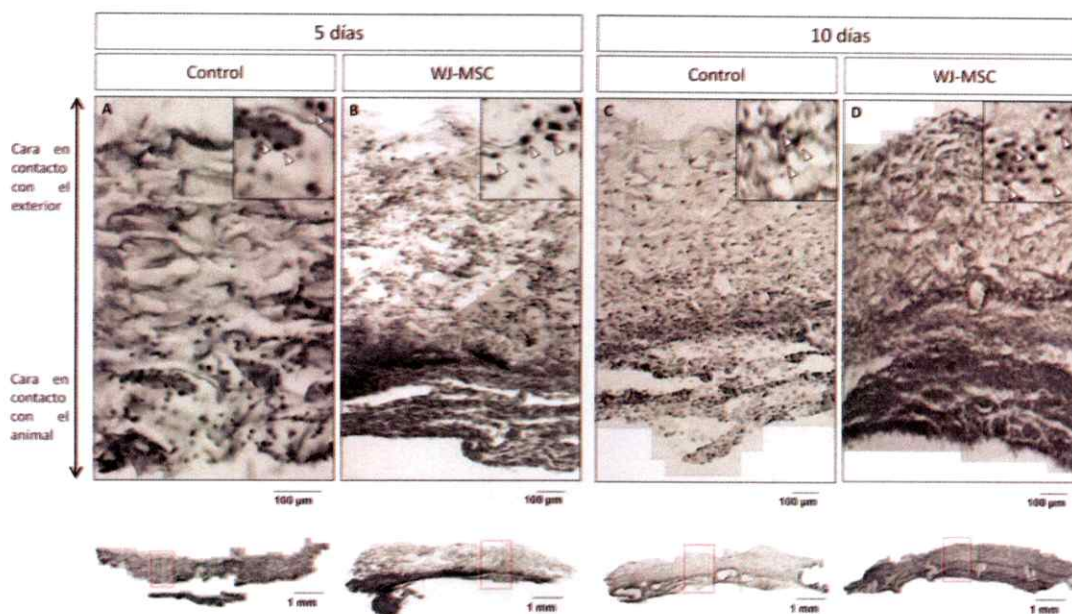


Figura 14. Las WJ-MSC incrementan la densidad poblacional dentro de las matrices Integra. Tinción con Hematoxilina y Eosina de las matrices posterior a 5 (A-B) y 10 (C-D) días de implantación en ausencia y presencia de WJ-MSC. Un acercamiento a las matrices (panel superior) revela que el contenido celular en el control es menor que en presencia de WJ-MSC a los 5 y 10 días de implantación, no siendo posible sin embargo precisar si se trata de células murinas o humanas. Las puntas de flecha en el acercamiento óptico indican la posición de núcleos de células dentro de las matrices teñidas.

Luego de verificar la presencia de las células contenidas en las matrices posterior al período de implantación, se evaluó si efectivamente dentro de dicha población celular, las WJ-MSC implantadas aún permanecían presentes. Para lo cual, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica contra el péptido Presinilina-1, que sólo está expresado en las células provenientes de origen humano sin presentar reacción cruzada con las células de origen murino (Figura 15). Los resultados demostraron que luego de períodos de 5 y 10 días, las células permanecen dentro de la matriz en que fueron sembradas. Sin embargo, no es posible identificar la relación entre el número de células humanas dentro de la matriz luego de 5 o de 10 días, por lo que no se puede inferir si dichas células están muriendo, proliferando o migrando, o bien, que hayan

ocurrido todos los procesos mencionados en distintas subpoblaciones de células dentro de la misma matriz.

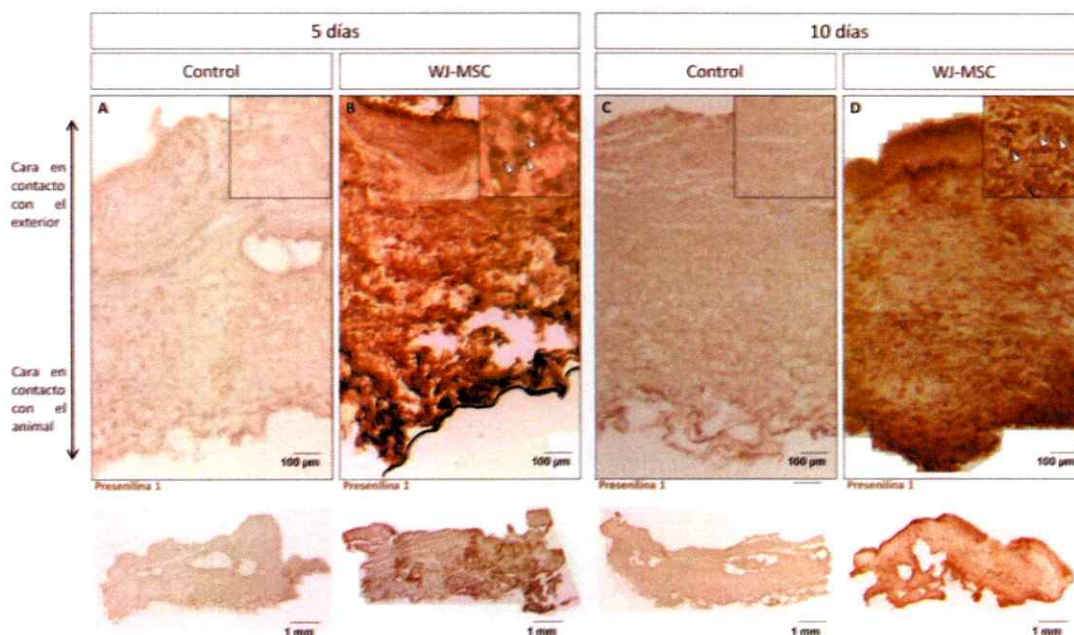


Figura 15. Las WJ-MSC permanecen dentro de las matrices implantadas en los animales luego del período de implantación. Inmunohistoquímica anti-presenilina-1 para las matrices posterior a 5 (A-B) y 10 (C-D) días de implantación. Se indican las matrices control y con WJ-MSC. Se observa que tanto para 5 (B) como 10 (D) días, las WJ-MSC permanecen dentro de las matrices. Las puntas de flecha en el acercamiento óptico indican la posición de células humanas dentro de las matrices ensayadas.

