



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTITULO

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MIGRACIÓN Y
ESTIMULACIÓN DE ANGIOGÉNESIS *IN VITRO* DE
CÉLULAS MADRE MESENQUIMÁTICAS DERIVADAS
DE MÉDULA ÓSEA Y TEJIDO ADIPOSEO FETAL BOVINO**

MIGUEL EDUARDO JERVIS SECAIRA

**Tesis para optar por al grado de
Magister en Ciencias Animales y Veterinarias**

**Santiago – Chile
2017**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTITULO

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MIGRACIÓN Y
ESTIMULACIÓN DE ANGIOGÉNESIS *IN VITRO* DE
CÉLULAS MADRE MESENQUIMÁTICAS DERIVADAS
DE MÉDULA ÓSEA Y TEJIDO ADIPOSEO FETAL BOVINO**

MIGUEL EDUARDO JERVIS SECAIRA

**Tesis para optar por al grado de
Magister en Ciencias Animales y Veterinarias**

DIRECTOR DE TESIS: DR. OSCAR PELTA T.

**Santiago – Chile
2017**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTITULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGISTER PRESENTADA POR EL CANDIDATO

MIGUEL EDUARDO JERVIS SECAIRA

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DIA 16 DE MAYO DE 2017

DIRECTOR DE TESIS

DR. OSCAR PERALTA T.

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DRA. MA SOLEDAD FERNANDEZ G.

DR. CRISTIAN TORRES M.

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio Centralizado de Investigación Veterinaria – LACIV, del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y contó con financiamiento

Fondef IDeA ID 45110129

“Desarrollo de una terapia experimental alogénica basada en células madre mesenquimáticas para el tratamiento de la mastitis bovina”

Biografía

Mi nombre es Miguel Eduardo Jervis Secaira, de nacionalidad ecuatoriano. Soy estudiante nacido el 27 de enero de 1986. Por mi propia iniciativa y empeño inicié mi preparación académica como estudiante de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias de la Universidad de Chile.

Estudie Medicina Veterinaria y Zootecnia en la “Universidad Central del Ecuador” de la ciudad de Quito, en donde me fue otorgado el título de Médico Veterinario Zootecnista. Adicionalmente me desempeñé como ganadero en el subtrópico ecuatoriano, en donde mi padre y yo logramos adecuar un sistema pastoril doble propósito, que es usado como referente de la zona.

Mi madre Alicia Catalina Secaira Durango, es mi mayor motivación para seguir estudiando y creciendo personalmente. Mi padre Miguel Jervis López, Ingeniero Agrónomo, ha dedicado toda su vida al desarrollo ganadero en Ecuador y Colombia, siendo su pasión hacia el campo mi mayor herencia. Mi hermana Nair, Abogada, desde su residencia en Suecia ha logrado calmar mis temores y preocupaciones; mi hermano Felipe, Ingeniero Comercial, me ha ayudado a alcanzar mi meta dándome fuerza y ejemplo.

Estoy casado con Michelle Daniela Gallmeier Jaramillo, quien me ha apoyado en todo y se ha convertido en mi mejor amiga y aliada. Desde este año tengo el mejor de mis regalos, mi hija Anahí Rafaela Jervis Gallmeier, que ha logrado despertar sentimientos desconocidos en mí y se ha convertido en mi inspiración.

Dedicatoria

A mi esposa Michelle, aunque no siempre he entendido mis culpas y mis fracasos, en cambio sé que en tus brazos el mundo tiene sentido.

A mi hija Anahí, todavía creo que nuestro mejor dialogo ha sido el de las miradas. ¡Tú me inspiras!

Agradecimiento

Quisiera agradecer de manera de manera especial y sincera al Dr. Oscar Peralta por aceptarme dentro del FONDEF IDeA que dirige y por haberme apoyado en cada una de las etapas de la realización de esta tesis de magister.

De igual manera a la Dra. Javiera Bahamonde por haberme apoyado en la parte experimental y por su paciencia y tiempo dedicado a mí y a mis compañeros.

Parte fundamental de esta tesis la realice con la ayuda del Dr. Cristian Torres y el Dr. Ignacio Arias por lo que les agradezco mucho.

Así mismo, quisiera agradecer a la Dra. Soledad Fernández por su tiempo y su ayuda en la realización de esta tesis.

Por último, quisiera agradecer a mis compañeros del proyecto que gracias a ellos pudimos obtener resultados satisfactorios. A Berly Cahuascango, Olger Huaman, Jahaira Cortez y Moises Segunda.

Índice de Contenidos

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 10 |
| Abstract..... | 12 |
| Introducción | 14 |
| Revisión bibliográfica | 16 |
| Migración celular..... | 16 |
| Potencial de migración de las MSC | 18 |
| Ensayos in vitro de migración celular..... | 20 |
| Capacidad de angiogénesis de las MSC | 21 |
| Potenciales de migración y angiogénesis en MSC-MO y MSC-TA | 23 |
| Hipótesis | 24 |
| Objetivos | 24 |
| Objetivo general..... | 24 |
| Objetivos específicos | 24 |
| Material y métodos..... | 25 |
| Extracción y cultivo de MSC derivadas de médula ósea fetal bovina | 25 |
| Extracción y cultivo de MSC de tejido adiposo fetal bovino | 25 |
| Extracción y cultivo de fibroblastos fetales bovinos | 26 |
| Análisis de migración de MSC mediante ensayo de Scratch | 27 |
| Análisis de migración mediante ensayo de scratch en MSC marcadas mediante sonda fluorescente CFDA SE..... | 27 |
| Análisis de migración de MSC mediante ensayo de transwell | 28 |
| Extracción y cultivo de células endoteliales derivadas de aorta fetal bovina | 28 |
| Análisis de la capacidad angiogénica de MSC mediante ensayo de formación de túbulos de células endoteliales | 29 |
| Análisis de un perfil de expresión de genes asociados a migración celular y angiogénesis en MSC | 30 |
| Análisis de datos | 31 |
| Resultados | 33 |
| Análisis de migración de MSC mediante ensayo de scratch..... | 33 |
| Análisis de migración mediante ensayo de scratch en MSC marcadas mediante sonda fluorescente CFDA SE..... | 33 |
| Análisis de migración de MSC mediante ensayo Transwell..... | 37 |
| Análisis de un perfil de expresión de genes asociados a migración en MSC | 37 |

| | |
|---|----|
| Análisis de la capacidad angiogénica de MSC mediante ensayo de formación de túbulos de células endoteliales | 39 |
| Análisis de un perfil de expresión de genes asociados a angiogénesis en MSC | 43 |
| Discusión | 45 |
| Bibliografía | 49 |

Resumen

Las células madres mesenquimáticas (MSC) se han caracterizado inicialmente por su potencial de autorenovación y diferenciación *in vitro* hacia linajes celulares mesodérmicos. Sin embargo; el potencial terapéutico de las MSC se basa principalmente en sus capacidades de migración y angiogénesis importantes para la regeneración tisular. El objetivo del presente estudio fue determinar los potenciales de migración y angiogénesis de las MSC derivadas de médula ósea (MSC-MO) y de tejido adiposo (MSC-TA) fetales bovinas. El ensayo de migración scratch se utilizó para determinar la capacidad migratoria de las MSC, utilizando fibroblastos (FB) fetales como controles biológicos. Para este ensayo se cultivaron 44×10^3 células/cm² hasta alcanzar 80% de confluencia. Luego de 24 horas, se realizó el scratch en la monocapa de cada línea celular y el área de migración fue cuantificada en el tiempo 0 y luego de 24 horas mediante el software ImageJ. El análisis de migración transwell, se utilizó para determinar el potencial de migración celular en respuesta al quimiotáctico factor derivado de células estromales-1 (SDF-1). Para este análisis se cultivaron 25×10^3 células/mL por 24 horas, en respuesta a SDF-1 utilizando 5% suero fetal bovino (SFB) y medio DMEM como controles. Las células que migraron hacia el lado inferior de la membrana transwell fueron observadas y cuantificadas mediante el software ImageJ. Para el análisis del potencial angiogénico de MSC, se realizó el ensayo de formación de túbulos. Células endoteliales de aorta bovina fetal fueron aisladas y resuspendidas en medios condicionados de MSC-MO, MSC-TA y FB. Luego de 6 horas de incubación a 38°C en 5% CO₂ se observó y cuantificó la formación de estructuras tubulares utilizando el software ImageJ. La expresión de genes de migración, SDF-1, su receptor CXCR4 y la quimiocina secretada y expresada por linfocitos T normales regulada por activación (RANTES) y de genes de angiogénesis, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y angiopoyetina 1 (ANGPT1) fue cuantificada mediante PCR cuantitativo (Q-PCR). Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por ANOVA de una vía y para las diferencias entre los promedios se utilizó el post test de tuckey, utilizando el software InfoStat. Mediante ensayo scratch se determinó un mayor ($p < 0,05$) porcentaje de

migración *in vitro* en cultivos de MSC-MO comparado con FB. Sin embargo; los porcentajes de migración no fueron distintos ($p > 0,05$) entre MSC-MO y MSC-TA. El ensayo transwell permitió determinar un mayor ($p < 0,05$) número de células migrantes en cultivos tratados con DMEM suplementado con 5% de SFB. Sin embargo; no se detectaron diferencias significativas entre líneas celulares. Se determinó que los niveles de mRNA de SDF-1 fueron mayores ($p < 0,05$) en MSC-TA comparado con MSC-MO y FB. Los niveles de mRNA de RANTES fueron mayores ($p < 0,05$) en MSC-TA comparado con FB. Sin embargo; los niveles de mRNA de CXCR4 no fueron distintos ($p > 0,05$) entre las líneas celulares en estudio. El medio condicionado concentrado de MSC-TA indujo mayor ($p < 0,05$) formación de túbulos, comparado con MSC-MO, FB y sus controles DMEM con 5% de SFB y DMEM. Además, se cuantificó una mayor ($P < 0,05$) expresión de VEGF en MSC-TA comparado con las otras líneas celulares. En comparación, la expresión de ANGPT1 fue mayor ($p < 0,05$) en MSC-MO y FB comparado con MSC-TA. En conclusión, el potencial de migración entre MSC-MO y MSC-TA es similar, lo cual puede estar determinado por niveles de expresión similares del receptor CXCR4. A su vez, una mayor expresión de VEGF en MSC-TA puede determinar que estas células presenten una mayor capacidad angiogénica comparado con MSC-MO.

Palabra Clave: Célula madre mesenquimática, Médula Osea, Tejido Adipo, migración, angiogénesis.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) were initially characterized by their potential for self-renewal and *in vitro* differentiation into mesodermal cell lines. However, the therapeutic potential of MSCs is primarily based on their migration and angiogenic capacities, which are important for tissue regeneration. The objective of the present study was to determine the migration and angiogenic potentials of MSCs derived from bone marrow (MSC-MO) and adipose fetal bovine tissue (MSC-TA). The scratch migration assay was used to determine the migratory capacity of MSC, using fetal fibroblasts (FB) as biological controls. For this, 44×10^3 cells/cm² were cultured until 80% confluence. After 24 hours, the scratch was performed in the monolayer of each cell line culture and the migration area was quantified at time 0 and after 24 hours using ImageJ software. The transwell migration analysis was used to determine cell migration capacity in response to the chemokine stromal differentiation factor-1 (SDF-1). For this assay, 25×10^3 cells/mL were grown for 24 hours in response to SDF-1, using as SFB 5% and DMEM as controls. Cells that migrated to the underside of the transwell membrane were observed and quantified using the ImageJ software. In order to determine the angiogenic potential of MSC, the tubule formation test was performed. Endothelial cells of bovine aorta were isolated and resuspended in conditioned media of each cell line. After 6 hours of incubation, the number of tubular structures was quantified and analyzed using ImageJ software. The relative expression levels of migration genes SDF-1, its receptor CXCR4, regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) and angiogenic genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin (ANGPT1) were analyzed using quantitative-PCR (Q-PCR). The data obtained were statistically analyzed by one-way ANOVA and the tuckey post test was used to determine differences between means, using InfoStat software. The scratch test allowed to determine a higher ($p < 0.05$) percentage of migration in MSC-MO cultures compared to FB. However, migration rates were not different ($p > 0.05$) between MSC-MO and MSC-TA. The highest ($p < 0.05$) number of migrant cells in the transwell test was detected in cultures treated with DMEM supplemented with 5% FBS. However, no significant differences were detected between cell

lines. SDF-1 mRNA levels were higher ($p < 0.05$) in MSC-TA compared to MSC-MO and FB. Similarly, RANTES mRNA levels were higher ($p < 0.05$) in MSC-TA compared to FB. CXCR4 mRNA levels were not different ($p > 0.05$) between cell lines. Concentrated conditioned (CC) media of MSC-TA induced greater ($p < 0.05$) tubule formation, compared to CC of MSC-MO, FB and its controls. Moreover, the highest ($P < 0.05$) expression of VEGF was observed in MSC-TA, compared to the other cell lines. In the case of the expression of ANGPT1 the expression was higher in MSC-MO and FB compared to MSC-TA. In conclusion, a similar migration potential between MSC-MO and MSC-TA may be associated to similar expression of the CXCR4 receptor. Moreover, higher expression of VEGF in MSC-TA may explain the greater angiogenic capacity of these cells compared to MSC-MO.

Key words: Mesenchymal stem cell, Bone Marrow, Adipose Tissue, migration, angiogenesis.

Introducción

Las células madres mesenquimáticas (MSC) han sido definidas por su capacidad de autorrenovación y su potencial de diferenciación *in vitro* hacia linajes celulares derivados de la capa germinal mesodérmica incluyendo osteogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico (Pittenger et al. 1999). Las MSC están presentes en múltiples tejidos como médula ósea, tejido adiposo, intestino, piel, músculos, entre otros (Li y Xie, 2005). En estos tejidos, cumplen funciones de mantención de la homeostasis y median su regeneración en caso de daño tisular (Perdiguero et al., 2016). La mantención, sobrevivencia y función de las MSC depende del microambiente en que se desarrollan, de sus propiedades intrínsecas, así como de señales extrínsecas que las estimulan (Jones y Wagers, 2008). En el último tiempo se ha reportado que las MSC ejercen su capacidad mediante propiedades de migración y angiogénesis que son fundamentales para cumplir la función regenerativa en los tejidos.