Este resultado se vuelve relevante puesto que, pese a que no se puede descartar que las WJ-MSC no migren hacia sitios aledaños de la herida, la permanencia de estas células dentro de las matrices sugiere que éstas son, efectivamente, las responsables de la vascularización observada en el animal gracias a la secreción local de factores tróficos dentro de las matrices.

4. DISCUSIÓN

Desde hace mucho tiempo, la piel ha sido considerada como un órgano de protección total, que les servía a los seres vivos para protegerles y aislarles del entorno. Aunque su función principal sigue siendo la de protección contra los factores nocivos del medio exterior, también constituye un complejo metabólico, inmunológico y sensorial (Supp & Boyce, 2005). El concepto de la piel como barrera infranqueable, ha ido evolucionando a medida que se ha ido conociendo la estructura y las funciones de la piel, llegándose a la situación actual en la que se considera a este órgano como un sistema de relación con el exterior (Supp & Boyce, 2005). Si existen heridas, la piel estará destruida en mayor o menor medida, y no realizará su función de barrera protectora y metabólica (Guo & Dipietro, 2010).

Con esto en consideración es que la reparación de tejidos en el campo de medicina regenerativa ha surgido para mejorar la calidad de vida de cientos de personas afectadas. En este contexto, se han abordado múltiples estrategias que permitan acelerar el proceso de sanación dérmica, dentro de las cuales se encuentra el uso de matrices bioartificiales, particularmente relevante durante los últimos años (Jones y col., 2002; Gurtner y col., 2008; Macneil 2008; Shi y col., 2011; Formigli y col., 2012). Sin embargo, el uso de dichas matrices es aún limitado debido a las altas tasas de infección y baja capacidad regenerativa observada en los pacientes (Heimbach y col., 1988; Machens y col., 2000; Pham y col., 2007), principalmente por la falta de oxígeno y nutrientes, ya que una de las restricciones principales en la reparación de heridas crónicas se debe a procesos limitados de angiogénesis.

En este sentido, existe un vasto número de estudios que han demostrado que las células troncales mesenquimáticas tienen propiedades pro-angiogénicas y promotoras de sanación de tejidos (Gnecchi y col., 2008; Salem & Thiernemann, 2010; Shetty y col., 2011; Jackson y col., 2012; Burlacu y col., 2013). Por lo tanto, el interés de este trabajo fue la generación de una matriz bioactivada mediante la combinación de dos importantes herramientas en ingeniería de tejidos: una matriz bioartificial basada en colágeno que, enriquecida con células mesenquimáticas troncales, promueva procesos de angiogénesis, permitiendo la sanación de determinados tejidos, en este caso, la piel.

En el desarrollo de este estudio, lo primero que se hizo fue caracterizar dos tipos de poblaciones de MSC para poder optimizar la fuente celular, para lo que se buscó determinar la relación existente entre las WJ-MSC y AD-MSC, sembradas en 3 distintas matrices, en cuanto a una serie de parámetros celulares con énfasis en la difusión del principio activo (en este caso factores pro-angiogénicos y anti-inflamatorios). Una vez tipificadas las distintas clases de matrices a utilizar, se ensayaron, empleando diferentes condiciones experimentales *in vitro*, para ver si éstas influyen en los procesos de liberación de factores paracrinós. Por último, se seleccionaron las membranas IM, con y sin WJ-MSC, para ser ensayadas simulando una "situación real", es decir, colocándolas en heridas en contacto con muestras de piel murina en un modelo de reparación demal. La piel más parecida a la humana es la de monos y cerdos, pero la piel que más se usa en los laboratorios es la de los roedores que presenta la característica de ser más permeable en comparación con la piel humana (Idson, 1975).

4.1. Caracterización *in vitro* de las WJ-MSC en matrices bioartificiales

En este trabajo se demostró que las WJ-MSC se asientan homogéneamente tanto en IM como en matrices de colágeno I (Figura 5A, B), por lo que podemos inferir que las células se adecúan a la situación de cultivo tridimensional en dichas matrices. Otros autores han demostrado que las WJ-MSC se asientan en determinados tipos de matrices bioartificiales (Kenar y col., 2010), sin embargo, sin propósitos de reparación dermal. Cabe destacar a su vez, que el cultivo de WJ-MSC en matrices Integra, de colágeno tipo I, o en otro tipo de matrices, no ha sido reportado con anterioridad en el contexto de regeneración tisular.

A su vez se vio que luego de 24 horas de privación de suero, no hay diferencias significativas en la actividad metabólica de las WJ-MSC sembradas sobre IM o colágeno I (Figura 6A), por lo que probablemente ni el asentamiento celular ni la viabilidad sean responsables de la habilidad diferencial de secreción observada para las WJ-MSC sembradas en ambos tipos de matriz basadas en colágeno (Figuras 8-9). Una posible explicación de esto es que los factores secretados por las células están siendo retenidos en las matrices de colágeno I, ya que ha sido reportado que éste concentra los factores secretados por distintos tipos celulares, con el fin de emular su nicho natural (Martínez y col., 2013).