La migración celular es crucial para muchos procesos biológicos como la morfogénesis, la respuesta inmune, la reparación de tejidos y la metástasis en procesos patológicos como el cáncer (Friedl y Gilmour, 2009). Los estudios de migración *in vitro* son esenciales para entender el contexto fisiológico de las células y de esta manera también se ha logrado evaluar el comportamiento de las MSC (Golipoor et al., 2016). La propiedad de migración de MSC hacia áreas de daño tisular ha sido definida como “homing” y ocurre por medio de señales o factores tisulares que aun no han sido completamente aclarados y cuyo estudio permitiría potenciar el desarrollo de una terapia con MSC (Baek et al., 2011; First et al., 2016).

La angiogénesis se ha definido como el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre existentes, es un proceso altamente complejo en el que participan varios tipos de células y vías de señalización (Baker et al. 2012). Este proceso incluye la estimulación de células endoteliales por medio de diferentes factores proangiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los que han

sido descritos en vesículas liberadas por las MSC y que por lo tanto constituyen parte de su secretoma (Burlacu et al. 2013).

En el último tiempo se han reportado estudios que describen el aislamiento de MSC bovinas desde médula ósea (MO), tejido adiposo (TA), líquido amniótico, placenta y sangre de cordón umbilical (Cortes et al., 2013; Raoufi et al., 2011). En dichos estudios se ha determinado su morfología, expresión de antígenos de superficie celular y potencial de diferenciación hacia linajes mesodérmico, endodérmico y ectodérmico (Raoufi et al. 2011; Cortes et al. 2013; Bosnakovski et al. 2005; Dueñas et al. 2014). Estos datos contribuyen a reforzar la importancia de MSC como potenciales herramientas de utilidad para la medicina del ganado bovino. Sin embargo; aun son desconocidos los potenciales de migración y angiogénesis de MSC bovinas, cuyas capacidades son importantes para determinar su potencial terapéutico. El objetivo del presente estudio es comparar el potencial de migración y angiogénesis *in vitro* de MSC derivadas de MO y TA con el fin de evaluar la mejor fuente tisular para uso terapéutico.

Revisión bibliográfica

Según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), las MSC de origen humano deben cumplir tres requisitos para poder ser definidas como tales: 1) poseer capacidad de adherencia a superficies de plástico bajo condiciones estándares de cultivo *in vitro*; 2) expresar moléculas de superficie de perfil mesenquimático como CD105, CD73 y CD90 y no expresar marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR; y 3) poseer potencial de diferenciación *in vitro* hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Dominici et al., 2006). Estos requisitos aun no han sido acordados en otras especies y en el caso del modelo bovino sólo existen escasos estudios que han caracterizado poblaciones de MSC, los que indican la expresión de ciertos marcadores mesenquimáticos y la diferenciación a capas germinales mesodérmicas (Cortes et al., 2013; Dueñas et al., 2014).

La terapia celular basada en la utilización de MSC ha generado mucho interés en los últimos años, como una alternativa terapéutica para una gran variedad de enfermedades (Eggenhofer et al., 2014). En el caso de la Medicina Veterinaria, se han realizado reportes sobre la utilización de MSC para el tratamiento de enfermedades articulares en caninos (Black et al., 2007), enfermedad renal crónica en felinos (Quimby y Dow, 2015), lesiones tendinosas en equinos (Guercio et al., 2015), entre otras. La capacidad terapéutica de las MSC, es mediada por una variedad de factores bioactivos que ejercen diversas funciones entre las que se reportan efectos inmunomoduladores, antiapoptóticos, antiinflamatorios, proangiogénicos, quimiotácticos y estimulantes de la regeneración tisular (da Silva Meirelles et al., 2009). Adicionalmente, una de las cualidades que potencia la utilización de MSC para uso terapéutico en distintas patologías es su capacidad de migración o “homing” hacia áreas lesionadas (Baek et al., 2011).

Migración celular

La migración celular es un proceso cíclico que se inicia con la polaridad de las células (Ridley et al., 2003). Dicha polarización se ve favorecida por

señales externas que incluyen factores quimiotácticos, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular que pueden determinar además la dirección de la migración celular (Forsberg-Nilsson et al., 1998). La migración celular es crucial para muchos procesos biológicos como la morfogénesis, la respuesta inmune, la reparación de tejidos y la metástasis en procesos patológicos como el cáncer (Friedl y Gilmour, 2009). Existen dos tipos de migración celular, la migración de células individuales y la migración de células en colectivo. La migración individual permite a las células posicionarse en los tejidos, como ocurre durante la morfogénesis y el cáncer, o el paso transitorio a través de tejidos de las células inmunes (Ridley et al., 2003). La migración en colectivo permite a las células permanecer unidas mientras se mueven, lo que resulta en la migración en grupo, y ocurre principalmente durante la embriogénesis conduciendo a la formación de múltiples órganos y tejidos (Friedl y Gilmour, 2009). El proceso de migración celular ha sido dividido en tres etapas que incluyen la polarización, protrusión y adhesión celular.

Para que una célula migre tiene que estar polarizada, lo que quiere decir que las estructuras intracelulares son diferentes en la superficie apical y en la superficie basal; de no ser así las células se moverían en todas las direcciones al mismo tiempo (Ridley et al., 2003). El establecimiento y el mantenimiento de esta polaridad es mediado por retroalimentación positiva de moléculas como Rho GTPasa, fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ que se expresan en MSC (Chamberlain et al. 2007). La protrusión celular se refiere a la capacidad de la membrana celular de desplazarse hacia adelante o sobresalir fuera de sus límites normales, de forma fisiológica o patológica (Masuzzo y Martens, 2015). Una vez que la célula recibe la señal de factores quimiotácticos, comienza el proceso de protrusión celular, en el cual participan filamentos de actina, que al ser polarizados intrínsecamente permiten conducir la protrusión de la membrana (Ridley et al., 2003). La organización de los filamentos de actina, depende del tipo de protrusión de la membrana. En los lamelipodios forman una red de ramificación, mientras que en los filopodios se forman haces paralelos (Sobczak et al., 2016). La función de los lamelipodios es determinar la dirección de la migración celular, creciendo en esa dirección,

mientras que la función de los filopodios es servir como sensores y explorar el entorno local de las células (Ridley et al., 2003).

Para que se produzca la migración, las protuberancias deben estar formadas y tener la capacidad de unirse a su entorno; esta capacidad se da por una familia importante de receptores involucrados en la migración celular conocidas como integrinas (Ridley et al., 2003). Las integrinas actúan como “pies” de las células mediante la adhesión a la matriz extracelular (ECM) por medio de proteínas especializadas como fibronectina y laminina, así como también a otras células (Tharmalingam y Hampson, 2016). Las integrinas conectan la matriz extracelular al citoesqueleto intracelular, sirviendo como sitios de tracción por donde las células se mueven (Tharmalingam y Hampson, 2016). Las células adheridas en migración poseen la propiedad de separarse del sustrato, ejerciendo tracción y determinando una velocidad de migración en función de la fuerza de adhesión de la célula a la ECM (Ridley et al., 2003). Esta adhesión está determinada por la densidad de adhesión de los ligandos, de los receptores en la célula y por la afinidad de estos receptores por sus ligandos (Lauffenburger y Horwitz, 1996). El ciclo de migración celular se completa cuando se desmontan las adherencias y la célula llega a su destino (Ridley et al., 2003).

Potencial de migración de las MSC

Una de las cualidades más relevantes de las MSC es su capacidad de migrar hacia áreas lesionadas propiedad conocida como “homing” (Baek et al., 2011). Sin embargo, puede que esta capacidad se de exclusivamente en MSC que están relativamente cerca al área de lesión, actuando en esta y sus alrededores (Nowakowski et al., 2016). Actualmente, la terapia con MSC se hace principalmente por medio de inoculaciones locales en el área afectada, con el fin que las células migren y actúen localmente (Nowakowski et al., 2016). Otra vía de administración es la inyección intravascular; a pesar que este método es poco invasivo, se ha visto que no hay una amplia migración hacia las áreas lesionadas, ya que las MSC se pueden distribuir en distintos sitios del organismo y ser

secuestradas, especialmente en los capilares pulmonares (Nowakowski et al., 2016).

El potencial migratorio de las MSC es mediado por factores reguladores como Rho, proteína que pertenece a la familia de las GTPasas (Vertelov et al., 2013). La familia de GTPasas monoméricas se divide en cinco grupos, tales como Ras, Rho, Rab, Arf y Ran (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Sin embargo, la función de Rho es la de regular actina y la formación, adhesión, organización y control de lamelipodios y filopodios (Ridley et al., 2003). Se ha visto que Rho controla la activación del citoesqueleto en muchas células adherentes, incluyendo las MSC (Vertelov et al., 2013). Para que Rho se haga funcional necesita ser activado por una variedad de moléculas como ciertos factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de adhesión, hormonas, integrinas y otras moléculas biológicamente activas (Loirand et al., 2006). Se ha demostrado que Rho GTPasa puede aumentar la capacidad de respuesta de las MSC a estímulos fisiológicos, lo que implica un cambio en el estado de activación del citoesqueleto de actina y puede convertir una señal que no induce quimiotaxis de las MSC en una señal que estimula su migración (Jaganathan et al., 2007).

La propiedad de homing de las MSC ha potenciado su utilización para fines terapéuticos en la reparación de tejidos (Miller, 2016). La secuencia de pasos involucrados en el homing incluyen la activación, adhesión, extravasación y transmigración, etapas que son similares a las empleadas por linfocitos para migrar hacia sitios de inflamación (Marquez-Curtis y Janowska-Wieczorek, 2013). En ensayos *in vitro*, se ha visto que las MSC migran en respuesta a varios factores quimiotácticos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1), la quimiocina secretada y expresada por linfocitos T normales regulada por activación (RANTES), la quimiocina derivada de macrófagos (MDC), el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Eggenhofer et al., 2014). La lesión tisular e inflamación estimulan la secreción de varios factores de crecimiento y quimiocinas como las mencionadas anteriormente, sin embargo, se ha observado que en las MSC hay una alta

expresión del receptor de SDF-1, denominado CXCR4 (Marquez-Curtis y Janowska-Wieczorek, 2016). En este sentido, hay evidencia que apoya la premisa de que la quimiocina SDF-1, también conocida como CXCL12, es crítica en la movilización, migración y homing de las MSC (Marquez-Curtis y Janowska-Wieczorek 2016).

Un estudio realizado en ratones como modelo animal de rinitis alérgica, demostró la capacidad de homing de MSC de tejido adiposo (MSC-TA) al ser administradas por vía intravenosa (Cho et al., 2009). Este estudio demostró que las MSC-TA trasplantadas pudieron migrar a la mucosa nasal de ratones con rinitis alérgica, ejerciendo efectos inmunomodulares que se caracterizaron por la inhibición de la inflamación eosinofílica de la mucosa nasal. En otro estudio se evaluó la capacidad de homing de MSC-TA equinas, luego de su inyección intrauterina en yeguas con endometriosis (Mambelli et al., 2014). En un período posterior a 7 días post administración, se pudo observar la presencia de MSC-TA en biopsias uterinas de la mayoría de las yeguas en estudio, excepto en uno de los ejemplares que presentaba endometriosis degenerativa crónica. De esta manera, se evidenció la capacidad de homing de MSC-TA en equinos y adicionalmente se determinó que yeguas tratadas con estas MSC tuvieron una recuperación significativa del epitelio glandular. Sin embargo, en la actualidad no existe información disponible acerca de la dinámica de migración en MSC bovinas, lo que permitiría conocer su potencial uso terapéutico.

Ensayos *in vitro* de migración celular

El ensayo de “scratch” o de rasguño corresponde a una prueba *in vitro* para la evaluación del potencial de migración celular (Liang et al., 2007). Este ensayo consiste en el cultivo en monocapa de células bajo condiciones *in vitro* y la posterior realización de una rasgadura artificial o scratch mediante el arrastre de un elemento agudo para separar la monocapa celular sobre la superficie de la placa de cultivo. Luego de un período de cultivo, las células migrarán hacia el scratch y la superficie de desplazamiento es cuantificada mediante la captura de imágenes, en un proceso que puede variar de horas o días dependiendo del tipo celular utilizado (Liang et al., 2007). Una de las principales ventajas de este

método es que imita la migración celular *in vivo*, que es inducida, por ejemplo, durante la migración de MSC hacia el sitio de lesión (Justus et al., 2014). Otra ventaja de este ensayo *in vitro*, es su precisión para estudiar la regulación de la migración celular, mediante la determinación del efecto de factores paracrinós, la observación de la interacción celular con la matriz extracelular y por la interacción célula-célula (Liang et al., 2007). Mediante este ensayo se ha evaluado previamente el potencial migratorio de muchas líneas celulares como células cancerígenas mesenquimales y epiteliales, queratinocitos, células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos (Liang et al., 2007).

El ensayo de “transwell” es otra forma de medir la migración celular *in vitro*, y consiste en un sistema de cultivo con dos cámaras separadas por una membrana porosa, a través de la cual se produce o no la migración celular (Kramer et al., 2013). Las células se siembran en la cámara superior y eventualmente en respuesta a un estímulo migrarán a través de la membrana porosa hacia la cámara inferior, la que contendrá el estímulo quimiotáctico (Kramer et al. 2013); Senger et al., 2002). En el primer análisis cuantitativo, las células que atravesaron la membrana pueden ser fijadas en ésta, teñidas y cuantificadas. Alternativamente, las células pueden ser marcadas con una sonda fluorescente para su rastreo y posteriormente cuantificadas por citometría de flujo (Kramer et al., 2013). El ensayo de migración transwell es adecuado para muchos tipos de células, incluyendo las MSC (Harisi et al., 2009). Las ventajas de este ensayo son la disponibilidad de estudiar diferentes líneas celulares, la facilidad relativa de su metodología y la poca cantidad de medio, citoquinas o factores atrayentes requeridos para efectuar un estímulo quimiotáctico. Por otra parte, la mayor desventaja de esta técnica es la determinación del tiempo óptimo para el conteo de células que atraviesan la membrana, el cual debe ser predeterminado para cada línea celular en forma específica (Kramer et al., 2013).