Se ha demostrado que uno de los factores críticos para una difusión apropiada de nutrientes, materiales de desecho y factores solubles depende estrictamente del tamaño del poro, su geometría y distribución (Lee y col., 2008). Es más, se ha confirmado que los haces de colágeno tipo I tienden a tener un entramado más grueso que aquél presente naturalmente en la matriz extracelular (Elsdale & Bard, 1972). Mientras que las matrices Integra por su parte, tienen un tamaño de poro y

composición diseñados para tener una estructura más porosa que el colágeno por sí solo (Murphy & O'Brien, 2010; Yao y col., 2013). Estas propiedades podrían permitir una mejor y más eficiente difusión de los factores solubles cuando las células están sembradas en IM en comparación con las matrices de colágeno tipo I.

Se demostró también que las WJ-MSC mantienen mayores niveles de actividad metabólica durante largos períodos de privación de suero cuando están sembradas en IM en comparación con matrices de colágeno tipo I e IIS (Figura 6A). El caso del colágeno se debe probablemente a la permeabilidad reducida de nutrientes como se mencionó con anterioridad, así como también al hecho de que esta matriz se degrada con el tiempo posiblemente por la propia acción proteolítica de las células (Figura 6C), dejando menor cabida para el asentamiento y proliferación celular. Por otro lado, la menor actividad metabólica de las mismas células en matrices IIS se puede deber a que su distribución no fue homogénea dentro de la matriz (Figura 5C), pese a que su sembrado se realizó en las mismas condiciones que en matrices IM o colágeno I. También son relevantes las propiedades físicas de las matrices IIS, puesto que están constituidas de fibras de quitosano entrecruzadas, gelatina, ácido hialurónico y geles de fibrina, cuya biocompatibilidad ha sido demostrada (Weinstein-Oppenheimer y col., 2010), sin embargo, la fibrina no forma naturalmente parte de la matriz extracelular, sino que solo está presente temporalmente durante la sanación de tejidos (Mano y col., 2007), lo que podría dar cuenta del mal asentamiento y baja viabilidad de las células sembradas en IIS incluso durante períodos breves carentes de suero.

Cabe destacar que la matriz Integra está compuesta por elementos biocompatibles que emulan la matriz extracelular y tienen una porosidad tal que permite la infiltración celular y permeabilidad de nutrientes (Yao y col., 2013). Además está aprobada por la

FDA y ha sido utilizada en varios ensayos clínicos con resultados prometedores (Moiemen y col., 2006; Cuadra y col., 2012; Yao y col., 2013). Por lo anterior, sumado al hecho que en esta tesis demostramos que las WJ-MSc se asientan homogéneamente en dicha matriz y mantienen su actividad metabólica en situaciones de estrés, se determinó la utilización de la matriz IM para llevar a cabo tanto los ensayos *in vitro* comparando con AD-MSc, así como los ensayos *in vivo* en un modelo murino de reparación dermal.

Las matrices IM, sembradas con WJ-MSc o AD-MSc, no presentaron mayores diferencias en cuanto al asentamiento celular (Figura 5A, D), sin embargo, las WJ-MSc mantienen niveles mayores de actividad metabólica en condiciones de privación de suero (Figura 6B). Este resultado podría explicarse de acuerdo al tejido de donde son aisladas dichas células, si se toma en cuenta el hecho de que las matrices proveen un ambiente de hipoxia para ellas (Landman & Cai, 2007). Considerando lo anterior, es sabido que las WJ-MSc se encuentran naturalmente en el cordón umbilical, cuyos niveles normales de oxígeno oscilan entre 1,5 y 8% (Ma y col., 2010), mientras que los del tejido adiposo fluctúan entre 10 y 15% (Bizzarri y col., 2006). Esto pudiese estar dando cuenta del por qué las WJ-MSc pueden adaptarse mejor a mayores niveles de hipoxia a diferencia de lo que ocurre con las AD-MSc (Lavrentieva y col., 2010). Más aún, se observó una mayor actividad metabólica así como su mantención para las WJ-MSc en comparación con las AD-MSc, lo cual puede deberse al hecho que la primeras poseen una mayor vitalidad y mayor tasa de duplicación que las células aisladas desde tejido adulto (Hass y col., 2011).

Cabe destacar que estudios de secretoma con WJ-MSc son aún escasos (Carvalho y col., 2011; Choi y col., 2013), sin embargo, se ha demostrado que las WJ-MSc

secretan una amplia gama de citoquinas y factores tróficos (Yoo et al. 2009), además se han reportado propiedades angiogénicas de las WJ-MSC tanto *in vitro* (Choi y col., 2013; Hsieh y col., 2013) como *in vivo* (Choi y col., 2013; Azari y col., 2011). Sin embargo, no existen reportes en la literatura indicando que las WJ-MSC sembradas en matrices tridimensionales conserven dichas propiedades *in vitro* o *in vivo*, ni tampoco se han realizado estudios proteómicos en condiciones libres de suero.

Considerando la posible aplicación en medicina regenerativa, se realizaron ensayos en ausencia de suero, dependiendo exclusivamente de una apropiada señalización autocrina y paracrina. Aún más, las WJ-MSC estarían expuestas a las condiciones del nicho de la herida, que sin duda implicaría un inmenso estrés para ellas (Gurtner y col., 2008; Junker y col., 2013). Cabe destacar a su vez, que a la fecha no existe conocimiento sobre una respuesta inmune que pudiese ser gatillado por el suero *in vivo*, motivo por el cual se han propuesto otros vehículos para la entrega de MSC, tal como el plasma rico en plaquetas (Formigli y col., 2012).

En este trabajo se corroboró que en condiciones de privación de suero, las WJ-MSC cultivadas en matrices bioartificales expresaron y secretaron factores angiogénicos clásicos y no clásicos (Figuras 7-8), así como una extensa gama de factores involucrados en la sanación de tejidos (Figura 9), volviéndolas potencialmente aptas para su uso en terapia celular con fines de reparación tisular. Cabe destacar que los factores tróficos secretados por las WJ-MSC en su conjunto, constituyen un estímulo que puede actuar tanto sobre células endoteliales como estromales en términos de migración, proliferación, polaridad, diferenciación y comunicaciones célula-célula para promover el desarrollo de nuevas redes vasculares (Herbert & Stainier, 2011).