Capacidad de angiogénesis de las MSC

La angiogénesis se define como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, proceso fundamental durante la embriogénesis, maduración cardiovascular y reparación y regeneración tisular

(Schmidt y Carmeliet 2010). La angiogénesis es distinta a la vasculogénesis, ya que esta última representa el crecimiento y diferenciación de vasos sanguíneos a partir de hemangioblastos derivados del mesodermo, dando origen a importantes órganos como el corazón (Schmidt y Carmeliet 2010). La neovascularización es crucial en procesos de reparación de tejidos, ya que, se encarga de sostener el tejido de granulación recién formado y estimula la supervivencia de queratinocitos (Wu et al. 2007). Se ha demostrado que las MSC, participan en el proceso de angiogénesis, a través de la secreción de varios factores de crecimiento y citoquinas, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Jia et al. 2016).

La regeneración vascular ideal debe incluir la restauración de la vasculatura original, la corrección de la disfunción vascular y el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (Sahoo et al. 2015). Las MSC liberan múltiples factores de crecimiento y citoquinas como SDF-1 y VEGF, y también proveen un microambiente para la angiogénesis y la regeneración de tejido (Dong y Caplan 2012). Se ha demostrado que MSC transplantadas secretan VEGF que induce la formación de vasos sanguíneos y SDF-1 que induce la migración de MSC-MO al sitio de la herida (Dong et al. 2012). Estos autores demostraron que la liberación de SDF-1 por parte de las MSC lleva al reclutamiento de células progenitoras cardíacas que son capaces de liberar cantidades adicionales de SDF-1. Las MSC pueden promover angiogénesis mediante múltiples mecanismos que incluyen quimiotaxis, inserción y disminución de la apoptosis de las células endoteliales (EC), así como el aumento de la actividad mitótica en EC (Burlacu et al. 2013). Estudios realizados recientemente, han demostrado que en condiciones de normoxia o hipoxia, los factores secretados por las MSC estimulan la adhesión de las EC, pero no su proliferación, mientras que los factores secretados por las células progenitoras endoteliales (EPC) estimulan la proliferación de EC pero no mantienen su adhesión (Burlacu et al. 2013).

Como se mencionó anteriormente, las MSC pueden liberar factores de crecimiento y quimiocinas como VEGF y FGF-1, las que estimulan la

angiogénesis y la regeneración tisular (Dong y Caplan 2012). Las MSC también liberan SDF-1, que juega un rol importante en el desarrollo de vasos sanguíneos maduros y en la angiogénesis inducida por las MSC (Tang et al. 2010). Estudios previos han demostrado que SDF-1 puede promover la angiogénesis y el flujo sanguíneo colateral en la isquemia de los miembros (Frangogiannis 2011). Así mismo, SDF-1 puede evitar la proliferación no controlada de EC y evita la generación de vasos hiperpermeables, como los que se observan en angiogénesis inducida por VEGF (Frangogiannis, 2011).

Potenciales de migración y angiogénesis en MSC-MO y MSC-TA

Las distintas poblaciones de MSC comparten muchas características biológicas similares, sin embargo, existen diferencias dependiendo del origen tisular. Como ejemplo, poblaciones de MSC-TA son positivas a CD34, mientras que poblaciones de MSC-MO y MSC de otros orígenes no expresan este marcador (Mosna et al. 2010). Así mismo, se ha observado que las MSC-MO tienen baja capacidad proliferativa, mientras que las MSC de cordón umbilical tienen un mayor potencial de proliferación (Kern et al. 2006). También se ha demostrado que, las MSC aisladas desde pulpa dental tienden a diferenciarse preferentemente en dentina en lugar de hueso, aunque han sido tratadas en iguales condiciones que MSC-MO (Gronthos et al. 2002). El potencial migratorio de las MSC ha sido evaluado en distintos estudios, donde se ha observado que la capacidad migratoria *in vitro* de las MSC-MO y las MSC-TA es similar (Pendleton et al. 2013). A pesar de esto, se ha planteado que las MSC-TA pueden llegar a ser una fuente más eficiente que las MSC-MO, principalmente debido a que el procedimiento de obtención es menos invasivo y a que se encuentran en mayor cantidad en el tejido de origen (Pendleton et al. 2013). En cuanto al análisis de expresión génica se ha observado que las MSC-TA muestran mayor potencial angiogénico comparado con MSC-MO, lo que las podría llevar a ser más eficientes en el tratamiento de patologías cardiovasculares relacionadas con la isquemia (Kim et al. 2007).

Hipótesis

Estudios *in vivo* reportados en varias especies animales han descrito las capacidades de migración y angiogénesis de las MSC en sitios de lesión. Estos potenciales son dependientes de la fuente de origen tisular, por lo tanto, existen diferencias en cuanto a las capacidades de migración y angiogénesis *in vitro* entre MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.

Objetivos

Objetivo general

Comparar los potenciales de migración y angiogénesis *in vitro* de MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.

Objetivos específicos

1. Comparar el potencial de migración *in vitro* de MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.
2. Evaluar el perfil de expresión génica asociado a potencial de migración celular en MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.
3. Comparar el potencial de angiogénesis *in vitro* de MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.
4. Evaluar el perfil de expresión génica asociado a potencial de angiogénesis celular en MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.

Material y métodos

Extracción y cultivo de MSC derivadas de médula ósea fetal bovina

Las MSC fueron aisladas desde MO colectadas desde fetos bovinos de 7 a 9 meses de gestación (n=10) provenientes de una planta faenadora. Los fetos fueron transportados en un contenedor térmico hasta el Laboratorio centralizado de investigación veterinaria (Laciv) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se disecaron los fémures de cada feto y se seccionó la diáfisis utilizando una sierra. La MO fue aspirada desde el espacio medular utilizando una aguja de 18 G conectada a una jeringa con medio de colección (DMEM alto en glucosa, 4500 mg/L D-Glucosa; Hyclone Laboratories) suplementado 100 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomycinina y 100 UI/mL de penicilina. El aspirado de médula se centrifugó dos veces con buffer fosfato salino (PBS) y dos veces en medio de colección a 1000 rpm por 5 minutos. Una vez lavado y centrifugado, el pellet fue suspendido en medio de cultivo compuesto por medio de colección, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Hyclone Laboratories). Posteriormente el pellet fue sembrado en placas para cultivo celular de 100 mm e incubado a 38°C bajo una atmósfera humedecida con 5% de CO₂. Luego de dos días, las células que no estuvieron adheridas fueron extraídas mediante cambio de medio. Para los experimentos posteriores se utilizaron células de 3^{er} y 4^{to} pasaje. El pasaje de las MSC se realizó mediante remoción con tripsina al 50% en PBS por 10 minutos a 38°C. Las MSC fueron teñidas con azul tripán para determinar viabilidad celular y posteriormente fueron contadas utilizando una cámara de Neubauer.

Extracción y cultivo de MSC de tejido adiposo fetal bovino

Se realizó una incisión en la línea media abdominal de los fetos bovinos en un área previamente desinfectada con 70% etanol. El TA se extrajo desde el omento y fue depositado en PBS suplementado con 100 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomycinina y 100 UI/mL de penicilina. Luego, el TA se disgregó enzimáticamente con colagenasa al 5% suplementada con antibiótico

en agitación por 45 minutos a 38°C con 5% CO₂ bajo una atmósfera humedecida. La reacción de la colagenasa fue detenida suplementando medio de colección con SFB. El TA fue posteriormente filtrado utilizando filtros con tamaño de poro de 40 µm (Falcon, Durham, USA) y centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado, dejando el pellet de células que fue luego resuspendido en 10 mL de medio de colección suplementado con 10% de SFB. Posteriormente el pellet fue sembrado en placas para cultivo celular de 100 mm e incubado a 38°C, bajo una atmósfera humedecida conteniendo 5% de CO₂. Luego de dos días, las células que no estuvieron adheridas fueron extraídas mediante cambio de medio. Para los experimentos se utilizaron células de 3^{er} y 4^{to} pasaje. El pasaje de las MSC se realizó mediante remoción con tripsina al 50% por 10 minutos a 38°C. Las MSC fueron teñidas utilizando azul tripán y posteriormente contadas utilizando una cámara de Neubauer.

Extracción y cultivo de fibroblastos fetales bovinos

Se realizó una incisión en la piel de los fetos bovinos, en la zona abdominal o en el pabellón auricular, áreas que fueron previamente desinfectadas con etanol al 70%. Se obtuvieron muestras de dermis de las áreas mencionadas que se depositaron en PBS suplementado con antibiótico. Para la disgregación mecánica del tejido dérmico se utilizaron tijeras estériles y para la disgregación enzimática se utilizó colagenasa al 5% mediante incubación por 90 minutos a 38°C con 5% CO₂, bajo una atmósfera humedecida. La reacción de la colagenasa fue detenida suplementando medio de colección con SFB y el tejido digerido fue filtrado a través de filtros con tamaño de poro de 40 µm (Falcon, Durham, USA) y posteriormente fue centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, dejando el pellet de células, el cual fue resuspendido en 10 mL de medio de colección suplementado con 10% de SFB. Posteriormente el pellet fue sembrado en placas para cultivo celular de 100 mm e incubado a 38°C, bajo una atmósfera humedecida conteniendo 5% de CO₂. Luego de dos días, las células que no estaban adheridas fueron extraídas mediante cambio de medio.

Análisis de migración de MSC mediante ensayo de scratch

El ensayo de scratch se realizó en cultivos de MSC-MO y MSC-TA y en FB fetales bovinos utilizados como control. Aproximadamente 44×10^3 células/cm² fueron sembradas en placas de 24 pocillos e incubadas por 24 horas. En cultivos con confluencia entre 70 y 80% se procedió a arrastrar la punta de una pipeta de 200 µL estéril sobre la superficie de la placa separando la monocapa celular siguiendo una regla previamente desinfectada en referencia a dos puntos demarcados. Posteriormente, los cultivos fueron lavados dos veces con PBS y fotografiados bajo el microscopio al tiempo 0 y luego de 24 h. Las células fueron teñidas en una solución de 0,0025% de azul de coomassie y fueron fijadas con metanol. Para el análisis de migración celular, primero se superpusieron las microfotografías de los dos tiempos, haciéndolas coincidir mediante los puntos de referencia utilizando el software GIMP 2 (GNU, USA, Berkeley). Para el análisis de migración se midió el área del scratch en el tiempo 0 y luego de 24 h. Con las fotografías superpuestas se determinó la diferencia de área entre el tiempo 0 y el tiempo 1 (24 horas después), lo que corresponde al área de migración de las células. Este proceso de análisis se realizó mediante el software ImageJ (NIMH, USA, Maryland) y su herramienta MRI Wound Healing diseñada para el ensayo de cierre de herida.

Análisis de migración mediante ensayo de scratch en MSC marcadas mediante sonda fluorescente CFDA SE

Aproximadamente, 44×10^3 células por cm² fueron sembradas en placas de 24 pocillos e incubadas a 38°C con 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente se procedió a realizar el scratch mediante el arrastre de la punta de una pipeta de 200 µL estéril sobre la superficie de la placa separando la monocapa celular, siguiendo una regla previamente desinfectada en referencia a dos puntos demarcados. Previamente, las MSC fueron incubadas utilizando concentraciones crecientes de la sonda fluorescente CFDA SE (0; 0,5; 5; 10; 15 y 25 µM) por 15 minutos, con el objetivo de determinar la concentración que permitiera generar un mayor grado de fluorescencia y un menor nivel de muerte celular. Mediante este análisis se decidió utilizar una concentración de 25 µM.

Luego de 24 horas se realizó el método de scratch y se tomó la fotografía correspondiente al tiempo 0. El análisis de migración se realizó según lo descrito previamente a las 24 horas posteriores al scratch” (tiempo 1) y se evaluó mediante el software ImageJ (NIMH, USA, Maryland) y su herramienta MRI Wound Healing como fue descrito previamente.

Análisis de migración de MSC mediante ensayo de transwell

La habilidad de las MSC para migrar a través de una membrana porosa bajo la influencia de la quimiocina SDF-1 / CXCL12 (R&D, Minneapolis, USA) fue evaluada mediante el ensayo transwell. Este ensayo se realizó en placas transwell de 24 pocillos provistos con una membrana de policarbonato con poros de 8 μm (Corning, NY, USA). Esta placa consta de dos cámaras: una cámara inferior en la cual se agregaron 500 μL de DMEM suplementado con 60 ng/mL del quimioatrayente SDF-1 (R&D, Minneapolis, USA), además, como control positivo se uso DMEM suplementado con 5% SFB y como control negativo DMEM solo. En la cámara superior se sembraron 25×10^3 células/mL por 24 horas a 38°C en atmósfera humedecida con 5% de CO₂. Luego de 24 horas se procedió a cuantificar las células que atravesaron la membrana, mediante fijación con metanol por 20 minutos y posterior tinción con cristal violeta al 0,1% por 30 minutos. Las células que no atravesaron la membrana fueron removidas utilizando un isopo estéril, posteriormente se separó la membrana mediante un bisturí y se ubicó sobre un portaobjeto. Las células que migraron hacia el lado inferior de la membrana fueron observadas bajo microscopio de contraste de fase equipado con cámara. Las imágenes digitales fueron tomadas con un aumento de 10X y se evaluó la cantidad de células mediante la herramienta “cell counter” del software ImageJ (NIMH).

Extracción y cultivo de células endoteliales derivadas de aorta fetal bovina

Las células endoteliales bovinas fueron extraídas desde la aorta fetal con el objetivo de establecer cultivos primarios para evaluación de la capacidad

angiogénica de las MSC y FB. El procedimiento de extracción de células endoteliales fue realizado según lo descrito previamente desde aorta bovina (Ataollahi et al. 2014). Las aortas fetales bovinas fueron obtenidas desde tres fetos provenientes de una planta faenadora. Mediante incisión en la cavidad torácica se procedió a ubicar la aorta y se obtuvo una sección de ésta, la cual fue inmersa en solución de Ringer Lactato. Se procedió a abrir las aortas longitudinalmente utilizando tijeras, para exposición del endotelio sobre la superficie de una placa petri. Posteriormente se adicionó colagenasa al 0,1% sobre la superficie endotelial mediante goteo y se incubó por 10 minutos. Un hisopo estéril fue arrastrado sobre la superficie del endotelio de cada aorta y posteriormente fue inmersa en medio de cultivo para células endoteliales consistente en DMEM alto en glucosa, (4500 mg/L D-Glucosa; Hyclone Laboratories) suplementado con 10% SFB (Hyclone laboratories), 100 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomycin, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de L-glutamina (Hyclone Laboratories). Las muestras fueron centrifugadas y el pellet de células fue resuspendido en medio de cultivo endotelial, sembrado en botellas de cultivo celular de 25 cm² e incubado a 38°C bajo una atmósfera humedecida conteniendo 5% de CO₂. Luego de dos días, las células no adherentes fueron extraídas mediante cambio de medio.