4.2. Caracterización *in vivo* de las WJ-MSC en matrices bioartificiales

Se demostró en este trabajo que las WJ-MSC promueven la vascularización *in vivo* durante un proceso de reparación dermal dependiente de matrices con una tasa angiogénica mayor que las AD-MSC o las matrices por sí solas (Figura 10).

Es relevante destacar la diferencia significativa obtenida en la vascularización promovida por las WJ-MSC, dentro de las matrices implantadas en los animales, mientras que las AD-MSC no producen el mismo efecto a largo plazo. Esto cobra especial interés dado que las AD-MSC han sido ampliamente utilizadas en el campo de la medicina regenerativa (Schäffler & Büchler, 2007; Jackson y col., 2012). Sin embargo, hasta ahora no se habían realizado estudios comparativos mostrando estas diferencias entre ambos tipos celulares en un modelo *in vivo*.

Más aún, dentro de las ventajas observadas al utilizar las WJ-MSC, es que estimularon una aceleración en el proceso de vascularización respecto de las AD-MSC (Figura 10), así como también una mejor definición de las redes vasculares formadas. Esto podría deberse a la mejor capacidad que tienen las WJ-MSC de adaptarse a situaciones de estrés, así como su menor tiempo de duplicación (Lee y col., 2012) y más importantemente, a una mayor habilidad secretora de los factores tróficos relacionados con los procesos de reparación de tejidos *in vitro* (datos no publicados). Además, el secretoma de las WJ-MSC genera un efecto angiogénico sobre una red vascular completa, evidenciado por la formación y orientación de vasos sanguíneos en ensayos realizados con la membrana corioalantoidea de pollo (CAM) (datos no publicados), ampliamente utilizado como modelo de angiogénesis (Ponce & Kleinman, 2003; Ribatti y col., 2006).

Considerando que en el contexto de utilización de estas células *in vivo*, éstas no deben provocar rechazo inmunogénico, en lugar de ensayar en animales inmunodeprimidos como ha sido reportado previamente en la literatura (Truong y col., 2005; Egaña y col., 2009; Danner y col., 2012; Sukpat y col., 2013), se utilizó la cepa inmunocompetente Balb/c. Importantemente, los animales no reportaron cambios significativos en los niveles de las moléculas evaluadas (TNF, IFN- γ , MCP-1 e IL-6), indicando que no presentaron cambios en su inflamación sistémica durante 10 días de implantación de WJ-MSC respecto de matrices solas (Figura 11). Esto sugiere que los animales no presentaron un rechazo inmunológico hacia las células humanas implantadas, sin embargo no se puede descartar que la inflamación producto de la cirugía misma fue tan elevada que una respuesta por sobre la misma no habría podido ser detectada. Para poder descartar este factor, resultaría necesario el uso de un control positivo, posible mediante la evaluación de la inflamación sistémica en los animales posterior a la aplicación de células que sí presentarían rechazo inmunogénico. Empero los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que estas células son potencialmente atractivas para su uso en terapia celular alogénica.

Los efectos observados en la promoción temprana de la angiogénesis y sanación mediante el uso de WJ-MSC, se condicen con los niveles observados de VEGF-A en el lecho de la herida luego de 5 y 10 días (Figura 12). Puesto que la presencia de las WJ-MSC en el lecho de la herida, promueven un aumento significativo en los niveles de dicho factor respecto de las matrices vacías, pero dicho efecto solo ocurre a tiempos cortos (5 días). Esto es sumamente interesante, puesto que se ha referido a VEGF-A como el factor con el mayor potencial pro-angiogénico descrito a la fecha (Otrock y col., 2007; Gerhardt, 2008), siendo indispensable durante los eventos

tempranos de la angiogénesis, participando particularmente en los procesos de migración y proliferación de las células endoteliales (Ferrara y col., 2003; Barrientos y col., 2008).

Este efecto se podría explicar gracias a la secreción de una extensa gama de factores tróficos por parte de las WJ-MSC en el sitio de la herida (Figura 13), que podrían ser las responsables de inducir una mayor expresión murina de moléculas relacionadas con el proceso de sanación en las etapas iniciales del mismo, como es el caso de VEGF-A, o bien, por sí solos constituir estímulo suficiente para los efectos observados, o más probablemente, una combinación de ambas alternativas.

Resulta evidente entonces que las WJ-MSC expresan un set específico de factores tróficos y citoquinas (Schultz y col., 2012) de manera homeostática, en respuesta a los requerimientos de la herida (Barrientos y col., 2008). Más aún, las células podrían estar expresando dichos factores durante todas las etapas de regeneración de acuerdo a los requerimientos temporales de la herida (dentro de un rango dinámico), lo que contrasta fuertemente con la presencia exclusiva de un factor angiogénico (inclusive aplicado en exceso), ya sea clásico o no clásico, o el uso de medio condicionado, que constituiría únicamente un estímulo inicial, luego de lo cual serían degradados por las proteasas presentes en el sitio de la herida (Robson y col., 1992; Mast, 1996; Robson, 1997). Es importante recalcar entonces el hecho de que la gama de dichos factores en su conjunto, posiblemente logra promover la reparación del tejido de manera homeostática.

Siguiendo con esta línea, se ha reportado en la literatura que factores como VEGF y las Netrinas promueven procesos de angiogénesis tanto *in vitro* (Klagsbrun &

Eichmann 2005; Presta y col. 2005) como *in vivo* (Park y col. 2004; Gerhardt 2008; Li y col., 2011). Sin embargo, los ensayos *in vitro* constituyen sistemas limpios en que el efecto generado por otros factores además de los estudiado pueden ser retirados del sistema, ya sea que solamente los elementos de interés se añadan al sistema, o bien, que los no estudiados sean inhibidos. Mientras que en los ensayos *in vivo* realizados para evaluar el efecto pro-angiogénico de dichos factores, se utilizaron concentraciones considerablemente más altas que las fisiológicas, por lo que su efecto es exacerbado y probablemente se aleje de los que ocurriría en un proceso natural de reparación.

Las concentraciones fisiológicas (Stefanini y col., 2008) y la vida media (Kleinheinz y col., 2010) de los factores tróficos también debe ser consideradas, sin embargo, la información es escasa pese a la gran importancia que cobra una apropiada comprensión de la estabilidad y el efecto generado por un secretoma completo en el curso de la sanación de diversos tejidos.

Durante el presente seminario de título, se demostró a su vez que las matrices IM permiten la infiltración celular (Figura 14), promoviendo la formación de nuevo tejido a partir del andamiaje que ésta ofrece, dentro de las cuales permanecen contenidas las WJ-MSC sembradas (Figura 15), lo cual es sumamente importante puesto que es un posible indicador de que éstas permanecen confinadas al área de implantación y que posiblemente no ingresan al torrente sanguíneo hasta llegar a otros órganos, como reportado previamente en determinados trabajos (Ezquer y col., 2008; Ezquer y col., 2011). Sin embargo no se puede descartar que las WJ-MSC hayan migrado desde la matriz implantada hacia tejido aledaño, por lo que claramente más estudios deben ser realizados para anular dicha alternativa.

Es claro que la aproximación terapéutica propuesta en este trabajo suena prometedora, empero resulta evidente que mayor investigación es necesaria para evaluar qué ocurre con las WJ-MSc *in vivo*, puesto que no existe evidencia acerca de la destinación de dichas células posterior a su implantación mediante el método de entrega propuesto en este trabajo. Por supuesto que también se requieren etapas de investigación clínica para evaluar si los efectos benéficos observados en el modelo propuesto se conservan en nuestra especie.

4.3. Proyecciones del trabajo

Las propiedades pro-angiogénicas que poseen las WJ-MSc, en conjunto con su capacidad inmunomoduladora, presentados en los resultados de este seminario de título, sugieren fuertemente que el uso de matrices bioactivadas con WJ-MSc es una alternativa altamente atractiva para procesos de reparación de tejido en protocolos de terapia celular alogénica, con propiedades mejoradas respecto de otros tipos de MSc utilizados actualmente en la clínica.

Sería interesante evaluar entonces, si los resultados obtenidos en un modelo animal inmunocompetente sano, se conservan en animales con patologías crónicas en que los procesos de vascularización se encuentren alterados, como la diabetes. De manera complementaria, identificar la destinación final de las células implantadas en los animales, así como determinar los posibles efectos adversos luego de períodos más largos de implantación.

4.4. Modelo propuesto

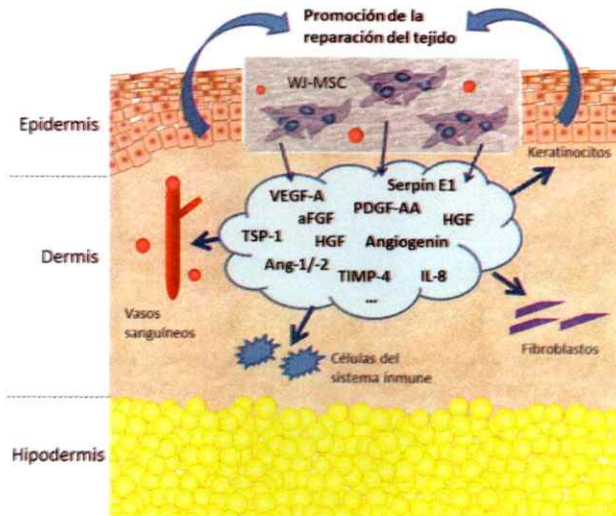


Figura 16: Modelo propuesto para el proceso de regeneración promovido por las WJ-MSC en el lecho de la herida. La matriz bioartificial enriquecida con WJ-MSC libera factores promovedores de angiogénesis y moduladores de la inflamación del tejido, actuando tanto sobre células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos y componentes del sistema inmune para promover y acelerar los procesos relacionados con la sanación del tejido.

5. CONCLUSIONES

1. Las WJ-MSC se asientan homogéneamente y permanecen metabólicamente activas en matrices bioartificiales durante el tiempo de evaluación, siendo más resistentes que las AD-MSC a condiciones de estrés.
2. Las WJ-MSC expresan y secretan factores que promueven la angiogénesis y sanación de tejidos, tanto *in vitro* como *in vivo*.
3. Las WJ-MSC sembradas en matrices bioartificiales tienen potencial terapéutico, puesto que promueven y aceleran el proceso de reparación dermal, en comparación con las AD-MSC expuestas a la misma condición.
4. Las WJ-MSC permanecen en el área de implantación, promoviendo la infiltración de células murinas hacia el sitio del daño, colaborando activamente al proceso de cicatrización.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adair, T.H. & Montani J.P. 2010. *Angiogenesis*. Morgan & Claypool Life Sciences. San Rafael, California.
- Azari, O. y col. 2011. Effects of transplanted mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of caprine umbilical cord on cutaneous wound healing; histopathological evaluation. *Veterinary research communications*. **35**: 211–222.
- Bagnard D. 2007. Axon Growth and Guidance. *En* J.D. Lambris (ed.). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Science; Volume 621. Quai Saint Bernard, Paris.
- Barrientos, S. y col. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*. **16**: 585–601.
- Bartosh, T.J. y col. 2010. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**: 13724–13729.
- Bizzarri, A. y col. 2006. Continuous oxygen monitoring in subcutaneous adipose tissue using microdialysis. *Analytica chimica acta*. **573-574**: 48–56.
- Bulmer, J.N. y col. 2012. IFPA Meeting 2011 workshop report II: Angiogenic signaling and regulation of fetal endothelial function; placental and fetal circulation and growth; spiral artery remodeling. *Placenta*. **26**: S9–S14.
- Burd, A. & Chiu, T. 2005. Allogenic skin in the treatment of burns. *Clinics in Dermatology*. **23**: 376–387.
- Burlacu, A. y col. 2013. Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis in vitro. *Stem cells and development*. **22**: 643–653.
- Carmeliet, P. 2003. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nature reviews. Genetics*. **4**: 710–720.
- Carmeliet, P. & Tessier-Lavigne, M. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. **436**: 193–200.
- Carvalho, M.M. y col. 2011. Mesenchymal Stem Cells in the Umbilical Cord: Phenotypic Characterization, Secretome and Applications in Central Nervous System Regenerative Medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*. **6**: 221–228.
- Castets, M. y col. 2009. Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis. *Developmental cell*. **16**: 614–620.
- Castro-Malaspina, H. y col. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. **56**: 289–301.