Análisis de la capacidad angiogénica de MSC mediante ensayo de formación de túbulos de células endoteliales

El potencial angiogénico del medio condicionado de MSC y FB fue evaluado utilizando el ensayo *in vitro* de formación de túbulos de células endoteliales. Para realizar este ensayo, se cultivaron 5x10⁵ células / mL de MSC-MO, MSC-TA y FB en botellas de cultivo de 75 cm² durante 7 días, realizando cambio de medio cada 72 horas. Una vez que alcanzaron 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y se pipetó DMEM sin SFB con el fin de producir medio condicionado. Una vez colectado, el medio condicionado fue concentrado 10 veces mediante centrifugación por 30 minutos a 1800 rpm en filtros Amicon Ultra Centrifugal (Merck Millipore, Tullagreen, Irlanda) y posteriormente fue congelado a -20°C hasta su uso.

Para el ensayo de formación de túbulos se pipetearon 100 μ L de matrigel sin factores de crecimiento (Corning, Bedford, USA) en placas de 24 pocillos para el establecimiento de una matriz de membrana basal. El matrigel fue gelificado a 38°C por 30 minutos. Posteriormente las células endoteliales ($1,8 \times 10^5$ células/pocillo) previamente extraídas fueron sembradas y cultivadas en la parte superior de la membrana gelificada de Matrigel. Luego estas células fueron resuspendidas en el medio concentrado de MSC-MO, MSC-TA y FB y sembradas sobre de la capa de Matrigel. Transcurridas 6 horas de incubación a 38°C, se procedió a cuantificar los túbulos formados, mediante obtención de imágenes digitales obtenidas con aumento de 4x y evaluación mediante software Image J (NIMH).

Análisis de un perfil de expresión de genes asociados a migración celular y angiogénesis en MSC

El potencial de migración y de angiogénesis de MSC-MO y MSC-TA fue evaluado mediante cuantificación de la expresión de un perfil de genes de migración celular (SDF1, CXCR4 y RANTES) y de angiogénesis (ANGPT1 y VEGF), mediante PCR cuantitativo (Q-PCR) (Tabla 1). MSC de 2^{do} pasaje fueron fijadas en buffer RLT suplementado con 1% β -Mercaptoetanol y congeladas a -20°C hasta su procesamiento. El RNA total fue aislado utilizando un kit RNAeasy (Qiagen, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La remoción del DNA genómico, se realizó mediante la digestión con la enzima DNAsa, según el protocolo establecido por el fabricante del kit DNase I (Thermo Scientific, MA, USA). El RNA total fue cuantificado utilizando un kit Qubit RNA HS (Life Technologies, NY, USA). Para la reacción de transcripción inversa se utilizó el kit Brilliant II SYBR Green RT-PCR (Agilent Technologies, CA, EUA). Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando el kit Brilliant SYBR Green Q-PCR Master mix (Stratagene, CA, USA). Cada tubo de reacción contuvo 5 μ L de SyberGreen, 1 μ L primer forward, 1 μ L de primer reverse, 1 μ L de cDNA y 2 μ L de H₂O hasta alcanzar un volumen total de 10 μ L. Se realizó un ciclo para aumentar la temperatura de 95°C por 10 minutos con el fin de activar la DNA polimeraza, seguido de 40 ciclos, cada uno de 30 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C para detectar y reportar la fluorescencia y 3 ciclos adicionales, el

primero a 95°C por 15 segundos, el segundo a 55°C por 15 segundos y el tercero a 95°C por 15 segundos. Para asegurar que los amplicones fueron generados a partir de mRNA y no de la amplificación de ADN genómico, se incluyeron controles sin transcriptasa reversa. La expresión relativa de los marcadores fue calculada en relación a la expresión de los genes endógenos GAPDH y β -ACTINA utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ (C_t : Threshold Value) (Vandesompele et al., 2002).

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron expresados como media y desviación estándar. El modelo estadístico consideró como variable dependiente el porcentaje de migración celular, el número de células que atravesaron la membrana porosa, el número de túbulos formados y la expresión relativa de genes. Las variables independientes fueron las líneas celulares utilizadas (MSC-MO, MSC-TA y FB). Se utilizó un valor de significancia de $p < 0,05$. Los valores fueron analizados estadísticamente por ANOVA de una vía. Las diferencias entre promedios fueron determinadas utilizando el post test de tuckey. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software estadístico InfoStat (Córdoba, Argentina).

Tabla 1. Secuencia de partidores utilizados para cuantificar la expresión génica mediante Q-PCR.

| Gen | Sense | Antisense | Número de Acceso |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Endógenos | | | |
| β – Actina | CGCACCACTGGTATTGTCAT | TCCAAGGCGACGTAGCAGAG | K00622.1 |
| GAPDH | CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA | TGGAAGATGCTGATGGCCTTTCCATTG | NM001034034.2 |
| Migración | | | |
| SDF-1 | GGTCAATGCACACTTGCCTA | CCTTGCCGATTCTTTGAGAG | XM005226618.3 |
| RANTES | AGCAGTTGTCTTTATCACCAGGA | TCCAAAGCGTTGATGTACTCTC | NM175827.2 |
| CXCR4 | TATCGTCCATGCTACCAACA | GAGTCAATGCTGATCCCAAT | NM174301.3 |
| Angiogénesis | | | |
| VEGF | GGCTCCGAGAGGAAGAGG | AAGGCTCCAATGTACCCAAG | NM001316992.1 |
| ANGPT1 | CTCGCTGCTATTCTGACTCAC | GACAGTTACCGTCGTGTTCTG | NM001076797.1 |

Resultados

Análisis de migración de MSC mediante ensayo de scratch

Con el objetivo de determinar la concentración celular óptima de MSC-MO, MSC-TA y FB que permitiera alcanzar un 70 a 80% de confluencia en los cultivos luego de 24 horas de incubación, se procedió a sembrar distintas concentraciones de células (45, 55, 65, 75, 85 y 95 x 10³) en placas de 24 pocillos. Los resultados de este ensayo establecieron que una concentración de 85 x 10³ células por pocillo permiten alcanzar una confluencia de 70 – 80% luego de 24 horas. La capacidad de migración *in vitro* de las MSC-MO, MSC-TA y FB fetales bovinas fue evaluada mediante el ensayo de scratch (Figura 1A), determinándose que las MSC-MO obtuvieron un mayor (P<0,05) valor de migración (68,1% ± 3,5) comparado con los FB (53,6% ± 5,8) fetales bovinos. Sin embargo, el valor de migración de las MSC-TA (62,3% ± 3,0) no fue distinto (P>0,05) comparado con MSC-MO y FB (Figura 1B).

Análisis de migración mediante ensayo de scratch en MSC marcadas mediante sonda fluorescente CFDA SE

Con el objetivo de determinar la concentración de la sonda CFDA SE que permitiera un mayor nivel de fluorescencia y un menor grado de muerte celular, se procedió a evaluar el efecto de distintas concentraciones (0; 0,5; 5; 10; 15 y 25 µM) sobre cultivos de MSC-MO, MSC-TA y FB (Figura 2). La mayor intensidad de fluorescencia en todas las líneas celulares fue alcanzada al utilizar una concentración de 25µM de CFDA SE.

Posteriormente, la capacidad de migración de las MSC y FB marcadas con fluorescencia CFDA SE (25 µM) fue evaluada utilizando el ensayo de scratch. Los valores de migración para cada línea celular fueron de 26,1% ± 5,25, 18,5% ± 2,46 y 20.8% ± 5,14 para MSC-MO, MSC-TA y FB, respectivamente (Figura 3). No se detectaron diferencias significativas en valores de migración entre líneas celulares marcadas con fluorescencia.

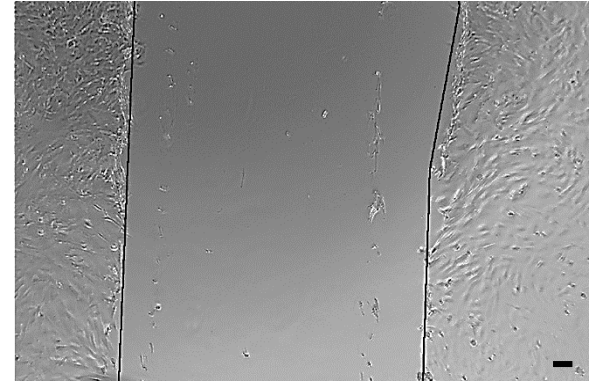
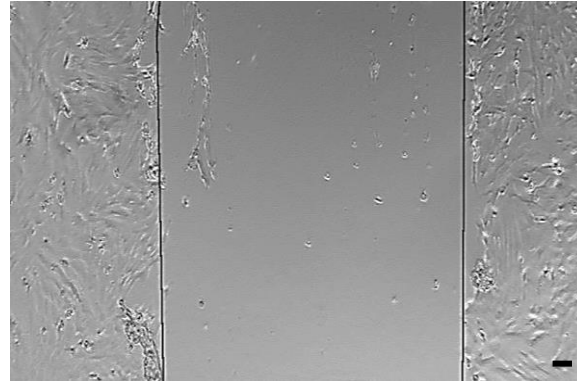
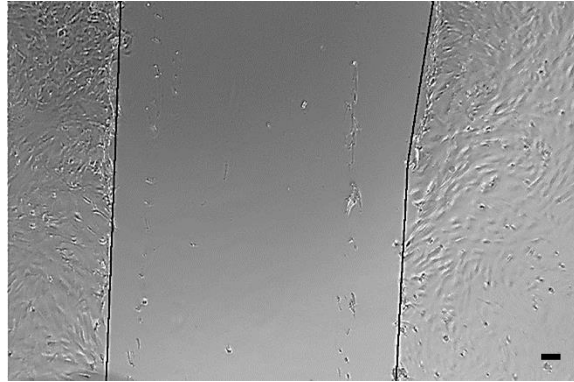
A.

MSC-MO

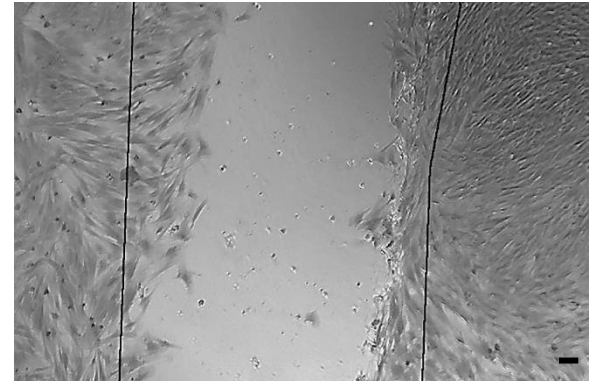
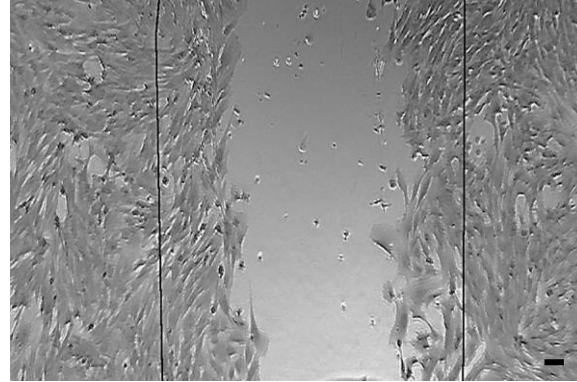
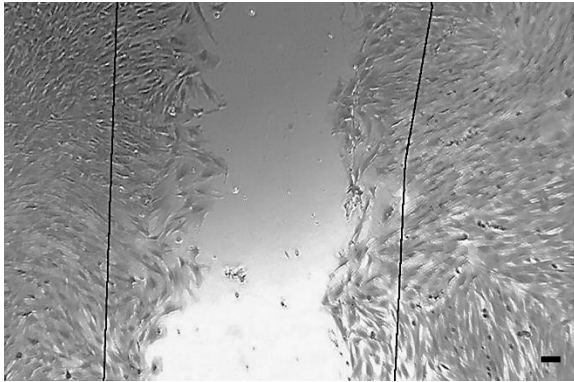
MSC-TA

FB

0 h



24 h



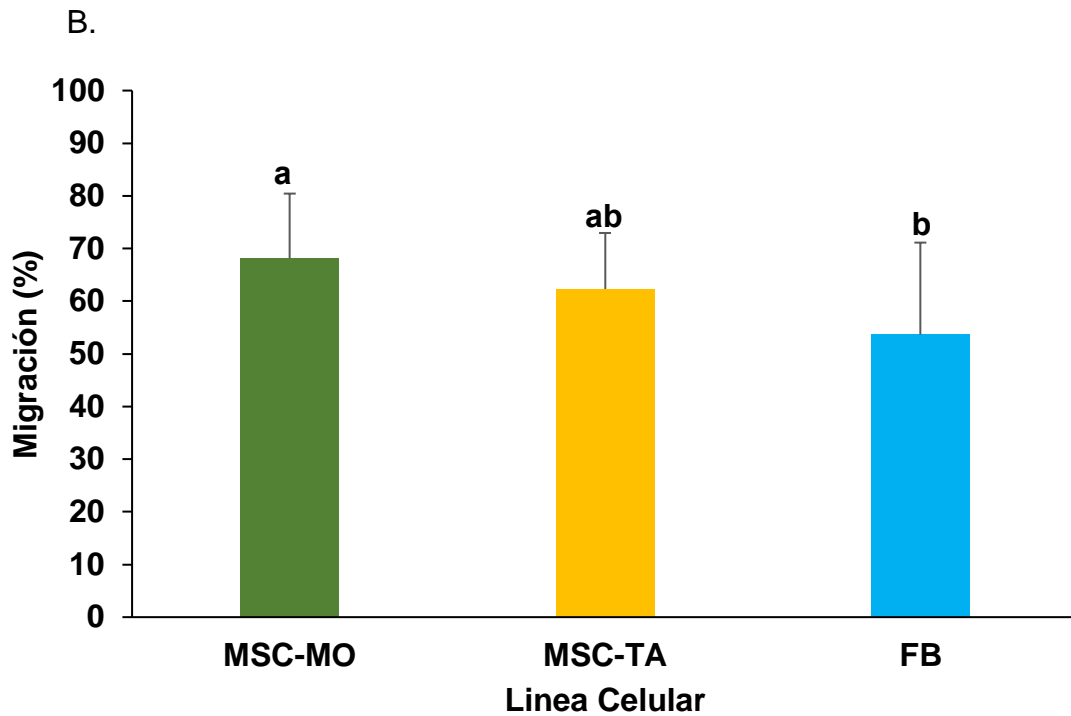


Figura 1. Potencial de migración *in vitro* de MSC-MO, MSC-TA y FB evaluado mediante ensayo de scratch. A. Microfotografías de las distintas líneas celulares evaluadas mediante el ensayo *in vitro* de scratch. B. Cuantificación del potencial de migración *in vitro* de las líneas celulares mediante el ensayo scratch. Las MSC-MO obtuvieron un mayor ($P < 0,05$) valor de migración ($68,1\% \pm 3,5$) comparado con los FB ($53,6\% \pm 5,8$) fetales bovinos. Superíndices distintos (a,b) indican diferencias significativas $p < 0,05$. Barra de escala: $100\mu\text{m}$.