Chen, M.Y. y col. 2009. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*. **37**: 629–640.

Choi, M. y col. 2013. Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **45**: 560–570.

Contreras-Téllez, E.J. y col. 2007. Enfermedad arterial periférica y factores de riesgo en pacientes diabéticos tipo 2. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. **45**: 117–122.

Cuadra, A. y col. 2012. Functional results of burned hands treated with Integra®. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS*. **65**: 228–234.

Currie, L. y col. 2003. A comparison of keratinocyte cell sprays with and without fibrin glue. *Burns*. **29**: 677–685.

Danner, S. y col. 2012. The use of human sweat gland-derived stem cells for enhancing vascularization during dermal regeneration. *The Journal of investigative dermatology*. **132**: 1707–1716.

De Bari, C. y col. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism*. **44**: 1928–1942.

Dong, J. y col. 2012. Neural stem cells in the ischemic and injured brain: endogenous and transplanted. *Cell and tissue banking*. **13**: 623–629.

Drury, J.L. & Mooney, D.J. 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. **24**: 4337–4351.

Egaña, J.T., Condurache, A., y col. 2009. *Ex vivo* method to visualize and quantify vascular networks in native and tissue engineered skin. *Langenbeck's archives of surgery*. **394**: 349–356.

Egaña, J.T., Danner, S., y col. 2009. The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. *Biomaterials*. **30**: 5918–5926.

Egaña, J.T., Fierro, F.A., y col. 2009. Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration. *Tissue engineering. Part A*. **15**: 1191–1200.

Eichmann, A. y col. 2005. Guidance of vascular and neural network formation. *Current opinion in neurobiology*. **15**: 108–115.

Elsdale, T. & Bard, J., 1972. Collagen Substrata for Studies on Cell Behavior. *The Journal of Cell Biology*. **54**: 626–637.

Eming, S., Krieg, T. & Davidson, J., 2008. Gene Therapy and Wound Healing. *Clinical Dermatology*. **25**: 79–92.

Ezquer, F.E. y col. 2008. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. **14**: 631–640.

Ezquer, M. y col. 2011. Intravenous administration of multipotent stromal cells prevents the onset of non-alcoholic steatohepatitis in obese mice with metabolic syndrome. *Journal of hepatology*. **55**: 1112–1120.

Falanga, V. 2012. Stem cells in tissue repair and regeneration. *The Journal of investigative dermatology*. **132**: 1538–1541.

Falanga, V. 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. **366**: 1736–1743.

Ferrara, N., Gerber, H.-P. & LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. **9**: 669–676.

Folkman, J. & Shing, Y. 1992. Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**: 10931–10934.

Formigli, L. y col. 2012. Dermal matrix scaffold engineered with adult mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma as a potential tool for tissue repair and regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. **6**: 125–134.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK & Lalykina KS. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*. **3**: 393–403.

Gerhardt, H., 2008. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis*. **4**: 241–246.

Gnecchi, M. y col. 2008. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research*. **103**: 1204–1219.

Grant, I. y col. 2002. The co-application of sprayed cultured autologous keratinocytes and autologous fibrin sealant in a porcine wound model. *British journal of plastic surgery*. **55**: 219–227.

Guercio, A. y col. 2012. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell biology international*. **36**: 189–194.

Guo, S. & Dipietro, L.A. 2010. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*. **89**: 219–229.

Gurtner, G.C. y col. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature*. **453**: 314–321.

Hass, R. y col. 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling : CCS*. **9**: 1–14.

- Heimbach, D. y col. 1988. Artificial Dermis for Major Burns. *Annals of Surgery*. **208**: 313–320.
- Hematti, P. 2009. Role of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. *Transplant Rev*. **22**: 262–273.
- Herbert, S.P. & Stainier, D.Y.R. 2011. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **12**: 551–564.
- Hocking, A.M. & Gibran, N.S. 2010. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Experimental cell research*. **316**: 2213–2219.
- Hsieh, J.Y. y col. 2013. Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Express Preferentially Secreted Factors Related to Neuroprotection, Neurogenesis, and Angiogenesis. *PLoS ONE*. **8**: p.e72604.
- Idson, B. 1975. Percutaneous Absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **64**: 901–924.
- Jackson, W.M., Nesti, L.J. & Tuan, R.S. 2012. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem cells translational medicine*. **1**: 44–50.
- James, J.M. & Mukoyama, Y. 2011. Neuronal action on the developing blood vessel pattern. *Seminars in cell & developmental biology*. **22**: 1019–1027.
- Jones, I., Currie, L. & Martin, R. 2002. A guide to biological skin substitutes. *British journal of plastic surgery*. **55**: 185–193.
- Junker, J.P.E., Caterson, E.J. & Eriksson, E. 2013. The microenvironment of wound healing. *The Journal of craniofacial surgery*. **24**: 12–16.
- Kadner, A. y col. 2004. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *European journal of cardio-thoracic surgery*. **25**: 635–641.
- Kaully, T. y col. 2009. Vascularization—the conduit to viable engineered tissues. *Tissue engineering. Part B*. **15**: 159–169.
- Kenar, H., Kose, G.T. & Hasirci, V. 2010. Design of a 3D aligned myocardial tissue construct from biodegradable polyesters. *Journal of materials science. Materials in medicine*. **21**: 989–997.
- Kim, B.M. y col. 1999. Cellular artificial skin substitute produced by short period simultaneous culture of fibroblasts and keratinocytes. *British journal of plastic surgery*. **52**: 573–578.
- Kim, S.W. y col. 2012. Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities. *PLoS one*. **7**: p.e41105.
- Klagsbrun, M. & Eichmann, A. 2005. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **16**: 535–548.

- Kleinheinz, J. y col. 2010. Release kinetics of VEGF 165 from a collagen matrix and structural matrix changes in a circulation model. *Head & Face Medicine*. **6**: 1–7.
- Krogh, A., 1919. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol*. **27**: 409–415.
- Landman, K.A & Cai, A.Q. 2007. Cell proliferation and oxygen diffusion in a vascularising scaffold. *Bulletin of mathematical biology*. **69**: 2405–2428.
- Larrieu-Lahargue, F. y col. 2010. Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo. *Blood*. **115**: 5418–5426.
- Lavrentieva, A. y col. 2010. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell communication and signaling: CCS*. **8**: 1–9.
- Lee, H.J. y col. 2012. Comparison of *in vitro* hepatogenic differentiation potential between various placenta-derived stem cells and other adult stem cells as an alternative source of functional hepatocytes. *Differentiation; research in biological diversity*. **84**: 223–231.
- Lee, J., Cuddihy, M.J. & Kotov, N.A. 2008. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue engineering. Part B*. **14**: 61–86.
- Lee, O.K. y col. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. **103**: 1669–1675.
- Lee, W.Y. y col. 2012. Vascularization and restoration of heart function in rat myocardial infarction using transplantation of human cbMSC/HUVEC core-shell bodies. *Biomaterials*. **33**: 2127–2136.
- Lejmi, E. y col. 2008. Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**: 12491–12496.
- Li, Q. y col. 2013. *In vivo* tracking and comparison of the therapeutic effects of MSCs and HSCs for liver injury. *PLoS one*. **8**: p.e62363.
- Li, Q. y col. 2011. Transplantation of MSCs in combination with Netrin-1 improves neoangiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *The Journal of surgical research*. **166**: 162–169.
- Ma, T. y col. 2010. Hypoxia and Stem Cell-Based Engineering of Mesenchymal Tissues. *Biotechnol Prog*. **25**: 32–42.
- Machens, H., Berger, A.C. & Mailaender, P. 2000. Bioartificial Skin. *Cells Tissues Organs*. **167**: 88–94.
- Macneil, S. 2008. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*. **11**: 26–35.
- Makanya, A.N., Hlushchuk, R. & Djonov, V.G. 2009. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis*. **12**: 113–123.

- Mano, J.F. y col. 2007. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society, Interface* 4: 999–1030.
- Martínez, C. y col. 2013. Proliferation of murine midbrain neural stem cells depends upon an endogenous sonic hedgehog (Shh) source. *PLoS one*. 8: p.e65818.
- Martínez-Santamaría, L. y col. 2013. The regenerative potential of fibroblasts in a new diabetes-induced delayed humanised wound healing model. *Experimental dermatology*. 22: 195–201.
- Mast, B.A. 1996. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Rep. Reg.* 4: 411–420.
- Maxson, S. y col. 2012. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem cells translational medicine*. 1: 142–149.
- Moiemen, N.S. y col. 2006. Reconstructive surgery with Integra dermal regeneration template: histologic study, clinical evaluation, and current practice. *Plastic and reconstructive surgery*. 117: p.S160–S174.
- Morandi, F. y col. 2008. Immunogenicity of Human Mesenchymal Stem Cells in HLA-Class I restricted T cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells*. 26: 1275–1287.
- Moussedine, M. y col. 2007. Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. *The British journal of radiology*. 80: S49–S55.
- Murphy, C.M. & O'Brien, F.J., 2010. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion & Migration*. 4: 377–381.
- Otrock, Z.K. y col. 2007. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood cells, molecules & diseases*. 39: 212–220.
- Pappa, K.I. & Anagnou, N.P. 2009. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regenerative medicine*. 4: 423–433.
- Park, H.J., Yang, F. & Cho, S.-W., 2012. Nonviral delivery of genetic medicine for therapeutic angiogenesis. *Advanced drug delivery reviews*. 64: 40–52.
- Park, K.W. y col. 2004. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 16210–16215.
- Pecoraro, R., Reiber, G. & Burgess, E. 1990. Pathways to Diabetic Limb Amputation. Basis for Prevention. *Diabetes Care*. 13: 513–521.
- Peng, L. y col. 2008. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem cells and development*. 17: 761–773.

Pham, C. y col. 2007. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 33: 946–957.

Phinney, D.G. & Prockop, D.J. 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem cells*. 25: 2896–2902.

Ponce L, Kleinman H. 2003. The Chick Chorioallantoic Membrane as an *In Vivo* Angiogenesis Model. *Current Protocols in Cell Biology*.19:22-39.

Pozzi, S. y col. 2006. Donor multipotent mesenchymal stromal cells may engraft in pediatric patients given either cord blood or bone marrow transplantation. *Experimental hematology*. 34: 934–942.

Prasanna, S.J. y col. 2010. Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS one*. 5: p.e9016.