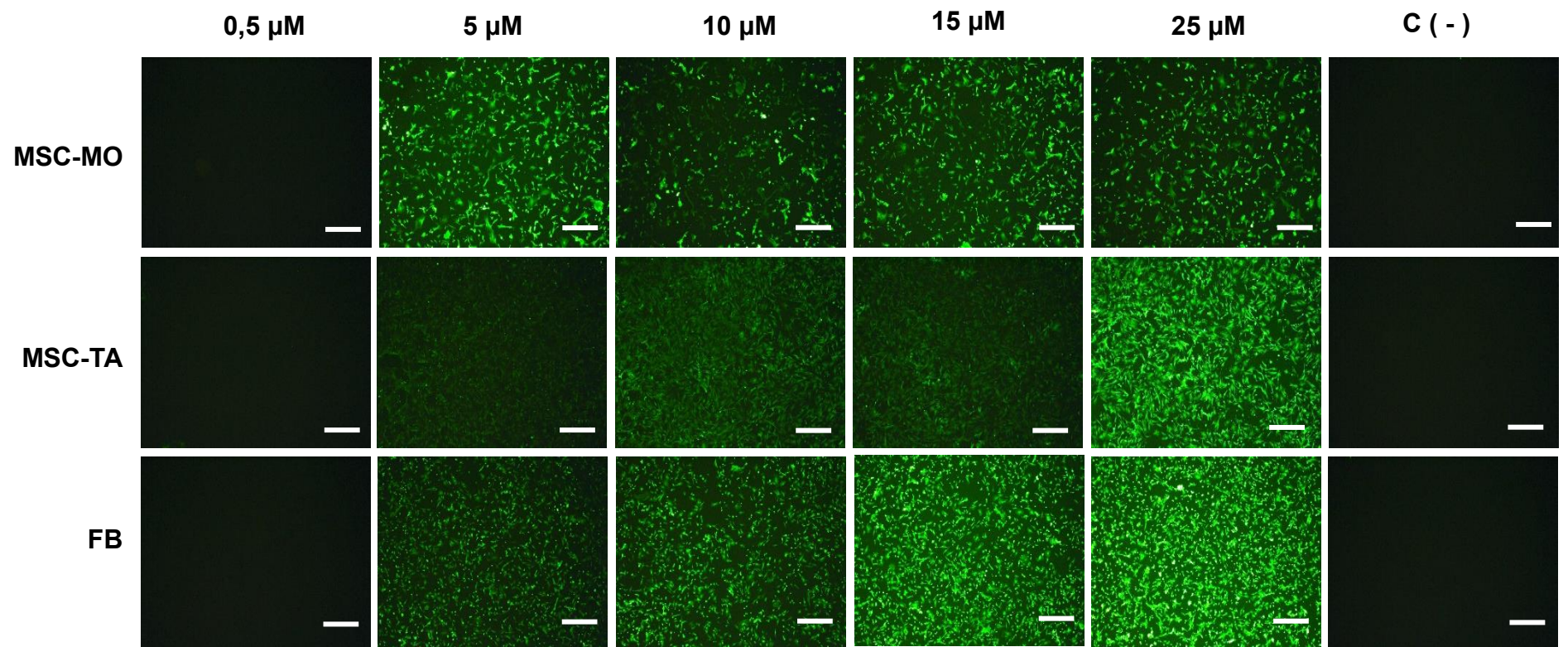


Figura 2. Efecto dosis - respuesta de la sonda fluorescente CFDA SE en cultivos de MSC-MO, MSC-TA y FB. Cada línea celular fue incubada con concentraciones crecientes de CFDA SE por 24 horas. Se determinó que la mayor intensidad de fluorescencia fue alcanzada al utilizar 25 μ M de CFDA SE. C(-): control negativo. Barra de escala 500 μ M.

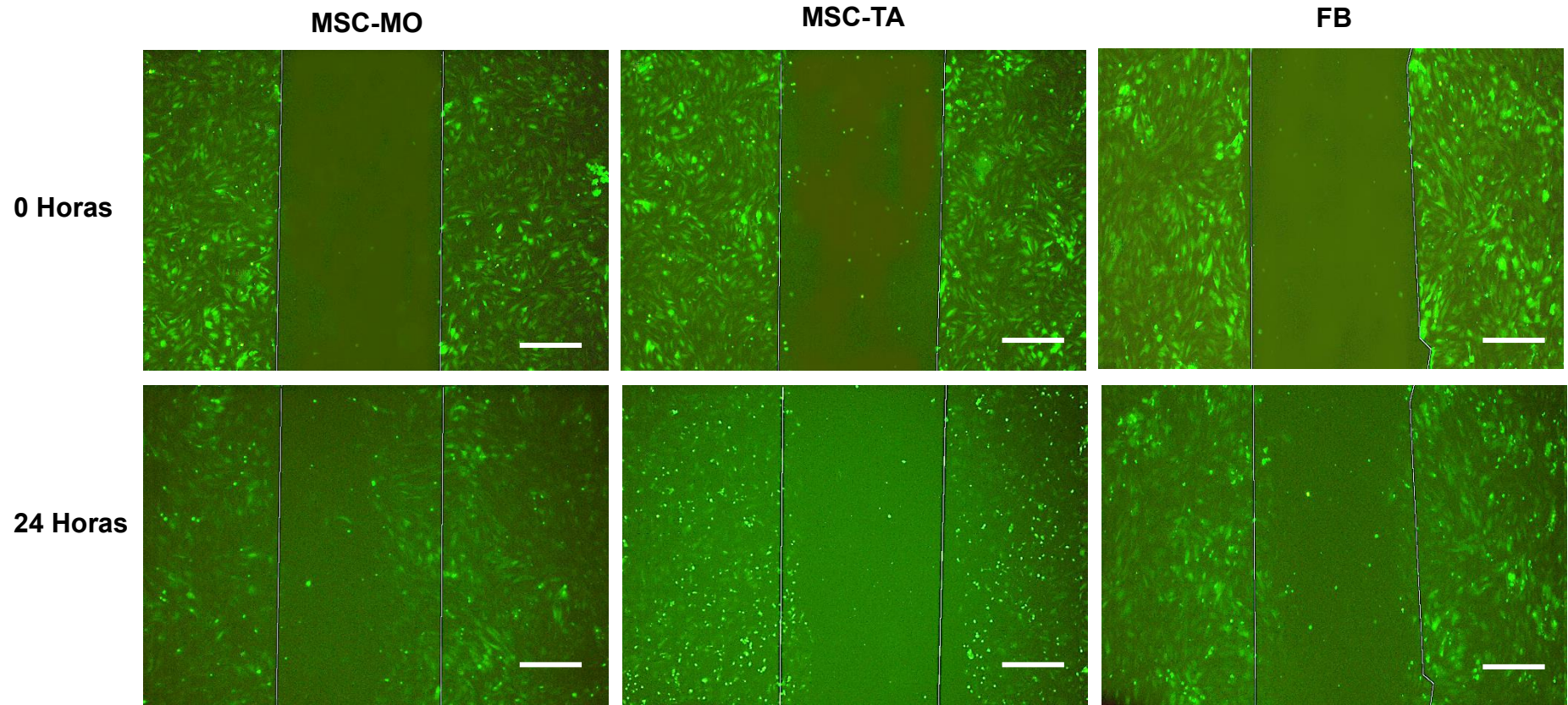
Análisis de migración de MSC mediante ensayo Transwell

La capacidad de migración de las MSC y FB fue posteriormente evaluada mediante el ensayo transwell bajo la influencia del quimioatrayente SDF-1 y como controles, se utilizó DMEM suplementado con 5% SFB y DMEM sin suplementación (Figura 4). La población de células migrantes fue teñida utilizando cristal violeta y contabilizada mediante el software image J (Figura 4A). El mayor ($P < 0,05$) número de células migrantes fue detectado en cultivos tratados con DMEM suplementado con 5% de SFB (MSC-MO=284,3 \pm 52,7; MSC-TA=389,3 \pm 58,7 y FB=295,7 \pm 75,0) (Figura 4B). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el número de células migrantes entre líneas celulares.

Análisis de un perfil de expresión de genes asociados a migración en MSC

El análisis de la expresión de genes asociados a migración celular fue realizado mediante Q-PCR en MSC-MO, MSC-TA y FB. En el análisis de expresión relativa se determinó que los niveles de mRNA de SDF-1 fueron mayores ($P < 0,05$) en MSC-TA comparado con MSC-MO y FB (16,7 y 0,6 veces la expresión de FB, respectivamente). En forma similar, los niveles de mRNA de RANTES fueron mayores ($P < 0,05$) en MSC-TA (5,8 veces) comparado con FB. En el caso de los niveles de CXCR4 no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$), entre MSC-MO, MSC-TA y FB (Figura 5).

A.



B.

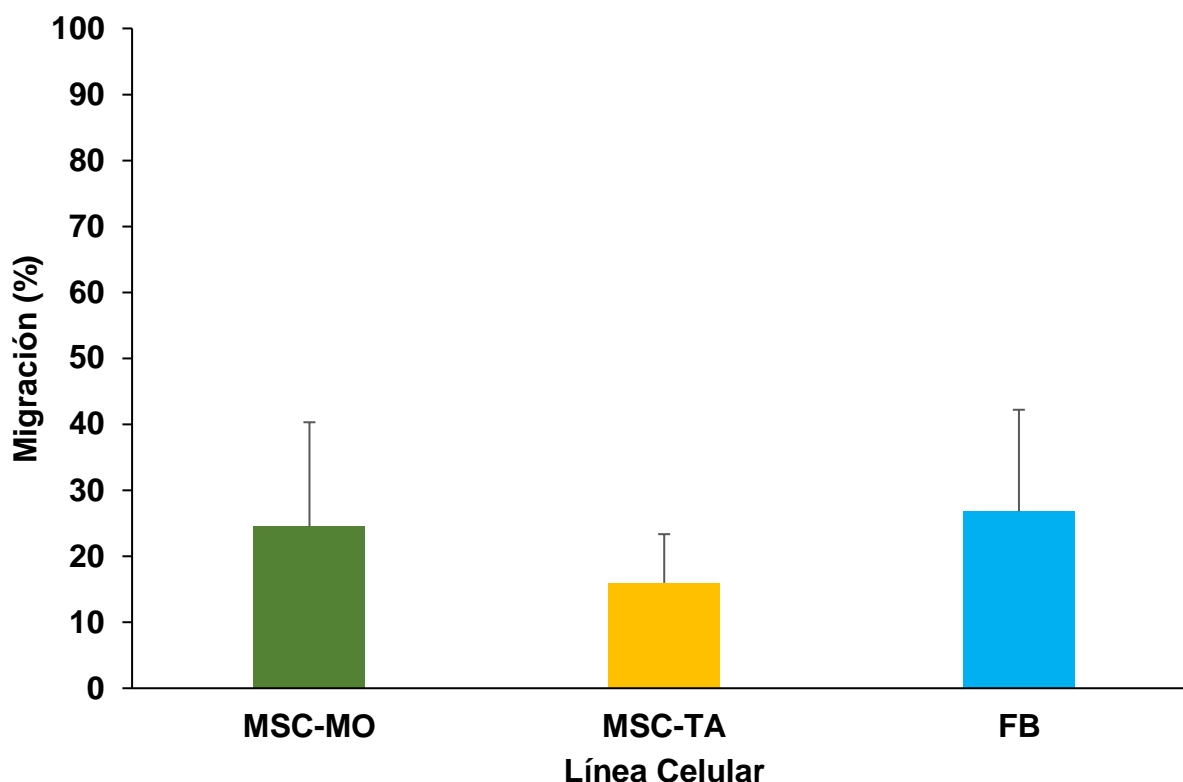
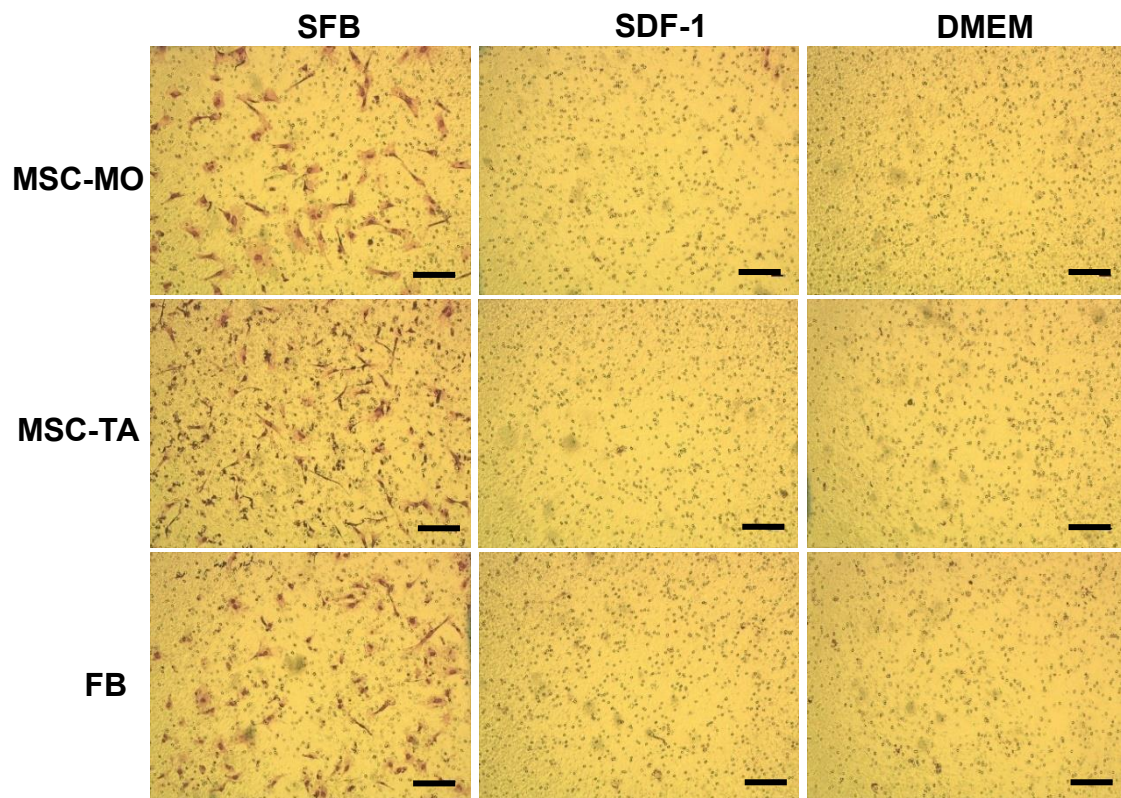


Figura 3. Potencial de migración *in vitro* mediante ensayo scratch en células marcadas con sonda fluorescente CFDA SE. A. Microfotografías de las distintas líneas celulares evaluadas mediante el ensayo *in vitro* de scratch y la sonda fluorescente CFDA SE. B. No se detectaron diferencias significativas en valores de migración entre líneas celulares marcadas con fluorescencia. Barra de escala: 500 μ m.

Análisis de la capacidad angiogénica de MSC mediante ensayo de formación de túbulos de células endoteliales

El potencial angiogénico del medio condicionado de MSC-TA, MSC-MO y FB fue evaluado mediante el ensayo de formación de túbulos, utilizando células endoteliales fetales bovinas (Figura 6). El medio condicionado concentrado de MSC-TA indujo la formación de un mayor ($P < 0,05$) número de túbulos ($56,7 \pm 2,2$) tras 6 horas de incubación comparado con el medio condicionado de MSC-MO ($38,3 \pm 3,0$), FB ($21,7 \pm 2,7$) y los controles de DMEM suplementado con 5% de SFB ($21,3 \pm 2,0$) y DMEM solo ($17,0 \pm 1,2$) (Figura 6A y B).

A.



B.

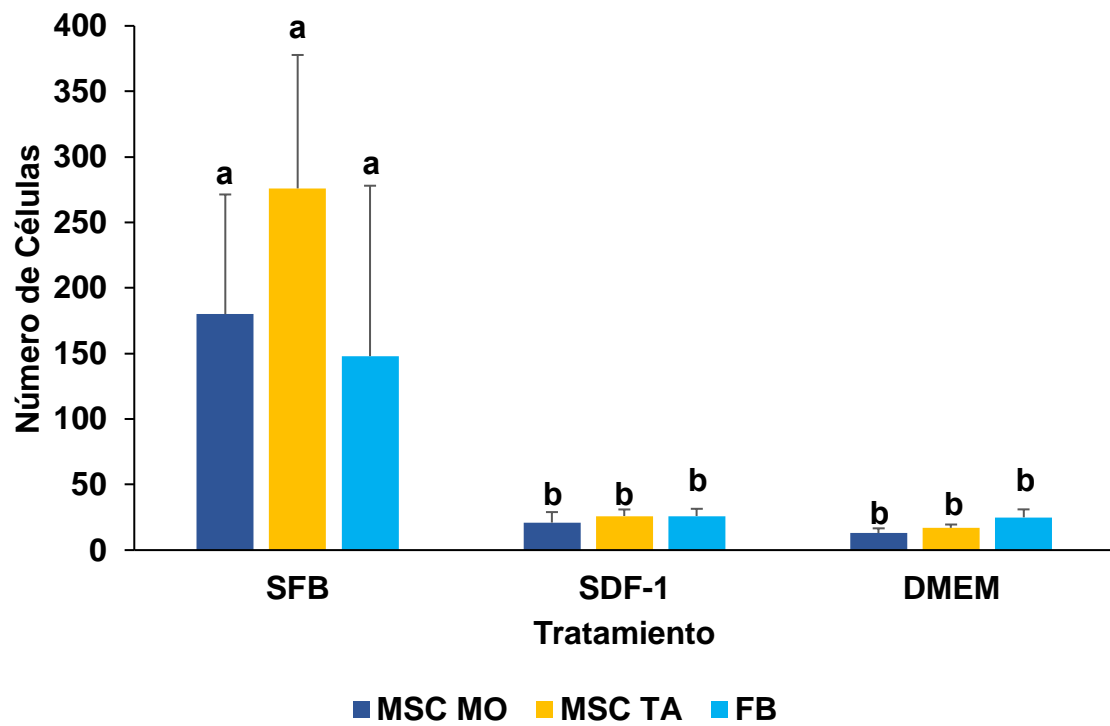


Figura 4. Análisis de transwell para determinación del potencial de migración de MSC-MO, MSC-TA y FB. A. Microfotografías de las poblaciones celulares migraron migrantes en el ensayo de transwell bajo el efecto de SDF-1 y SFB. B. Número de células en poblaciones migrantes para cada línea celular bajo efecto de SDF-1 y 5% SFB. El mayor ($P < 0,05$) número de células migrantes fue detectado en cultivos tratados con DMEM suplementado con 5% de SFB. Superíndices distintos (a,b) indican diferencias significativas $p < 0,05$. Barra de escala: 500 μm

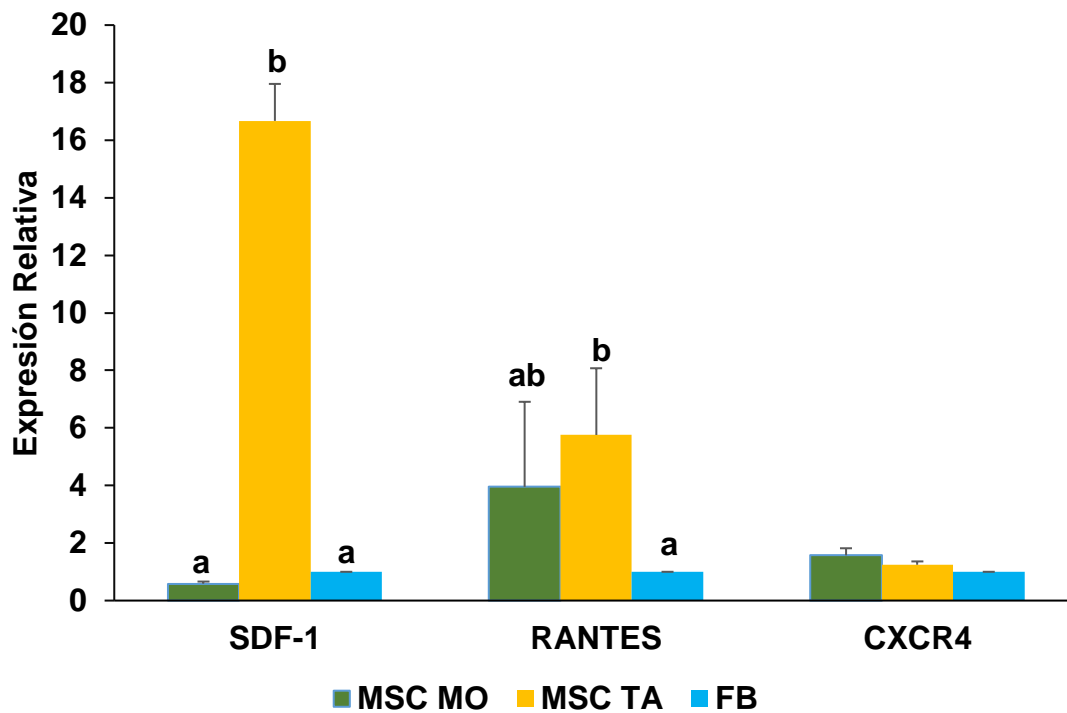


Figura 5. Cuantificación de los niveles de mRNA de genes asociados a migración en MSC-MO, MSC-TA y FB. Los niveles de mRNA de SDF-1 fueron mayores ($P < 0,05$) en MSC-TA comparado con MSC-MO y FB. Los niveles de mRNA de RANTES fueron mayores ($P < 0,05$) en MSC-TA comparado con FB. En el caso de CXCR4 no se detectaron diferencias de expresión entre MSC-MO, MSC-TA y FB. Superíndices distintos (a,b) indican diferencias significativas para cada gen ($p < 0,05$).

A.

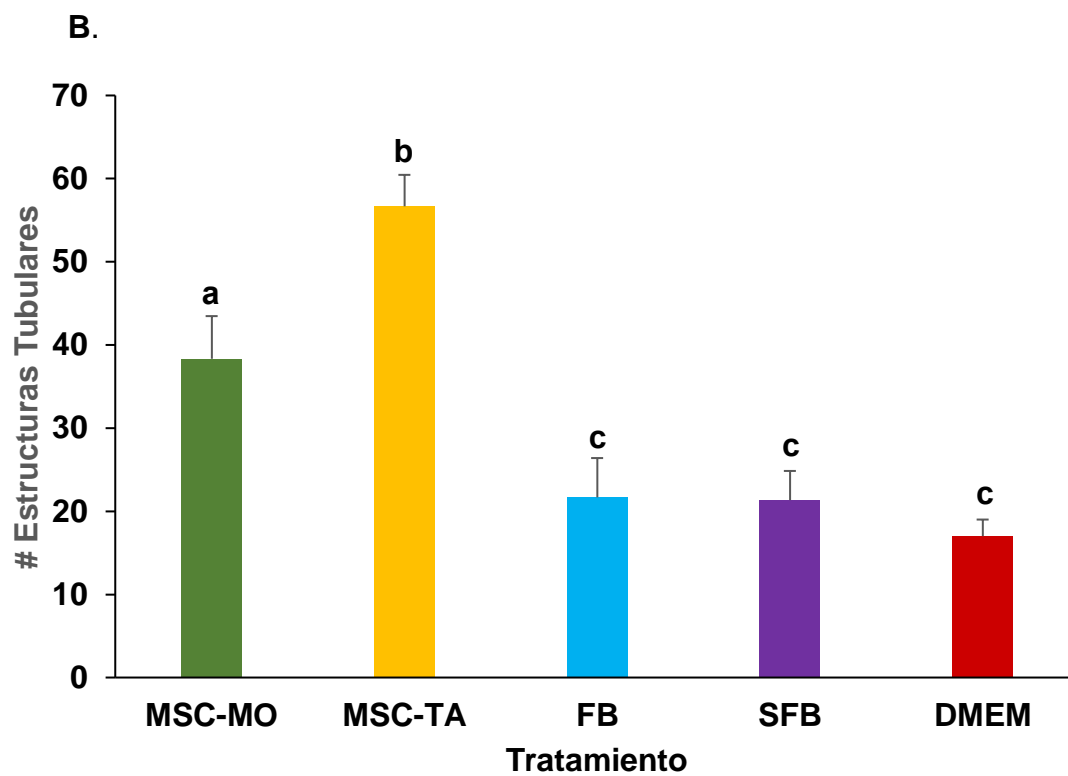
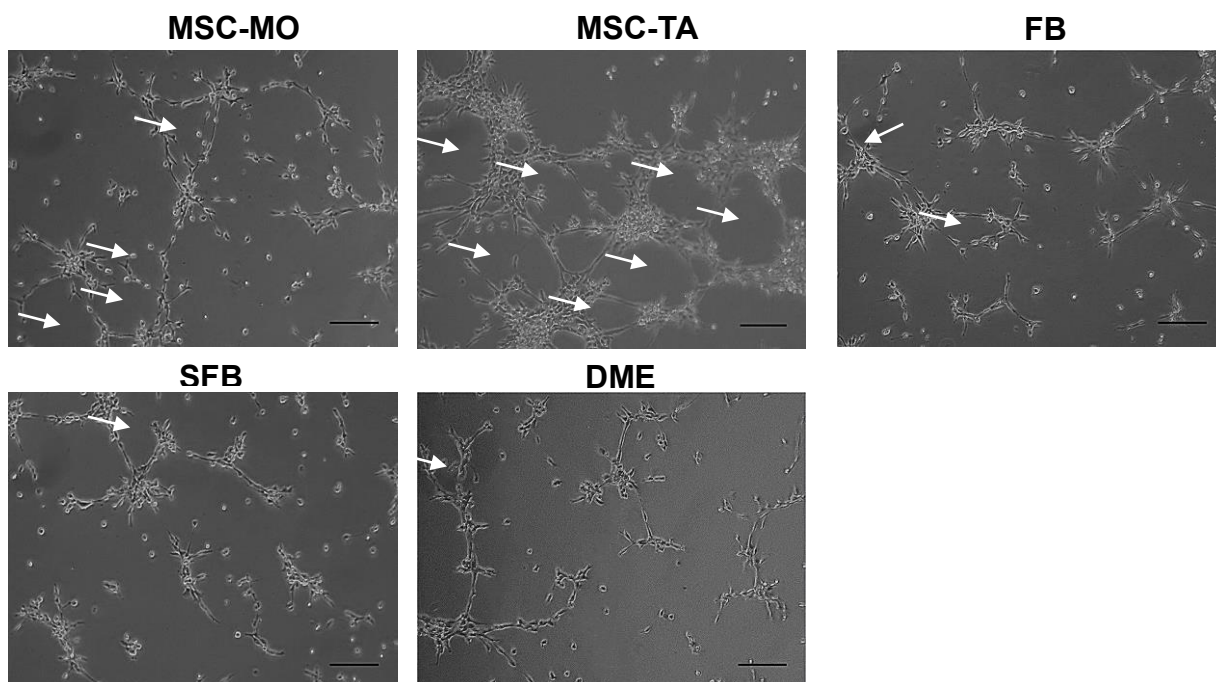


Figura 6. Análisis de Angiogénesis mediante ensayo de formación de túbulos en MSC-MO, MSC-TA y FB. **A.** Microfotografía del ensayo de formación de túbulos de células endoteliales, expuestas a medio condicionado concentrado de MSC-MO, MSC-TA por 6 horas. **B.** Cuantificación del número de túbulos formados en células endoteliales, expuestas a medio condicionado concentrado de MSC-MO, MSC-TA por 6 horas. El mayor número de estructuras tubulares se observó con medio condicionado de MSC-TA. En cuanto al medio condicionado de FB, SFB y DMEM sus resultados no difieren en cuanto a inducción de formación de estructuras tubulares. Superíndices distintos (a,b,c) indican diferencias significativas $p < 0,05$. Barra de escala: $100\mu\text{m}$

Análisis de un perfil de expresión de genes asociados a angiogénesis en MSC

El análisis de la expresión de genes relacionados por angiogénesis se realizó mediante Q-PCR en MSC-MO, MSC-TA y FB (Figura 7).