Presta, M. y col. 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*. 16: 159–178.

Ribatti D, Nico B, Vacca A, Presta M. 2006. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nat Protoc*. 1: 85-91.

Ribeiro, C. a y col. 2012. The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. *Stem cell research & therapy*. 3: 18.

Robson, M., 1997. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Rep. Reg*. 5: 12-17.

Robson, M. y col. 1992. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Annals of surgery*. 216: 401–408.

Rojewski, M.T., Weber, B.M. & Schrezenmeier, H. 2008. Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 35: 168–184.

Roufosse, C. a y col. 2004. Circulating mesenchymal stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 36: 585–597.

Sahota, P.S. y col. 2003. Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis. *Wound repair and regeneration*. 11: 275–284.

Salem, H.K. & Thiemermann, C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells*. 28: 585–596.

Schäffler, A. & Büchler, C., 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem cells*. 25: 818–827.

- Schechner, J.S. y col. 2000. *In vivo* formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**: 9191–9196.
- Schultz, G.S. y col. 2012. Dynamic Reciprocity in the Wound Microenvironment. *Wound Repair Regen*. **19**: 134–148.
- Schwartz, R.E. y col. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of Clinical Investigation*. **109**: 1291–1302.
- Sensebé, L., Bourin, P. & Tarte, K. 2011. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Human gene therapy*. **22**: 19–26.
- Shetty, P. y col. 2011. Directed therapeutic angiogenesis by mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix in preclinical model of ischemic limb disease. *Stem Cell Studies*. **1**: 97–104.
- Shi, C. y col. 2011. Stem-cell-capturing collagen scaffold promotes cardiac tissue regeneration. *Biomaterials*. **32**: 2508–2515.
- Singer, A. & Clark, R. 1999. Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*. **341**: 738–746.
- Song, S.H. y col. 2012. Genetic modification of human adipose-derived stem cells for promoting wound healing. *Journal of dermatological science*. **66**: 98–107.
- Stappenbeck, T.S. & Miyoshi, H. 2009. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science*. **324**: 1666–1669.
- Stefanini, M.O. y col. 2008. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC systems biology*. **2**: 77.
- Stewart, M.C. & Stewart, A.A., 2011. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*. **27**: 243–261.
- Sukpat, S. y col. 2013. Vasculoprotective effects of combined endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells in diabetic wound care: their potential role in decreasing wound-oxidative stress. *BioMed research international*. **2013**: 1–8.
- Supp, D.M. & Boyce, S.T. 2005. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clinics in dermatology*. **23**: 403–412.
- Tam, S.J. & Watts, R.J. 2010. Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood-brain barrier. *Annual review of neuroscience*. **33**: 379–408.
- Troyer, D.L. & Weiss, M.L. 2008. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem cells*. **26**: 591–599.
- Truong, A.T.N. y col. 2005. Comparison of dermal substitutes in wound healing utilizing a nude mouse model. *Journal of burns and wounds*. **4**: 72–82.

- Valtieri, M. & Sorrentino, A. 2008. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *Journal of cellular physiology*, **217**: 296–300.
- Varu, V.N., Hogg, M.E. & Kibbe, M.R., 2010. Critical limb ischemia. *Journal of Vascular Surgery*, **51**: 230–241.
- Vogt, P.M. y col. 1994. Genetically modified keratinocytes transplanted to wounds reconstitute the epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**: 9307–9311.
- Wagner, W. y col. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology*. **33**: 1402–1416.
- Wang, H.S. y col. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells*. **22**: 1330–1337.
- Wei, L. y col. 2012. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiology of disease*. **46**: 635–645.
- Weinstein, B.M. 2005. Vessels and nerves: marching to the same tune. *Cell*. **120**: 299–302.
- Weinstein-Oppenheimer, C.R. y col. 2010. The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on wound healing. *Journal of translational medicine*. **8**: 59.
- Weiss, M.L. y col. 2008. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem cells*. **26**: 2865–2874.
- Werner, S. & Grose, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*. **83**: 835–870.
- Wilcke, I. y col. 2007. VEGF(165) and bFGF protein-based therapy in a slow release system to improve angiogenesis in a bioartificial dermal substitute *in vitro* and *in vivo*. *Langenbeck's archives of surgery*. **392**: 305–314.
- Wilson, B. y col. 2006. Netrins Promote Developmental and Therapeutic Angiogenesis. *Science*. **313**: 640–644.
- Wisser, D. & Steffes, J., 2003. Skin replacement with a collagen based dermal substitute, autologous keratinocytes and fibroblasts in burn trauma. *Burns*. **29**: 375–380.
- With, P. y col. 2009. Intramuscular Transplantation of G-CSF-Mobilized CD34⁺ 1 Cells in. *Stem Cells*. **27**: 2857–2864.
- Wobus, A.M. & Boheler, K.R. 2005. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol Rev*. **85**: 635–678.
- Wolf, D. 2009. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. **114**: 185–199.

Yang, Y. y col. 2007. Axon Guidance Cue Netrin-1 Has dual function in Angiogenesis. *Cancer Biology & Therapy*. **6**: 743–748.

Yao, M. y col. 2013. Ease of Use, Safety, and Efficacy of Integra Bilayer Wound Matrix in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers in an Outpatient Clinical Setting. A Prospective Pilot Study. *Journal of the American Podiatric Medical Association*. **103**: 274–280.

Yasuoka, H. y col. 2008. Human skin culture as an *ex vivo* model for assessing the fibrotic effects of insulin-like growth factor binding proteins. *The open rheumatology journal*. **2**: 17–22.

Yoo, K.H. y col. 2009. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cellular immunology* **259**: 150–156.

Zisch, A.H. y col. 2003. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell-ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *The FASEB Journal*. **10**: 1–25.

Zuk, P.A. y col. 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*. **13**: 4279–4295.