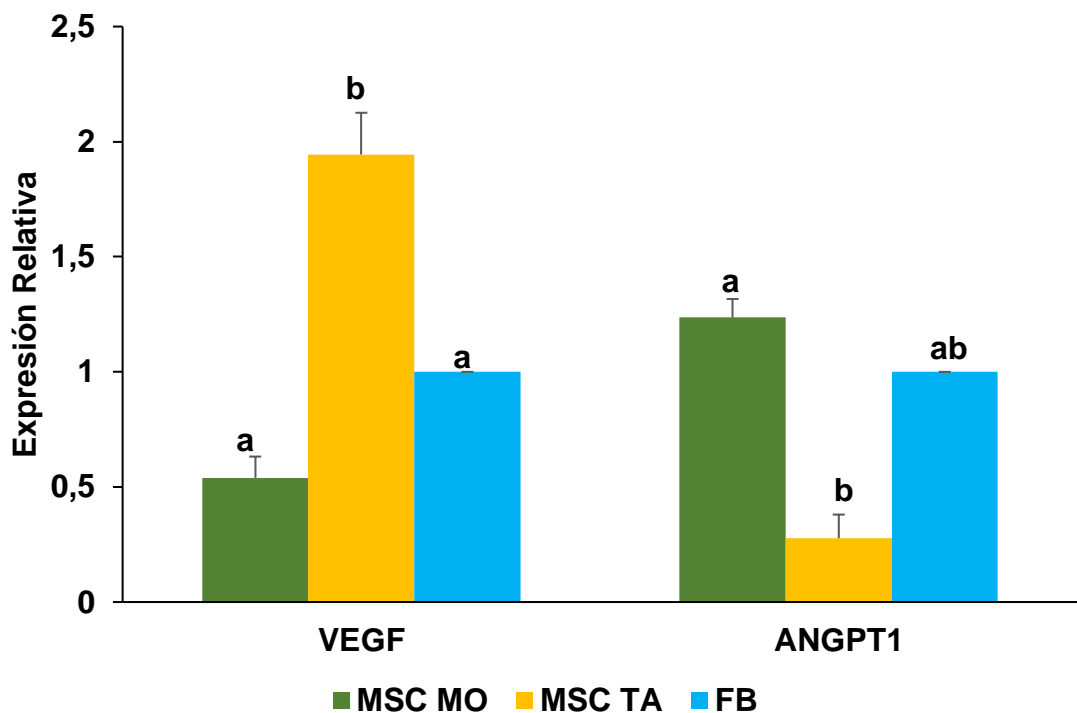


Figura 7. Cuantificación de los niveles de mRNA de genes asociados a angiogénesis. MSC-TA expresaron mayores ($P < 0,05$) niveles de mRNA de VEGF comparado con MSC-MO y FB (1,94 y 0,54 veces la expresión de FB

respectivamente). En el caso de ANGPT1 la expresión relativa de los niveles de mRNA fue mayor en MSC-MO y FB comparado con MSC-TA (1,23 y 0,27 veces la expresión de FB, respectivamente). Superíndices distintos (a,b,c) indican diferencias significativas para cada gen ($p < 0,05$).

Discusión

En el presente estudio, se aislaron MSC desde MO, TA y se obtuvieron FB desde fetos bovinos con el objetivo de comparar su potencial de migración y angiogénesis. Dado que la migración celular es considerada uno de los mecanismos por el cual las MSC pueden inducir su efecto terapéutico en tejidos, es esencial determinar el potencial de migración *in vitro* de MSC derivadas desde distintas fuentes tisulares. El ensayo de scratch es comúnmente utilizado para analizar migración celular *in vitro*, ya que permite imitar el desplazamiento tridimensional de las células durante la migración *in vivo* (Liang et al. 2007).

Utilizando esta técnica, se determinó que no existen diferencias significativas en el potencial de migración *in vitro* entre MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas. Sin embargo; se observó que MSC-MO tienen mayor capacidad de migración que FB. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores donde se determinó que no existen diferencias en cuanto a la capacidad de migrar entre MSC-MO y MSC-TA humanas (Najar et al. 2013). Este potencial migratorio similar puede deberse a que MSC-MO y MSC-TA derivan de la misma capa germinal mesodérmica por lo que comparten muchas características biológicas, que incluyen la expresión de marcadores de superficie y su capacidad de diferenciación (Strioga et al. 2012). Adicionalmente, el ensayo de transwell fue utilizado para comparar el potencial de migración de MSC-MO y MSC-TA bajo la influencia del quimioatrayente SDF-1. En forma similar, mediante esta técnica se determinó que no existen diferencias en cuanto a potenciales de migración entre MSC-MO y MSC-TA. Además, SDF-1 no indujo un aumento en la capacidad de migración de MSC comparado con el control positivo (MSC suplementado con 5% SFB). Estudios anteriores han evaluado la respuesta de MSC humanas derivadas de cordón umbilical hacia concentraciones crecientes de SDF-1 determinándose que una concentración de 100 ng/mL generaba mayor porcentaje de migración en relación a otras concentraciones de este factor (Marquez-curtis y Janowska-wieczorek 2016). Esto nos sugiere que el efecto migratorio de SDF-1 es dependiente de la dosis y que la concentración utilizada en el presente estudio (60 ng/mL) pudo haber sido insuficiente para estimular la migración. Por otro lado se ha reportado que el efecto estimulador de la

migración de SDF-1 puede ser menor comparado con otras citoquinas como MDC y RANTES (Ponte et al. 2007). El mayor efecto quimioatrayente del SFB puede deberse a su compleja composición en la que están incluidos moléculas como el factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF2), el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF1), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el factor neutrófico derivado de la glia (GGF) y factor de crecimiento ligado a la insulina tipo 4 (IBP4), entre otros (Zheng et al. 2006). Estos factores han sido reportados como importantes estimulantes de la migración en MSC (Baek et al. 2011).

Se ha reportado que la capacidad de migración y de homing se da exclusivamente en MSC que están relativamente cerca al área lesionada (Nowakowski et al. 2016). Así mismo, el homing de las MSC hacia los sitios diana, depende de la habilidad de estas células para migrar y para interactuar con el microambiente en el que actúan (Trinh et al. 2016). Considerando que la evaluación de la capacidad de migración *in vivo* depende de su rastreo mediante la utilización de sondas fluorescentes, es que en el presente estudio se procedió a evaluar la capacidad de las MSC fetales bovinas para retener una sonda fluorescente CFDA SE durante el proceso de migración. En este sentido, el método de scratch permitió determinar que la sonda CFDA SE a una concentración de 25 μ M permanece en la célula luego de 24 hrs pero disminuye (~40%) su capacidad de migración *in vitro* en comparación con MSC no marcadas con la sonda. El sistema CFDA SE se basa en una sonda permeable a la membrana celular que es dividida por esterasas para formar productos reactivos a aminos que se unen covalentemente a residuos de lisina (agregar referencia). Previamente se ha reportado que la utilización de CFDA SE en MSC humanas reduce la actividad metabólica de estas células, lo que podría explicar la disminución en la capacidad migratoria detectada en nuestro estudio (Polzer et al., 2012). Adicionalmente, es posible que la sonda CFDA SE pierda parte importante de su capacidad fluorescente luego de 24 horas como ha sido comprobado en otros estudios (Whang et al. 2005). Estos datos sugieren que la sonda CFDA SE no es un sistema adecuado para rastrear la migración de MSC bovinas debido al efecto detrimental que ejerce sobre la capacidad migratoria de estas células.

A pesar de poseer características fenotípicas y citológicas similares, las MSC derivadas desde diversas fuentes tisulares, como MO y TA, presentan diferencias significativas en la expresión de genes reguladores implicados en la angiogénesis y migración celular (Marquez-curtis y Janowska-wieczorek 2016). Los niveles de mRNA de SDF-1 fueron mayores en MSC-TA comparado con MSC-MO y FB, sugiriendo que MSC-TA puede responder con mayor intensidad a esta quimiocina que MSC-MO. Se ha descrito que el factor SDF-1 es crítico para la quimiotaxis y el homing de las MSC a través de la interacción con su receptor CXCR4 en la superficie de estas células (Honczarenko et al. 2006). Por otro lado, la expresión relativa de la quimiocina RANTES, mostró mayor nivel en MSC-TA comparado con MSC-MO y FB. Se ha reportado la expresión y actividad de RANTES en MSC, indicando que junto con SDF-1, son las quimiocinas más estimulantes de migración en estas células (Ponte et al. 2007). Existe evidencia que muestra que la quimiocina SDF-1 regula la migración en MSC a través de la interacción con su receptor CXCR4, de esta manera el aumento en la secreción de SDF-1 en el sitio de la lesión crea un ambiente adecuado que facilita el homing en estas células (Marquez-curtis y Janowska-wieczorek 2016). Sin embargo; la expresión relativa del receptor CXCR4 en MSC-MO, MSC-TA y FB no fue distinta, lo cual puede explicar la similitud en el potencial de migración detectado mediante scratch y transwell entre estas líneas celulares.

Últimamente se ha reportado que vesículas liberadas por las MSC contienen varios factores exosomáticos y tróficos, incluyendo factores de crecimiento y citoquinas (Majore et al. 2011). Estas vesículas también contienen lípidos, proteínas, mRNAs, microRNAs, tRNAs y se han identificado 857 proteínas dentro de los exosomas liberados por las MSC (Lai, Yeo, y Lim 2015). Análisis proteómicos han demostrado que, los exosomas derivados de las MSC contienen factores de crecimiento como VEGF, TGFB1 e IL8, los cuales contribuyen a la actividad pro-angiogénica (Coultas, Chawengsaksophak, y Rossant 2005). Adicionalmente, se sabe que las vesículas de MSC son ricas en factores de transcripción involucrados en las cascadas pro-angiogénicas, como HGF que estimula la proliferación y migración de células endoteliales (Tan et al. 2014). Estudios recientes han sugerido que el efecto beneficioso de las MSC en

tejidos lesionados no se atribuye a su capacidad de diferenciación, sino a su acción paracrina de señalización (Caplan y Dennis 2006). Así mismo, se ha demostrado que vesículas o microvesículas liberadas de las MSC están involucradas en la reparación de tejidos, incluyendo la capacidad de angiogénesis (Camussi et al. 2010). En este sentido, el ensayo de formación de túbulos de células endoteliales, permitió determinar que el medio concentrado de las MSC-TA ejerce un mayor efecto vasculogénico sobre células endoteliales fetales comparado con medios condicionados de MSC-MO o FB. Estos resultados sugieren que MSC-TA poseen mayor capacidad angiogénica y por lo tanto su potencial efecto en la reparación de tejidos lesionados podría ser mayor. Se ha demostrado que las vesículas extracelulares provenientes de MSC-TA contienen un conjunto de factores angiogénicos que estimulan la migración de las células endoteliales, como trombopoyetina y VEGF, promoviendo la activación de factores de crecimiento angiogénico y otras moléculas de señalización, comparado con otras fuentes tisulares (Lee et al. 2013). Así mismo, estas vesículas contienen ANGPT1 que está involucrada en la migración de células endoteliales (Merino-González et al. 2016). En nuestro estudio se determinó una expresión diferencial en las moléculas involucradas en angiogénesis ya que MSC-TA expresan menores niveles de mRNA ANGPT1 y mayores niveles de mRNA de VEGF comparado con MSC-MO y FB. A pesar de una menor expresión de ANGPT1, los mayores niveles de expresión de VEGF podrían explicar en parte la mayor capacidad angiogénica de MSC-TA comparado con las otras líneas celulares.

En conclusión, existe un potencial de migración similar entre MSC-MO y MSC-TA que puede estar determinado por niveles equivalentes de expresión del mRNA de CXCR4, receptor de SDF-1. En relación a la capacidad angiogénica, MSC-TA poseen un mayor potencial comparado con MSC-MO lo que podría estar determinado por una mayor expresión del mRNA del factor angiogénico VEGF.

Bibliografía

- Ataollahi F, Pingguan B, Moradi A, Wan Abu Bakar Wan Abas, Hui Chua K, y Azuan Abu Osman N. 2014. "New Method for the Isolation of Endothelial Cells from Large Vessels." *Cytotherapy* 16 (8): 1145–1152.
- Baek S, Kang S, Ra J. 2011. "In Vitro Migration Capacity of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Reflects Their Expression of Receptors for Chemokines and Growth Factors." *Experimental & Molecular Medicine* 43 (10): 596–603.
- Baker M, Robinson S, Lechertier T, Barber P, Tavora B, D'Amico G, Jones T, Vojnovic B, y Hodivala-Dilke K. 2012. "Use of the Mouse Aortic Ring Assay to Study Angiogenesis." *Nature Protocols* 7 (1). 89–104.
- Black L, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, Gingerich D, y Harman R. 2007. "Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints: A Randomized, Double-Blinded, Multicenter, Controlled Trial." *Veterinary Therapeutics : Research in Applied Veterinary Medicine* 8 (4): 272–284.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, y Fujinaga T. 2005. "Isolation and Multilineage Differentiation of Bovine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Cell and Tissue Research* 319 (2): 243–253.
- Burlacu A, Grigorescu G, Rosca A, Preda M, y Simionescu M. 2013. "Factors Secreted by Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Have Complementary Effects on Angiogenesis in Vitro." *Stem Cells and Development* 22 (4): 643–653.
- Camussi G, Deregibus M, Bruno S, Cantaluppi V, y Biancone L. 2010. "Exosomes/microvesicles as a Mechanism of Cell-to-Cell Communication." *Kidney International* 78 (9): 838–848.
- Caplan A, y Dennis J. 2006. "Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators." *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (5): 1076–1084.

- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, y Middleton J. 2007. "Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing." *Stem Cells* 25 (11): 2739–2749.
- Cho K, Park H, Jung J, Jeon S, Kim Y, y Roh H. 2009. "IFATS Collection: Immunomodulatory Effects of Adipose Tissue-Derived Stem Cells in an Allergic Rhinitis Mouse Model." *Stem Cells* 27: 259–265.
- Cortes Y, Ojeda M, Araya D, Dueñas F, Fernández M, Peralta O, Jiang Y. 2013. "Isolation and Multilineage Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Abattoir-Derived Bovine Fetuses." *BMC Veterinary Research* 9 (1): 133–147.
- Coultas L, Chawengsaksophak K, y Rossant J. 2005. "Endothelial Cells and VEGF in Vascular Development." *Nature* 438 (7070): 937–945.
- da Silva M, Fontes A, Covas D, Caplan A, Phinney D, Ohgushi H. 2009. "Mechanisms Involved in the Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem Cells." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20 (5): 419–427.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, y Horwitz E. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8: 315–317.
- Dong F, y Caplan A. 2012. "Cell Transplantation as an Initiator of Endogenous Stem Cell-Based Tissue Repair." *Current Opinion in Organ Transplantation* 17 (6): 670–674.
- Dong F, Harvey J, Finan A, Weber K, Agarwal U, y Penn M. 2012. "Myocardial CXCR4 Expression Is Required for Mesenchymal Stem Cell Mediated Repair Following Acute Myocardial Infarction." *Circulation* 126 (3): 314–324.
- Dueñas F, Becerra V, Cortes Y, Vidal S, Sáenz L, Palomino J, De Los Reyes M, y Peralta O. 2014. "Hepatogenic and Neurogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Abattoir-Derived Bovine Fetuses." *BMC Veterinary Research* 10: 154-167.

- Eggenhofer E, Luk F, Dahlke M, y Hoogduijn M. 2014. "The Life and Fate of Mesenchymal Stem Cells." *Frontiers in Immunology* 5: 148–154.
- Etienne-Manneville S, y Hall A. 2002. "Rho GTPases in Cell Biology." *Nature* 420: 629–635.
- First T, Hospital A, Chinese I, y Province J. 2016. "Chemokine CCL15 Mediates Migration of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cells* 34 (4): 1112–1122.
- Forsberg-Nilsson K, Behar T, Afrakhte M, Barker J, y Mckay R. 1998. "Platelet-Derived Growth Factor Induces Chemotaxis of Neuroepithelial Stem Cells." *Journal of Neuroscience Research* 530: 521–530.
- Frangogiannis N. 2011. "Stromal Cell-Derived Factor-1-Mediated Angiogenesis for Peripheral Arterial Disease: Ready for Prime Time?" *Circulation* 123 (12): 1267–1269.
- Friedl P, y Gilmour D. 2009. "Collective Cell Migration in Morphogenesis, Regeneration and Cancer." *Nature* 10: 445–457.
- Golipoor Z, Mehraein F, Zafari F, Alizadeh A, Ababzadeh S, y Baazm M. 2016. "Migration of Bone Marrow-Derived Very Small Embryonic-Like Stem Cells toward An Injured Spinal Cord." *Cell Journal* 17 (4): 639–647.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher L, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey P, y Shi S. 2002. "Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells." *Journal of Dental Research* 81 (8): 531–535.
- Guercio A, Di Marco P, Casella S, Russotto L, Puglisi F, Majolino C, Giudice E. 2015. "Mesenchymal Stem Cells Derived From Subcutaneous Fat and Platelet-Rich Plasma Used in Athletic Horses With Lameness of the Superficial Digital Flexor Tendon." *Journal of Equine Veterinary Science* 35 (1): 19–26.
- Harisi R, Kenessey I, Olah J, Timar F, Babo I, Pogany G, Paku S, y Jeney A. 2009. "Differential Inhibition of Single and Cluster Type Tumor Cell Migration." *Anticancer Research* 29 (8): 2981–2985.
- Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek A, y Silberstein L.

2006. "Human Bone Marrow Stromal Cells Express a Distinct Set of Biologically Functional Chemokine Receptors." *Stem Cells* 24 (4): 1030–1041.
- Jaganathan B, Ruester B, Dressel L, Stein S, Grez M, Seifried E, y Henschler R. 2007. "Rho Inhibition Induces Migration of Mesenchymal Stromal Cells." *Stem Cells* 25 (8): 1966–1974.
- Jia X, Pan J, Li X, Li N, Han Y, Feng X, y Cui J. 2016. "Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Angiogenesis and Renal Damage via Promoting PI3k-Akt Signaling Pathway Activation in Vivo." *Cytotherapy* 18 (7): 838–845.
- Jones D, y Wagers A. 2008. "No Place like Home: Anatomy and Function of the Stem Cell Niche." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 11–21.
- Justus C, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, y Yang L. 2014. "In Vitro Cell Migration and Invasion Assays." *Journal of Visualized Experiments* 88 (88): 1–8.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, y Bieback K. 2006. "Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue." *Stem Cells* 24 (5): 1294–1301.
- Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, y Jung J. 2007. "Direct Comparison of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissues and Bone Marrow in Mediating Neovascularization in Response to Vascular Ischemia." *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 20 (6): 867–876.
- Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, y Dolznig M. 2013. "In Vitro Cell Migration and Invasion Assays." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 752 (1): 10–24.
- Lai Ruenn Chai, Ronne Wee Yeh Yeo, y Sai Kiang Lim. 2015. "Mesenchymal Stem Cell Exosomes." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 40 (April): 82–88.
- Lauffenburger D, y Horwitz A. 1996. "Cell Migration: A Physically Integrated

- Molecular Process.” *Cell* 84 (3): 359–369.
- Lee J, Park S, Jung B, Jeon Y, Lee Y, Kim M, Kim Y, Jang J, y Kim C. 2013. “Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells.” *PLoS One* 8 (12): 1 - 7.
- Li L, y Xie T. 2005. “Stem Cell Niche: Structure and Function.” *Annual Review Cell Development Biology* 21: 605–631.
- Liang C, Park A, y Guan J. 2007. “In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro.” *Nature Protocols* 2 (2): 329–333.
- Loirand G, Guilluy C, y Pacaud P. 2006. “Regulation of Rho Proteins by Phosphorylation in the Cardiovascular System.” *Trends in Cardiovascular Medicine* 16 (6): 199–204.
- Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R, y Kasper C. 2011. “Growth and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cell Populations Derived from Whole Human Umbilical Cord.” *Stem Cell Reviews and Reports* 7 (1): 17–31.
- Mambelli L, Mattos R, Winter G, Madeiro D, Morais B, Malschitzky E, Miglino. 2014. “Changes in Expression Pattern of Selected Endometrial Proteins Following Mesenchymal Stem Cells Infusion in Mares with Endometriosis.” *PLoS One* 9 (6): 1–8.
- Marquez-Curtis L, Janowska-Wieczorek A. 2016. “Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-.” *BioMed Research International*. 13 (2013): 1–13.
- Masuzzo P, y Martens L. 2015. “An Open Data Ecosystem for Cell Migration Research.” *Trends in Cell Biology* 25 (2): 55–58.
- Merino-González C, Zuñiga F, Escudero C, Ormazabal V, Reyes C, Nova-Lamperti E, Salomón C, y Aguayo C. 2016. “Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application.” *Frontiers in Physiology*. 7 (24): 1 -9.

- Miller L. 2016. "Chapter 38 – New Strategies to Enhance Stem Cell Homing for Tissue Repair." In *Stem Cell and Gene Therapy for Cardiovascular Disease*, 485–496.
- Mosna F, Sensebé L, y Krampera M. 2010. "Human Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: A User's Guide." *Stem Cells and Development* 19 (10): 1449–1470.
- Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Toungouz M, y Lagneaux L. 2013. "Impact of Different Mesenchymal Stromal Cell Types on T-Cell Activation, Proliferation and Migration." *International Immunopharmacology* 15 (4): 693–702.
- Nowakowski A, Walczak P, Lukomska B, Janowski M, Nowakowski A, Walczak P, Lukomska B, y Janowski M. 2016. "Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells to Induce Their Migration and Survival." *Stem Cells International* 2016: 1–9.
- Pendleton C, Li Q, Chesler D, Yuan K, Guerrero-Cazares H, y Quinones-Hinojosa h. 2013. "Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue vs Bone Marrow: In Vitro Comparison of Their Tropism towards Gliomas." *PloS One* 8 (3): 1 - 7.
- Perdiguero E, García-Prat L, Sousa-Victor P, y Muñoz-Cánoves P. 2016. "Stem Cells and Aging." In *Encyclopedia of Cell Biology* 3: 776–784.
- Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, y Marshak D. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science* 284 : 143 - 148.
- Ponte A, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, Charbord P, y Domenech J. 2007. "The in Vitro Migration Capacity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Comparison of Chemokine and Growth Factor Chemotactic Activities." *Stem Cells* 25 (7): 1737–1745.
- Polzer H, Volkmer E, Saller M, Prall W, Haasters F, Drosse I, Anz D, Mutschler W, y Schieker M. 2012. "Long-term detection of fluorescently labeled human mesenchymal stem cell in vitro and in vivo by semi-automated microscopy". *Tissue Engineering* 18 (2): 156-165.

- Quimby J, y Dow S. 2015. "Novel Treatment Strategies for Feline Chronic Kidney Disease: A Critical Look at the Potential of Mesenchymal Stem Cell Therapy." *The Veterinary Journal* 204 (3): 241–246.
- Raoufi M, Tajik P, Dehghan M, Eini F, Barin A. 2011. "Isolation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Bovine Umbilical Cord Blood." *Reproduction in Domestic Animals* 46 (1): 95–99.
- Ridley A, Schwartz M, Burridge K, Firtel R, Ginsberg M, Borisy G, Parsons J, y Horwitz A. 2003. "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back." *Science* 302 (5651): 1704–1709.
- Sahoo S, Dong F, Divincenzo L, y Chilian w. 2015. Effect of Exosomes from Mesenchymal Stem Cells on Angiogenesis. Tang Y y Dawn B (Elseiver), "Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes".183 - 212 . Kansas, USA. Elseiver.
- Schmidt T, Carmeliet P. 2010. "Blood-Vessel Formation: Bridges That Guide and Unite." *Nature* 465: 697–99.
- Senger D, Perruzzi C, Streit M, Koteliensky V, de Fougerolles A, y Detmar M. 2002. "The $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Integrins Provide Critical Support for Vascular Endothelial Growth Factor Signaling, Endothelial Cell Migration, and Tumor Angiogenesis." *The American Journal of Pathology* 160 (1): 195–204.
- Sobczak M, Chumak V, Pomorski P, Wojtera E, Majewski L, Nowak J, Yamauchi J, y Rędowicz M. 2016. "Interaction of Myosin VI and Its Binding Partner DOCK7 Plays an Important Role in NGF-Stimulated Protrusion Formation in PC12 Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863 (7): 1589–00.
- Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, y Michalek J. 2012. "Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells." *Stem Cells and Development* 21 (14): 2724–52.
- Tan C, Lai R, Wong W, Dan Y, Lim S, y Ho H. 2014. "Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Hepatic Regeneration in Drug-Induced Liver Injury Models." *Stem Cell Research & Therapy* 5 (3): 76-90.

- Tang J, Wang J, Zheng F, Kong X, Guo L, Yang J, Zhang L, y Huang J. 2010. "Combination of Chemokine and Angiogenic Factor Genes and Mesenchymal Stem Cells Could Enhance Angiogenesis and Improve Cardiac Function after Acute Myocardial Infarction in Rats." *Molecular and Cellular Biochemistry* 339 (1–2): 107–118.
- Tharmalingam S, y Hampson D. 2016. "The Calcium-Sensing Receptor and Integrins in Cellular Differentiation and Migration." *Frontiers in Physiology* 7 (NUMERO DEL CAPITULO): 1–18.
- Trinh N, Yamashita T, Tu T, Kato T, Ohneda K, Sato F, y Ohneda O. 2016. "Microvesicles Enhance the Mobility of Human Diabetic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro and Improve Wound Healing in Vivo." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 473 (2016): 1111 - 1118.
- Urbani S, Caporale R, Lombardini L, Bosi A, y Saccardi Y. 2006. "Use of CFDA-SE for Evaluating the in Vitro Proliferation Pattern of Human Mesenchymal Stem Cells." *Cytotherapy* 8 (3): 243–253.
- Vertelov G, Kharazi L, Muralidhar M, Sanati G, Tankovich T, Kharazi A, Sarugaser R. 2013. "High Targeted Migration of Human Mesenchymal Stem Cells Grown in Hypoxia Is Associated with Enhanced Activation of RhoA." *Stem Cell Research & Therapy* 4: 5–14.
- Wang X, Duan X, Liu L, Fang Y, y Tan Y. 2005. "Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling." *Institute of Biochemistry and Cell Biology*. 37(6): 379-385.
- Wu Y, Chen L, Scott P, y Tredget T. 2007. "Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing through Differentiation and Angiogenesis." *Stem Cells* 25 (10): 2648–2659.
- Zheng X, Baker H, Hancock W, Fawaz F, McCaman M, y Pungor M. 2006. "Proteomic Analysis for the Assessment of Different Lots of Fetal Bovine Serum as a Raw Material for Cell Culture. Part IV. Application of Proteomics to the Manufacture of Biological Drugs." *Biotechnology Progress* 22 (5): 1294–1300.

